



TESE DE DOUTORAMENTO

**Erradicación de virus y recuperación
de cultivares de *Pyrus* y *Malus*
tradicionales de Galicia, mediante
técnicas de cultivo *in vitro*, para
conservación de su germoplasma**

Analí Lizárraga Farfán

DEPARTAMENTO DE BIOLOXÍA FUNCIONAL

FACULTADE DE BIOLOXÍA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2017







TESE DE DOUTORAMENTO

**Erradicación de virus y recuperación
de cultivares de *Pyrus* y *Malus*
tradicionales de Galicia, mediante
técnicas de cultivo in vitro, para
conservación de su germoplasma**

Fdo.

Analí Lizárraga Farfán

DEPARTAMENTO DE BIOLOXÍA FUNCIONAL

FACULTADE DE BIOLOXÍA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2017



AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE LA TESIS

Dña. **María Luz González Caamaño**,

Profesora Titular del Departamento de Fisiología Funcional de la Facultad de Biología de la Universidad de Santiago de Compostela.

Como directora de la Tesis Doctoral titulada

« Erradicación de virus y recuperación de cultivares de *Pyrus* y *Malus* tradicionales de Galicia, mediante técnicas de cultivo in vitro, para conservación de su germoplasma »

Presentada por Dña. **Analí Lizárraga Farfán**

Alumna del Programa de Doctorado «Biodiversidad y Conservación del Medio Natural»

Autoriza la presentación de la tesis indicada, considerando que reúne los requisitos exigidos en el artículo 34 del reglamento de Estudios de Doctorado, y que como directora de la misma no incurre en las causas de abstención establecidas en la ley 40/2015.

En Santiago de Compostela, a 11 de Julio de 2017

Fdo. María Luz González Caamaño



A mi padre



AGRADECIMIENTOS

El presente estudio se realizó en el Departamento de Fisiología Vegetal (actualmente Dpto. de Biología Funcional) de la Facultad de Biología, Universidad de Santiago de Compostela. A lo largo de la realización de este proyecto, muchas han sido las personas que me han ayudado y apoyado, por ello aprovecho para expresar mi más sincero reconocimiento.

Llevar a cabo una completa investigación experimental con diez variedades de dos especies y nuevos métodos ha exigido años de trabajo. Quiero expresar mi sincera gratitud a mi directora de tesis, la Dra. María Luz González Caamaño por su excelente orientación, lectura crítica, sugerencias valiosas y actitud positiva hacia la investigación y la vida en general, y sobre todo por sumergirme en este apasionante mundo de la investigación. Gracias por brindarme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo, por comprender mis errores con paciencia, por su apoyo incondicional y por su trato amable que siempre fue más allá que el estrictamente profesional. Quiero agradecer al Dr. Javier Ascasíbar por su estrecha colaboración en muchas de las tareas realizadas, así como su completa disposición a resolver cualquier duda o problema. Sus comentarios han sido de gran ayuda. Me gustaría agradecer también a la Dra. Marga Fraga por su naturaleza accesible y por su participación y contribución en esta tesis doctoral. Doy las gracias a la Dra. Ana Otero, por haberme introducido al tema de las bacterias, por su valiosa colaboración, ayuda material y enseñanzas en la parte de microbiología de esta tesis. A todo su grupo de investigación, especialmente gracias a Andrea y Celia. También quiero agradecer al Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo por brindarme cada año el material vegetal y permitir realizar las actividades de la parte molecular en su Centro, proporcionando todos los equipos e instalaciones necesarios. A todo el personal por la hospitalidad con la que me acogieron. Especialmente al Dr. Jesús Collar, M. Carmen Teijeiro y M. Dolores López. Agradezco sinceramente al Centro de Biotecnología Vegetal “Cultigar” por brindar sus instalaciones en el proceso de paso a tierra y aclimatación de las plantas. A todo el personal por participar y ayudar, de forma generosa, en este largo proceso. A los miembros del Departamento de Fisiología Vegetal, por su apoyo y constante interés por el estado de mi tesis doctoral. A Patricia y Camino por su compañía y ayuda en la parte experimental de este proyecto. Al Dr. Constantino Arce, por sus enseñanzas y asesoramiento en la parte estadística de esta tesis. A D. Felipe Rivero de Aguilar por esa disposición tan generosa que siempre ha mostrado. Quiero agradecer sinceramente a mi familia por su incesante motivación, especialmente a mi padre, y a mis amigos por su apoyo en todos los aspectos. A todos ustedes les debo mucho por vuestra constante ayuda y por ser salvavidas en momentos en los que la creencia en una misma comienza a tambalearse.



ABREVIATURAS

2iP.....	N ⁶ -(2-isopentenil) adenina
ADN.....	Ácido desoxirribonucleico
ACLSV.....	Apple chlorotic leaf spot virus
AIB.....	Ácido 3-indolbutírico
ANA.....	Ácido α -naftalenacético
ApMV.....	Apple mosaic virus
ARN.....	Ácido ribonucleico
BA.....	6-benciladenina
CA.....	‘Camoesa’
CH.....	‘Cacharela’
CIAM	Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo
cv.....	Cultivar
ELISA.....	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
FAA.....	Formaldehído, Alcohol y Acético
GA ₃	Ácido giberélico
MS.....	Medio mineral Murashige & Skoog
NPK.....	Nitrógeno, Fósforo y Potasio
PG.....	‘Príncipe Grande’
PGR.....	Regulador del crecimiento vegetal
RP.....	‘Repinaldo’
RT-PCR.....	Reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa inversa
TC.....	‘Tres en Cunca’
TDZ.....	Thidiazuron o 1-fenil-3-(1, 2, 3,-thidiazol-5yl) urea
TSC.....	Caldo de triptona y soja
ZEA.....	<i>trans</i> -zeatina



RESUMEN

Como consecuencia del abandono de la agricultura tradicional y del campo, así como los métodos de propagación, los cultivares tradicionales de Galicia de manzano y peral se encuentran en peligro de extinción o en condiciones fitosanitarias precarias incluso en los bancos de germoplasma donde se almacenan. Desde este marco de referencia en el presente trabajo de investigación se estudia, mediante el uso de técnicas biotecnológicas *in vitro*, el saneamiento, recuperación y conservación de germoplasma de dos cultivares de *Pyrus* y ocho de *Malus* evitando así la pérdida de su biodiversidad. El objetivo final de este proyecto es obtener plantas testadas libres de los principales virus que los afectan, ACLSV y ApMV, utilizando la termoterapia y cultivo *in vitro* de ápices meristemáticos. Se revisan los principales métodos empleados hasta ahora en la erradicación de virus para el saneamiento de frutales leñosos. A partir de esta revisión y apoyados en el desarrollo de la técnica combinada de terapia de calor y aislamiento de ápices meristemáticos, se pone a punto un modelo combinando las dos técnicas. Los resultados que se obtienen con la aplicación de termoterapia con subida gradual de temperatura desde 25° a 40°C durante un periodo de 18 días, confirman que es un tratamiento más funcional, de menor duración que afecta menos a las plantas facilitando el aislamiento de meristemas lo que permite regenerar plantas testadas libres de virus. En definitiva, el protocolo diseñado, aplicado para la erradicación de virus en manzano y peral, y comprobado mediante técnicas inmunológicas DAS-ELISA y RT-PCR resulta satisfactorio. Desde esta perspectiva el modelo propuesto resulta altamente valioso al establecer un plan específico aplicable para otros tipos de plantas. Por otro lado, se ha conseguido por primera vez aislar y cultivar cepas de bacterias endófitas que conviven en el interior de los explantos de manzano *in vitro*. Asimismo, se han identificado en su totalidad, mediante análisis metagenómico de ARN 16S (Illumina) las bacterias que conforman el microbioma interno de todos los cultivares seleccionados, así como la existencia de bacterias endófitas predominantes en cada uno de ellos.

Palabras clave: ACLSV/ApMV virus, bacterias endófitas, *Pyrus* y *Malus*, termoterapia *in vitro*.

RESUMO

Como consecuencia do abandono da agricultura tradicional e do campo, así como dos métodos de propagación, os cultivares tradicionais de Galicia de maceira e pereira encóntranse en perigo de extinción ou en precarias condicións fitosanitarias incluso nos bancos de xermoplasma onde se almacenan. Dende este marco de referencia no presente traballo de investigación estúdase, mediante o uso de técnicas biotecnolóxicas in vitro, o saneamento, recuperación e conservación de xermoplasma de dous cultivares de *Pyrus* e oito de *Malus* evitando así a perda da súa biodiversidade. O obxectivo final de este proxecto é obter plantas testadas libres dos principais virus que lles afectan, ACLSV e ApMV, utilizando a termoterapia e cultivo in vitro de ápices meristemáticos. Revísanse os principais métodos empregados ata agora na erradicación de virus para o saneamento de froiteiros leñosos. A partir desta revisión e apoiados no desenvolvemento da técnica combinada de terapia de calor e illamento de ápices meristemáticos, ponse a punto un modelo combinando as dúas técnicas. Os resultados que se obteñen coa aplicación de termoterapia con subida gradual de temperatura dende os 25°C ate 40°C, durante un período de 18 días, confirman que é un tratamento máis funcional, e curto que afecta menos ás plantas facilitando o illamento de meristemas o que permite rexenerar plantas testadas libres de virus. En definitiva, o protocolo deseñado, aplicado para a erradicación de virus en maceira e pereira, e comprobado mediante técnicas inmunolóxicas DAS-ELISA e RT-PCR, resulta satisfactorio. Dende esta perspectiva o modelo proposto é altamente valioso ao establecer un plan específico aplicable para outros tipos de plantas. Por outro lado, conseguiuuse, por primeira vez, illar e cultivar cepas de bacterias endófitas que conviven no interior dos explantos de maceira in vitro. Así mesmo, identificáronse na súa totalidade, mediante análise metaxenómico de ARN 16S (Illumina), as bacterias que conforman o microbioma interno de todos os cultivares seleccionados, así como a existencia de bacterias endófitas predominantes en cada un deles.

Palabras chave: ACLSV/ApMV virus, bacterias endófitas, *Pyrus* y *Malus*, termoterapia in vitro.

SUMMARY

As a result of the abandonment of traditional agriculture and the field, as well as the methods of propagation, the traditional cultivars of Galician apple and pear trees are in danger of extinction or in precarious phytosanitary conditions even in the germplasm banks where they are stored. In the present research work was studied, through the use of biotechnological techniques in vitro, the eradication of viruses, recovery and conservation of germplasm of two cultivars of *Pyrus* and eight of *Malus* are studied, avoiding the loss of their biodiversity. The final objective of this project is to obtain tested plants free of the main viruses that affect them, ACLSV and ApMV, using thermotherapy and in vitro culture of apical meristem. We reviewed the main methods used in the eradication of virus on woody fruit trees. Based on this review and supported by the development of the combined heat therapy and isolation technique of apical meristem, a model was developed combining the two techniques. The results obtained with the application of thermotherapy with a gradual increase of temperature from 25°C to 40°C during a period of 18 days, confirm that it is a more functional and faster treatment, that affects less to the plants facilitating the isolation of meristem what allows to regenerate tested plants free of viruses. In conclusion, the protocol designed for the eradication of virus in apple and pear trees and verified by immunological techniques DAS-ELISA and RT-PCR, is satisfactory. From this perspective, the proposed model is high valuable establishing a specific plan applicable to other types of plants. On the other hand, it has been possible for the first time to isolate and cultivate strains of endophyte bacteria that coexist inside of apple explants in vitro. In addition, the bacteria that make up the internal microbiome of all selected cultivars, such as the existence of predominant endophytic bacteria in each of the cultivars studied, have been identified in their entirety by metagenomic analysis of 16S RNA (Illumina).

Key words: ACLSV/ApMV virus, endophytic bacteria, *Pyrus* y *Malus*, in vitro thermotherapy.



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Manzano y peral.....	1
1.2 Historia.....	1
1.2.1 Centros de Origen.....	1
1.2.2 Proceso de Domesticación.....	3
1.3 Situación Actual.....	4
1.3.1 Frutales en España.....	6
1.3.2 Frutales en Galicia.....	8
1.4 Bancos de Germoplasma.....	9
1.5 Leyes Fitosanitarias.....	12
1.6 Micropropagación.....	13
1.6.1 Saneamiento Vegetal.....	15
1.6.2 Termoterapia y Cultivo de meristemos.....	16
1.7 Virus.....	17
1.8 Bacterias endófitas.....	20
1.8.1 Antibióticos.....	24
1.8.2 Antibiograma.....	24
1.8.3 Metagenómica.....	25

2. OBJETIVOS.....	27
2.1 Justificación.....	28

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Material Vegetal.....	29
3.2 Establecimiento en cultivo aséptico.....	33
3.2.1 Esterilización del material vegetal.....	33
3.2.2 Medios y condiciones de cultivo.....	34
3.3 Micropropagación.....	35
3.3.1 Multiplicación de explantos y medios de cultivo.....	35
3.3.2 Enraizamiento de los brotes.....	36
3.3.3 Paso a tierra y aclimatación.....	37
3.4 Erradicación de virus y técnicas de comprobación.....	39
3.4.1 Erradicación de virus del material vegetal in vitro.....	39
3.4.1.1 Termoterapia.....	39
3.4.1.2 Aislamiento y Cultivo de ápices meristemáticos.....	42
3.4.2 Comprobación de la presencia de virus.....	43
3.4.2.1 Métodos de DAS-ELISA y RT-PCR.....	43
3.5 Bacterias endófitas asociadas a manzano y peral.....	45
3.5.1 Cultivo de bacterias.....	45
3.5.2 Antibiograma.....	47

3.5.3 Metagenómica.....	48
3.6. Técnicas histológicas.....	49
3.7 Técnicas fotográficas.....	51
3.8. Análisis estadístico.....	51
4. RESULTADOS	
4.1 Micropropagación.....	53
4.1.1 Establecimiento en cultivo aséptico.....	53
4.1.2 Multiplicación in vitro de cultivares de manzano y peral.....	58
4.1.2.1 Multiplicación de cultivares de manzano.....	59
4.1.2.2 Multiplicación de cultivares de peral.....	92
4.1.3 Enraízamiento de cultivares de manzano y peral.....	100
4.1.3.1 Enraizamiento de cultivares no libres de virus.....	101
4.1.3.2 Enraizamiento de cultivares libres de virus	105
4.1.4 Paso a tierra y Aclimatación.....	110
4.1.4.1 Aclimatación y supervivencia de plantas enraizadas no libres de virus	110
4.1.4.2 Aclimatación y supervivencia de plantas enraizadas libres de virus	111
4.1.5 Observaciones Finales.....	113
4.2 Termoterapia y cultivo de meristemos.....	115
4.3 Bacterias endófitas asociadas a manzano y peral.....	123
4.3.1 Antibiograma.....	126
4.3.2 Estudio histológico.....	131
4.3.3 Metagenómica.....	134
5. DISCUSIÓN.....	141
6. CONCLUSIONES.....	165
7. BIBLIOGRAFÍA.....	169
8. ANEXOS.....	191

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Manzano y Peral

Los géneros *Pyrus* y *Malus*, son frutales pertenecientes a la familia Rosaceae, que, dentro de las Angiospermas, es una familia de dicotiledóneas, del orden Rosales, importante tanto por el número de especies que forman parte de ella, como por su amplia distribución o por su importancia económica ya que incluye la mayor parte de los frutales de consumo masivo como los citados manzano y peral, así como las frutas de hueso melocotón, ciruelo, cerezo, albaricoque o almendro, y los pequeños frutos rojos como fresa, moras o frambuesas. También pertenece a esta familia las especies ornamentales entre la que destaca la rosa, que da nombre a la familia, de gran importancia en jardinería y en la industria del perfume. Cuenta pues con unos 100 géneros, y alrededor de 2500 especies, distribuidas por casi todo el mundo, originarias sobre todo en las zonas templadas y subtropicales del hemisferio boreal.

1.2 Historia

1.2.1 Centros de Origen

El estudio de las fuentes mundiales más importantes de plantas cultivadas, ha mostrado que sus centros de evolución están localizados en los antiguos países agrícolas. Este estudio, realizado por Nicolai I. Vavilov a principios del siglo XX, le llevó a proponer que el origen de los recursos fitogenéticos de los cultivos terrestres se localizan en ocho regiones concretas del planeta que probablemente fueron, al mismo tiempo, los focos de desarrollo de la agricultura mundial y de la historia general de la cultura y de la humanidad. Según este autor, en la historia de la agricultura mundial solo una estrecha franja de tierra en el planeta ha jugado un papel importante. Así se definió, por primera vez, el término “Centros de origen” (**Fig. 1.1**) como las zonas primarias de diversidad de especies cultivadas (Vavilov 1931).

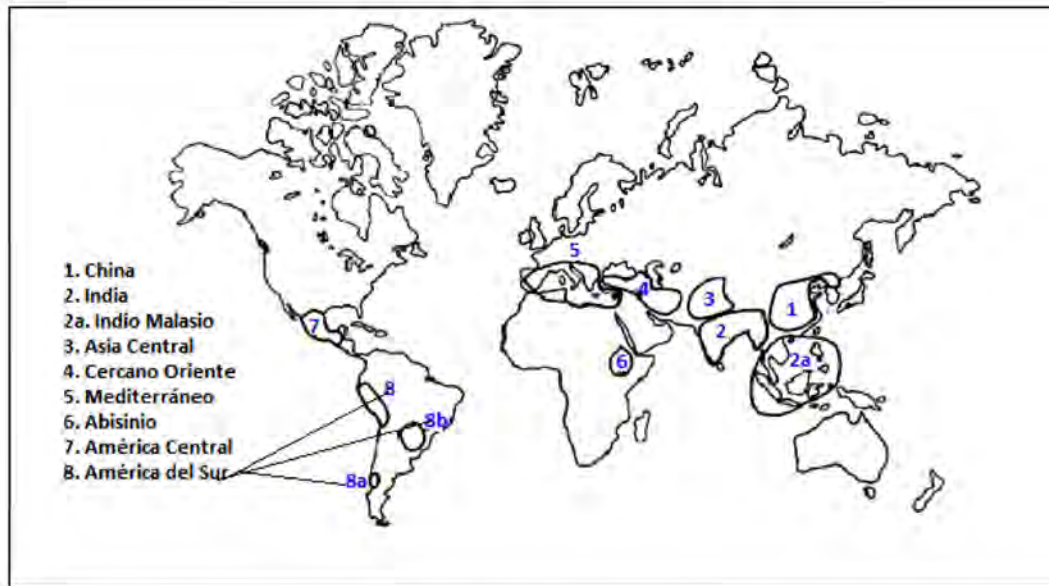


Figura 1.1 Mapa propuesto por Nicolai I. Vavilov sobre los Centros de Origen de las plantas cultivadas (Modificación del original)

Pronto se hizo necesario distinguir entre centros primarios y secundarios, pues en los primeros encontramos los progenitores silvestres de las especies hoy en día cultivadas. Sin embargo, durante el proceso de domesticación, estas especies se llevaron a otras áreas, donde tuvieron que adaptarse a diferentes condiciones climáticas, tipos de suelos y variada topografía, forzando la aparición de nueva diversidad genética con características nuevas. En este sentido, con la expansión de las especies cultivadas y su aclimatación a su nueva situación, Zhukovsky a mediados del siglo XX, acuña el término “microcentros”, como áreas cerradas y restringidas con especies endémicas, resultado de esa adaptación. Pese a la formación de endemismos o de cultivares adaptados a las condiciones que les fueron impuestas, muy frecuentemente los centros fundamentales de origen de las plantas cultivadas son los que albergan una asombrosa diversidad de variedades, tal como han probado posteriores investigaciones (Leppik 1970).

Transcaucasia, actualmente formada por las repúblicas de Armenia, Georgia y Azerbaiyán, es el principal lugar de origen de varios árboles frutales europeos, pues allí encontramos que los frutales silvestres son asombrosamente variados. No obstante, la diversidad por sí sola no siempre determina el centro primario de origen de la planta

cultivada. Es el estudio de las cepas silvestres y cultivadas y la historia de las migraciones de las plantas, lo que les llevó a situar el origen de los frutales en esta zona. No es del todo circunstancial que la historia bíblica localice el Paraíso Terrenal-el Jardín del Edén-en esta región. Incluso es posible ver en Transcaucasia y en el norte de Persia bosques de manzanos silvestres, perales, guindales y membrillos, cubiertos de parras silvestres; paraísos en el sentido real de la palabra (Vavilov 1926). Aunque esta teoría fue revisada en varias ocasiones por otros autores, entre los que destaca J. Harlan (1971), el hecho es que tomamos la teoría de Vavilov como referencia, pues además de interesante, es la vigente en organismos internacionales como la FAO.

1.2.2 Proceso de Domesticación

Dentro del proceso de domesticación de los frutales, es de destacar el caso del manzano, ya que es el primer frutal del que se tiene constancia que fue domesticado. Ponomarenko en 1977 de acuerdo con Vavilov, y otros autores posteriormente, propone que una especie de manzano silvestre, *Malus sieversii*, que crece de forma natural en las regiones montañosas de Asia media, podría ser el progenitor más importante del manzano domesticado (*Malus x domestica*) situando las primeras variedades de manzanos cultivadas hace unos 15.000-20.000 años (Ponomarenko 1987). Sin embargo, probablemente la dispersión de los árboles y las semillas de manzanos desde Asia Central tuvo lugar mediante las rutas de comercio, popularmente conocidas como ruta de la seda ya que, posiblemente, tanto los rumiantes usados como transporte por los hombres como los propios hombres, comieron estos frutos, dispersando las semillas a lo largo de unas rutas que empiezan a estar bien establecidas en la edad de bronce (Forsline et al. 2003; Juniper et al. 1998).

Los perales tienen un origen que está muy ligado al de los manzanos, secundando a estos en cuanto a la producción frutícola de la agricultura del Mundo Antiguo templado-frío, puesto que ambos frutales prosperan en ambientes similares (Zohary et al. 2000). Aunque hay autores que sitúan el cultivo de los perales posterior al de manzanos, lo que sí parece claro es que ambos géneros tienen sus orígenes bastante próximos puesto que los estudios realizados demuestran bastantes similitudes

genómicas, no descartándose el hecho de que procedan de la hibridación y selección de una especie original, aunque esto no deja de ser una hipótesis de algunos autores (Bassil et al. 2009).

La selección de los cultivares, probablemente surgió de cruces al azar. Cultivares que fueron mantenidos mediante propagación vegetativa, especialmente mediante injertos, tecnología hortícola muy antigua pues ya existen citas en tablas cuneiformes babilónicas (3300 a 3200 a. C.). Posteriormente, tanto los griegos con Teofrasto (487-287 a.C.) como los romanos con Cato (234-149 a.C.), Varro (116-27 a.C.), Virgilio (70-19 a.C.) o Plinio (12 a.C.-70 d.C.) citaron la técnica del injerto en sus obras. Es precisamente con la expansión del imperio romano cuando estos frutales se conocieron en toda Europa llegando a extenderse por todas las regiones del viejo continente a través de las órdenes religiosas que, posteriormente, durante la edad media, consiguieron y distribuyeron nuevos híbridos de estos dos géneros de frutales (Bassil et al. 2009).

En el noroeste de la Península Ibérica, concretamente en Galicia, nos encontramos *Malus sylvestris* de forma espontánea y hay constancia de especies muy antiguas de *Malus x domestica* (Pereira-Lorenzo et al. 2009), siendo posible la aparición de híbridos que dieron lugar a variedades no comestibles.

1.3 Situación Actual

La importancia de los frutales, se debe a que hoy en día son parte fundamental de nuestra dieta, no solo por su aceptación en casi todas las regiones del mundo, sino también por el aporte nutritivo. En todos los países, existen variedades de frutales con muy bajas poblaciones, en ocasiones casi nulas, debido al abandono de la agricultura tradicional, a los métodos de propagación convencional que se aplican a estos cultivares y al deteriorado estado fitosanitario.

Los frutales de pepita junto a los cítricos, los frutales de hueso y la uva de mesa son las frutas más conocidas y consumidas en el mundo; en las últimas décadas las frutas tropicales y exóticas como kiwi, mango, etc., están compitiendo o complementando a las mencionadas anteriormente. Los cítricos constituyen el grupo de

frutas más producida mundialmente y de acuerdo a los datos de la FAO durante el año 2013 se produjeron 168.274.687 t de las cuales las más importantes son naranja y mandarina, mientras que de manzanas y peras se produjeron 103.442.237 t.

A nivel mundial, en la producción y comercialización de manzanas, se están produciendo cambios muy importantes. Uno de ellos, es la gran disponibilidad de nuevas variedades que, en los casos de éxito, están logrando precios diferenciales sobre las variedades tradicionales. Teniendo en cuenta la producción mundial de frutas (FAO 2009), manzana (*Malus sp.*) era el tercer cultivo de frutas más importante (64.3 millones de toneladas / año) después de banano (81.3 millones t/año) y uva (66.3 millones t/año). El consumo *per cápita*, que a nivel global venía disminuyendo, se ha estabilizado en los últimos años, aunque hay excepciones como en Asia donde se está incrementando. Por otro lado, la UE-28 (Unión Europea-28 países) también ha estabilizado su producción en 12.000.000 toneladas en el año 2013, sobresaliendo Polonia con 3.500.000 toneladas, lo que ha complicado la comercialización de variedades tradicionales por la gran incidencia de este país sobre el total producido. Los mayores productores europeos son Polonia que ocupa un cuarto lugar a nivel mundial, seguido de Italia (con 2.216.000 t) y Francia (en séptimo lugar con 1.737.000 t). España está muy alejada de los quince países más productores de manzana siendo China con 39.684.118 t quien produjo casi el 50% del total de la producción mundial de manzanas que fue de 80.822.521 t en el año 2013.

Como resumen puede decirse que en Europa las variedades cultivadas más importantes son ‘Golden Delicious’ y ‘Gala’, dos variedades que tienen muy buen comportamiento en frigorífico. Hay un creciente interés por las nuevas variedades, pero todavía su volumen es pequeño en comparación con las tradicionales y su cultivo tiene en sí mismo un alto riesgo, aunque el precio es mucho más atractivo. Estas variedades “club” son impulsadas por las grandes cadenas de supermercados que necesitan tener a la vista productos diferentes. Se considera que para que el productor pueda competir con variedades tradicionales la fruta ofrecida debe ser de calidad superior.

1.3.1 Frutales en España

Entre los países de la Unión Europea, España tiene gran relevancia a nivel agrícola debido a sus particulares condiciones climatológicas, jugando un importante papel el sector hortofrutícola dentro de la agricultura, pero el manzano no llega a ser un cultivo competitivo a nivel europeo y por ello debe importar casi la mitad de las manzanas que se consumen.

En España la superficie plantada para la producción de frutales de manzano y peral disminuyó desde 2002 y por contra se ha producido una expansión considerable en las plantaciones de frutos con hueso, especialmente de paraguayos. Teniendo una distribución de producción de frutales no cítricos a nivel nacional, según fruto, un 43% para frutales de hueso, 25% frutales de pepita, 22% frutales carnosos y un 10% para frutos secos. Dentro de los frutales de pepita, considerando solo el manzano y peral, las variedades más cultivadas a nivel nacional para manzano corresponde a la variedad ‘Golden delicious’ con un 48% y para el peral, la variedad blanquilla con un 14% según el Anuario de Estadística 2015 (**Fig. 1.2**).

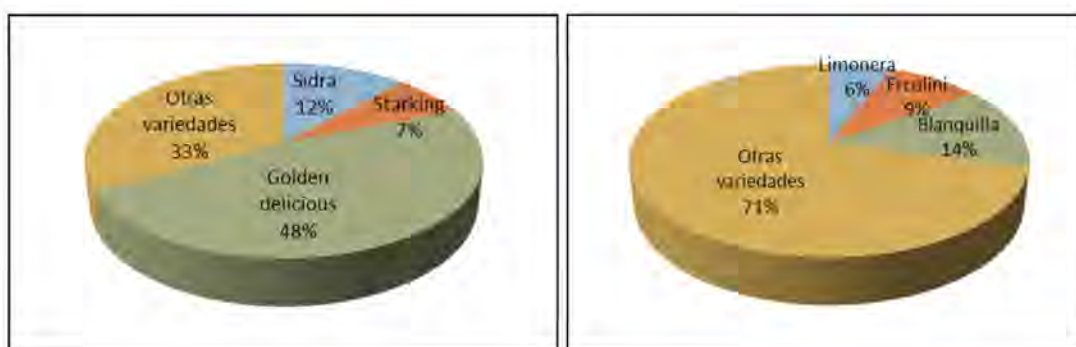


Figura 1.2 Distribución de la producción de manzano y peral en España según variedad. Datos del Anuario de Estadística 2015. Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente.

La zona productora de peral y manzana más importante es Cataluña (Lérida y Gerona, sobre todo) y en menor medida Aragón, habiendo últimamente mucho interés en plantar en regiones más frías como es la zona de los Pirineos. Los productores de

Cataluña, Aragón y La Rioja, representan el 85% de la producción nacional de manzana y pera. Las principales variedades que se cultivan son ‘Golden Delicious’ (57%), Gala (16%), ‘Red Delicious’ (8%), ‘Granny Smith’ (5%), grupo Reinetas (6%) y ‘Fuji’ (5%). Como variedad “club” se ha plantado Cripps Pink y sus clones. Sin embargo, una de cada dos manzanas que se consume en España es de importación. A pesar de la renovación varietal continuada y las nuevas y competitivas plantaciones del territorio nacional, prácticamente la mitad de las manzanas que se vende en grandes supermercados es de importación, un 44% respecto al 53% de la fruta nacional. Esta cifra representa un retroceso de la fruta española respecto al estudio realizado el año 2015 en el que la manzana de importación era el 38%. Estudios estadísticos que muestran los datos sobre la producción anual de manzanas de mesa en España entre los años 2011 y 2014, expresados en miles de toneladas, revelan un descenso de más de 100.000 toneladas en el volumen de manzanas de mesa producidas entre el inicio y el final del período.

Desde el año 2004, España cuenta con 16 indicaciones geográficas y denominaciones de origen protegidas para frutas, de las cuales dos corresponden a manzanos (IGP Manzana de Girona y DOP Manzana reineta del Bierzo), y tres a peral (DOP pera Jumilla, DOP pera de Rincón de Soto y DOP pera de Lleida). Más de la mitad de los cultivares de manzano que se registran en el territorio nacional proceden de Galicia, situándose como la Comunidad Autónoma que posee la mayor diversidad de cultivares de frutas carnosas con pepitas, aunque con menor extensión cultivada. Según las estadísticas del Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (2015), vemos que el rendimiento de producción de frutos por árbol en Galicia tiene capacidad para llevar a cabo una producción frutícola más competitiva. Muchas de las especies de estos dos géneros que encontramos en Galicia están consideradas como autóctonas, pues son “Archaeophytas”, es decir, plantas que se introdujeron en una región, en este caso Galicia, antes del año 1500, estableciéndose esta fecha porque fue el descubrimiento de América, acontecimiento histórico que produjo el mayor intercambio de germoplasma de la historia. (Capdevila et al. 2006).

1.3.2 Frutales en Galicia

El sector frutícola, en particular de manzano y peral, tiene gran importancia en Galicia. El abandono de la agricultura tradicional y del campo así como los métodos de propagación tradicionales, hacen que estos frutales sean cultivares en vía de desaparición o que se encuentren en condiciones fitosanitarias muy precarias incluso en los bancos de germoplasma donde están almacenados. La caracterización genética, recuperación, saneamiento y conservación del germoplasma de estos cultivares es, por tanto, imprescindible. En este punto, Galicia se sitúa como la Comunidad Autónoma que posee la mayor diversidad de dichos cultivares. El hecho de que no estemos compitiendo a nivel nacional se debe en primer lugar, a que el número de hectáreas en plantación regular que le dedicamos a este sector está bastante por debajo que el resto que las comunidades autónomas siendo para el manzano un total de 4336 hectáreas (ha) entre secano y regadío y de peral solamente 439 ha, resultados de la encuesta sobre superficies 2015 de Galicia (Encuesta sobre Superficies y Rendimientos Cultivos (ESYRCE) Encuesta de Marco de Áreas de España (Anuario Estadística 2015, Ministerio de Agricultura y pesca, Alimentación y Medio Ambiente). Y, en segundo lugar, a que estos árboles presentan una gran cantidad de enfermedades, de todo tipo: virus, bacterias, hongos y fitoplasmas, derivadas de un manejo tradicional de los cultivos y del abandono de los cultivares tradicionales. Este es un hecho que limita aún más su expansión y comercialización, pues la unificación de los mercados a nivel internacional llevó a los países a proponer una serie de leyes fitosanitarias, con el fin de establecer barreras a la indeseada propagación de patógenos que producen la mayor parte de las enfermedades víricas, bacterianas o fúngicas, permitiendo solamente la comercialización de aquellas variedades de plantas que cumplan con la normativa establecida en 1999 por la EPPO (*European and Plant Protection Organization*).

La protección y conservación de la biodiversidad es importante y por ello es necesario encontrar cultivares de frutales que aún no hayan sido introducidos en el mercado pero que estén bien adaptados al medio donde se cultiven, libres de patógenos, con el fin de aprovechar al máximo los recursos propios de la zona. En nuestro caso esto nos hace volver la mirada a los cultivares antiguos de manzano y peral, que se cultivaban tradicionalmente en Galicia durante los siglos pasados y que ahora, debido a

la globalización del mercado y al abandono de la agricultura tradicional, están siendo, o ya han sido, abandonados en el campo.

La aplicación de la biotecnología en frutales, apoyada en las técnicas de cultivo in vitro, para la recuperación de variedades tradicionales no comercializadas o a muy pequeña escala, puede generar la producción de frutales de alta calidad y ser competitiva. Eso permitirá reconvertir la fruticultura a partir de tener más variedades adaptadas y aclimatadas para distintas áreas de producción, conseguir que articulen políticas de desarrollo local y así iniciar un proceso de reconversión en la zona con un tipo de fruticultura sostenible. Es el momento de promocionar nuestros cultivares tradicionales como se está haciendo en el resto de Europa.

1.4 Bancos de Germoplasma

Actualmente España cuenta con bancos de germoplasma distribuidos por todo el territorio y coordinados por el Centro de Recursos Fitogenéticos del INIA en Madrid. Sin embargo, son pocos los dedicados a conservar colecciones de perales y manzanos destacando el Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo (A Coruña) por ser el banco de germoplasma que más variedades registra, tanto de manzanos como de perales pues más de la mitad de los cultivares registrados proceden de Galicia.

El Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo, localizado en Abegondo - A Coruña, tuvo la iniciativa de realizar una colección de cultivares locales dirigidas por los Dr. Manuel Ponte, Dr. Santiago Silvar y Dr. Jesús Tubío, realizando la recogida e introducción del material. Entre los años 1978 y 1981 se recorrieron las cuatro provincias gallegas en las que se localizaron, en distintas localidades, cultivares autóctonos de manzano, peral, ciruelo, cerezo y melocotonero. El total de entradas registradas por especies fue de 408 de manzano, 246 de peral, 23 cerezos, 54 ciruelos y 31 melocotoneros (Pereira-Lorenzo et al. 2002). Así se creó el Banco de Germoplasma “Floral” del Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo (CIAM), perteneciente al Instituto Gallego de Calidad Alimentaria (INGACAL) dependiente de la Consellería do Medio Rural e do Mar. El CIAM cuenta actualmente con una colección de manzanos y perales inscrita en 1981 en el Centro de Recursos Fitogenéticos (CRF). La

caracterización morfológica de ambas colecciones se realizó en colaboración con la Universidad de Santiago de Compostela utilizando microsatélites como marcadores a la colección de manzanos (Pereira-Lorenzo et al. 2003, 2007) y de perales (Pereira-Lorenzo et al. 2013). La caracterización molecular de manzanos, que se sigue llevando a cabo, se inició con el proyecto coordinado nacional (RF2011-00017-C05-02) “*Harmonización da metodoloxía de caracterización, avaliación da diversidade xenética e definición da colección nuclear do xermoplasma de mazá conservado nos Bancos de Xermoplasma españois*”. Como consecuencia de estos trabajos se eliminaron las redundancias detectadas en la colección de tal modo que en la actualidad se conservan 131 accesiones de peral y 330 accesiones de manzano ya caracterizadas (**Fig. 1.3**).



Figura 1.3 Colección de manzanos y perales conservada en el Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo.

Actualmente todos los cultivares del banco de germoplasma (CIAM) presentan infecciones generalizadas por virus y fitoplasmas (**Fig. 1.4**) y por ello, siguiendo la normativa europea de protección fitosanitaria (EPPO 1999) es necesario erradicar esas enfermedades víricas según la legislación vigente y sanear el material para poder comercializarlo y conservarlo a largo plazo.

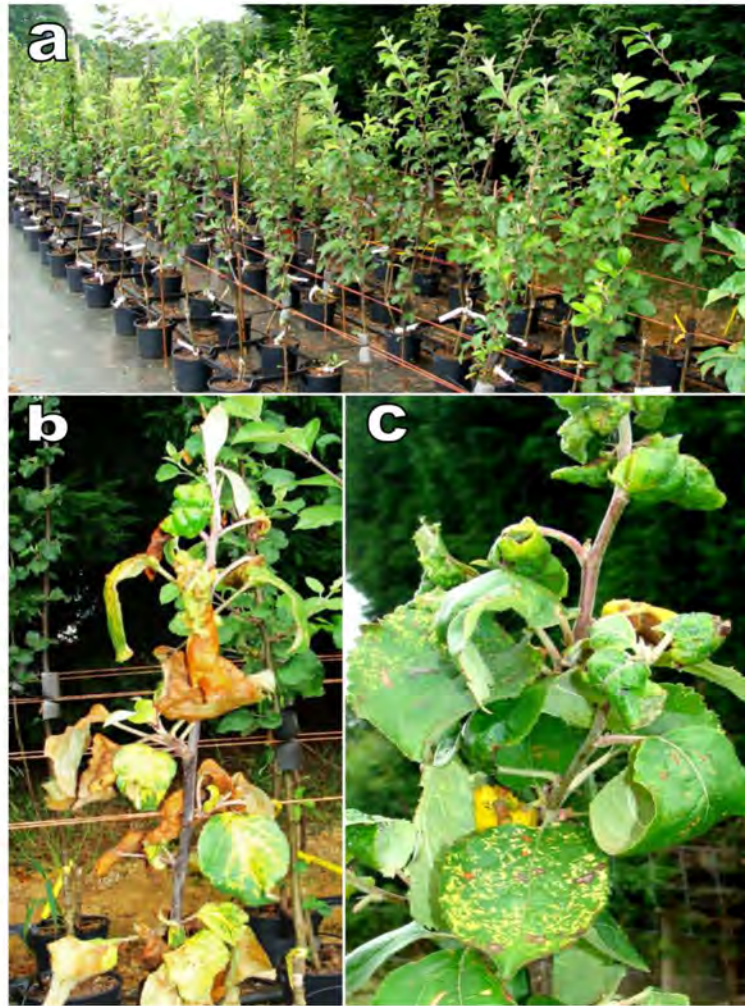


Figura 1.4 a) Viveros de manzanos y perales del CIAM b) Manzano infectado con bacterias y fitoplasma c) Manzano mostrando síntomas de infección del virus ApMV.

El uso de métodos biotecnológicos usando técnicas de cultivo *in vitro*, tiene gran relevancia a la hora de recuperar y sanear estos cultivares, de los principales virus como ApMV (*Apple mosaic virus*), ACLSV (*Apple chlorotic leaf spot virus*) presentes en todos los cultivares de manzano y peral. La presencia de bacterias endófitas es todavía un campo casi inexplorado que deberá ser tratado en un futuro en profundidad para el conocimiento de las interrelaciones entre el frutal y las bacterias que lo colonizan.

1.5 Leyes Fitosanitarias

La Organización Mundial del Comercio (OMC), constituida en 1995, representa en la actualidad el 95% del comercio mundial. Deseando que se establezca un marco multilateral, organismos competentes han creado normas y directrices que sirvan de guía, a nivel mundial, para el uso adecuado de normas comerciales, así como medidas sanitarias y fitosanitarias que reduzcan al mínimo los efectos negativos, tanto para el comercio como para la conservación de nuestra diversidad. La Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF), único organismo internacional para la sanidad vegetal, reconocida por la OMC, sobre la aplicación de medidas sanitarias y fitosanitarias, tiene como objetivo prevenir y controlar la propagación de plagas en plantas. Las medidas fitosanitarias de la Unión Europea tienen como fin, prevenir el ingreso y diseminación de organismos que perjudiquen tanto la salud de la comunidad como el equilibrio de plantas y animales dentro del territorio. En cada país comunitario existe una autoridad responsable que exige un certificado fitosanitario que garantice el cumplimiento de la normativa realizando una inspección de ingreso de los productos para que puedan circular libremente en toda la Unión.

La *European and Mediterranean Plant Protection Organization* (EPPO) es una organización intergubernamental responsable de la cooperación europea en materia de salud de las plantas. Fundada en 1951 por 15 países europeos, ahora cuenta con 51 miembros, que abarcan casi todos los países de la región europea y área mediterránea. Sus funciones consisten en simplificar y unificar las regulaciones fitosanitarias; desarrollar estrategias internacionales contra la introducción y propagación de plagas peligrosas promoviendo métodos de control, seguros y eficaces y prevenir la entrada y establecimiento de plagas y parásitos en el continente europeo, incluyendo países miembros y no-miembros de la Unión Europea. Para ello la EPPO (1999) ha elaborado un gran número de normas y publicaciones sobre plagas de las plantas, reglamentos fitosanitarios y productos fitosanitarios. La EPPO en 1981, publicó el primer esquema con principios básicos en la producción de frutales libres de virus, así como las pruebas necesarias para su certificación.

Según la legislación vigente dada por la EPPO para certificar como libres de virus los cultivares de manzano y de peral estos deberán ser testados (EPPO 2014) para cuatro virus y un fitoplasma.

Malus x domestica: Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV); Apple mosaic virus (ApMV); Apple stem grooving virus (ASGV); Apple stem pitting virus (ASPV); Fitoplasma: Apple proliferation phytoplasma (AP).

Pyrus communis: Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV); Apple mosaic virus (ApMV); Apple stem grooving virus (ASGV); Apple stem pitting virus (ASPV); Fitoplasma: Pear decline phytoplasma (PD).

España cuenta actualmente con varias zonas fitosanitarias regentadas por Centros Oficiales en los que se lleva a cabo las pruebas de certificación de acuerdo con la normativa vigente para verificar que todo el material vegetal, dentro del territorio español, esté libre de patógenos. Sin embargo, estas políticas fitosanitarias limitan la obtención de material vegetal por parte de los fruticultores que, para poder comercializarlos, estos cultivares han de estar fitosanitariamente libres de patógenos.

1.6 Micropropagación

El fundamento de la micropropagación es conseguir, mediante el empleo de técnicas de cultivo in vitro y a partir de un explanto inicial, la propagación vegetativa de plantas (Deberegh et al. 2002). La aplicación de técnicas biotecnológicas, como es el cultivo in vitro, puede llevarse a cabo con material vegetal diverso. Se inicia con la desinfección externa del material vegetal con agentes desinfectantes como el hipoclorito sódico (Grant et al. 2000; Hirabayashi et al. 1987; Kadota & Niimi 2003; Pruski et al. 2000), una disolución de cloruro de mercurio (Andreu et al. 2005; Thakur et al. 2008) o cualquier otra sustancia germicida, complementadas muchas veces con un lavado previo con alcohol etílico (Jarausch et al. 1996; Poudyal et al. 2008; Xu et al. 2008). Después de la desinfección externa, para el establecimiento en cultivo aséptico, se debe tomar una porción de una planta (ápice de una yema, segmento de hoja, de tallo, nudo, meristemo, embrión, semilla, antera, etc.) a la que se denomina explanto, colocarla en

un medio mineral estéril, normalmente gelificado o semisólido, con presencia de auxinas y/o citoquininas, en el que se regenerará nuevas plantas, siempre asépticas y bajo condiciones físicas controladas. La respuesta de los cultivos in vitro, dependerá de factores como la especie y el genotipo, estado fisiológico de los explantos, época de recogida, edad de la planta madre, estado fitosanitario, etc. Sin embargo, esa respuesta puede ser modulada agregando compuestos que ejerzan una acción similar a las propias hormonas vegetales (fitohormonas) como son aquellos compuestos químicos de síntesis, denominados reguladores de crecimiento, que afectan al crecimiento y desarrollo de los cultivos in vitro, entre los que se encuentran principalmente auxinas y citoquininas.

El cultivo in vitro es una herramienta importante que tiene gran interés a la hora de multiplicar, regenerar, sanear y conservar cualquier especie vegetal siendo un método alternativo de conservación de germoplasma, por ejemplo, en especies leñosas (Nadarajan et al. 2006). Mediante esta técnica se pueden obtener plantas libres de patógenos externos (principalmente bacterias y hongos) ya que se realizan en condiciones de asepsia previa desinfección del material puesto en cultivo. Además, hay técnicas asociadas más específicas que permite conseguir plantas libres de virus. Para llevar a cabo cualquiera de estas opciones es necesario establecer protocolos adecuados de regeneración de las plantas probando la acción de diferentes citoquininas y auxinas hasta encontrar la concentración óptima para que se produzca un buen desarrollo morfológico de los explantos, para un determinado genotipo y así obtener gran cantidad de brotes en la etapa de multiplicación. En general, las plantas leñosas, y entre ellas los frutales, se cultivan sobre un medio mineral sólido adicionado siempre de unas concentraciones determinadas de auxina y citoquinina.

Cuando hablamos del establecimiento y multiplicación de diferentes cultivares pertenecientes a los géneros *Pyrus* y *Malus*, vemos en la bibliografía que tienen unos requerimientos nutricionales y hormonales óptimos, que dependen en gran medida del genotipo estudiado o cultivares y, sin embargo, encontramos cierta similitud en la composición de los medios de cultivo para el establecimiento de estos dos géneros. Casi todos los autores coinciden en el medio mineral MS (Murashige & Skoog 1962), utilizado en cultivares de *Pyrus* (Berardi et al. 1993; Hirabayashi et al. 1987; Kadota & Niimi 2004; Lane et al. 1998; Poudyal et al. 2008; Shibli et al. 1997; Tang et al. 2008)

así como en cultivares de *Malus* (Dobrąnszki & Teixeira da Silva 2010; Chakrabarty et al. 2003; Laszloffy et al. 1992). Como reguladores de crecimiento, coinciden la mayoría de autores en cuanto al uso de 6-benciladenina (BA) como la citoquinina más adecuada para el establecimiento y multiplicación de estos frutales, con ciertas diferencias en cuanto a las concentraciones utilizadas para los distintos cultivares tanto de manzano como peral y, aunque no se haya establecido el rango de las concentraciones óptimas para el crecimiento y multiplicación de los brotes, estos valores dependen del genotipo de cada cultivar dentro de cada género (Dobrąnszki et al. 2000ab; Yepes et al. 1994). Las auxinas también juegan un papel importante en el establecimiento en cultivo in vitro, debido a que están implicadas directamente en los procesos de división y crecimiento celular, teniendo una acción complementaria con las diferentes citoquininas. La auxina más usada en la micropropagación de los frutales con frutas de hueso y de pepita, es el ácido 3-indolbutírico (AIB) utilizado a distintas concentraciones en función del genotipo de la planta. Existen numerosos trabajos sobre el uso combinado de alguna auxina tanto en cultivares de *Pyrus* (Caboni et al. 2002; Kadota & Niimi 2004; Palombi et al. 2007; Poudyal et al. 2008; Tang et al. 2008) como en *Malus* (Boudabous et al. 2010; Xu et al. 2008).

1.6.1 Saneamiento Vegetal

La globalización actual de los mercados, asociados a métodos de propagación vegetativa en especies leñosas, acentuaron la proliferación de enfermedades por patógenos (virus, fitoplasmas, bacterias y hongos) causando graves pérdidas en los cultivos y grandes daños económicos para todos los países. Para evitar estas pérdidas económicas y la expansión de estos patógenos a través del libre comercio entre países de la Unión Europea, se establecieron una serie de barreras y leyes fitosanitarias a nivel mundial (EPPO 1999). La obtención de material sano, en el caso de los frutales de manzano y peral propagados vegetativamente, se hace más compleja debido a que la transmisión de las principales enfermedades que afectan a la productividad está causada por virus que se transmiten mediante injerto y poda, a diferencia de otras enfermedades causadas por hongos y bacterias, siendo por tanto muy difícil su control mediante la aplicación de productos químicos (Wang MR et al. 2016). Para realizar nuevas

plantaciones con material libre de patógenos, es necesario el uso de técnicas biotecnológicas para su saneamiento previo. Utilizando la metodología del cultivo in vitro existen diversas técnicas especializadas para la erradicación de virus como es el cultivo de meristemos (Laimer & Barba 2011; Li et al. 2016; Plopa & Preda 2013), la termoterapia o tratamiento con calor seguido de cultivo de meristemos (Laimer & Barba 2011; Paprstein et al. 2008; Tan et al. 2010; Wang L et al. 2006), el microinjerto (Conejero et al. 2013; Dobránszki & Teixeira da Silva 2010; Huang & Millikan 1980; Laimer & Barba 2011), la quimioterapia (Hansen & Lane 1985; James et al. 1997; O'Herlihy et al. 2003; Sedlák et al. 2011) y la crioterapia (Li et al. 2016). Mediante la aplicación de alguna de estas técnicas se puede lograr el crecimiento y desarrollo de plantas libres de virus.

1.6.2 Termoterapia y Cultivo de meristemos

La técnica de terapia con calor aplicada a las plantas se viene utilizando en campo, sobre todo en frutales, desde hace años demostrando ser un tratamiento muy eficaz debido a que los virus son sensibles a las temperaturas elevadas que ralentizan o paralizan su multiplicación (Kassani 1965). Esta técnica de termoterapia también se ha podido emplear en material cultivado in vitro. Para su aplicación hay que tener en cuenta la diferente sensibilidad de los virus a temperaturas elevadas y a la resistencia del huésped (Campbell 1968; Paprstein et al. 2008; Verma et al. 2005). El tratamiento térmico se realiza colocando las plantas, antes o cuando ya están establecidas in vitro, a temperaturas de entre 35°C-54°C (Panattoni et al. 2013) durante un periodo prolongado de días según la tolerancia fisiológica de las plantas tratadas, (Tan et al. 2010), reduciendo así, o ralentizando, el proceso de multiplicación de los virus. Después de estos periodos de calor, se aísla el meristemo apical, teóricamente libre de virus, y se transfiere a un medio mineral de cultivo con nutrientes y presencia de reguladores de crecimiento en concentraciones adecuadas, siempre en condiciones estériles.

El cultivo de meristemos desde que Morel y Martin en 1952 consiguieran regenerar clones sanos de dalia a partir de plantas infectadas con virus, se realiza aislando de la yema terminal de un brote, el extremo o meristemo apical de menos de

0.2 mm de longitud con, a lo sumo, un par de primordios de hojas. Debido a que la distribución de los virus se realiza principalmente a través del xilema o del floema, la ausencia de tejidos vasculares en el meristemo aumenta las posibilidades que las células que lo forman estén libres de virus. El aislamiento del meristemo se hace siempre en condiciones estériles bajo lupa binocular (Grout 1990) con uso de bisturís especiales y se cultiva en un medio de cultivo adecuado con presencia de fitohormonas. Sin embargo, el tamaño del meristemo y, sobre todo, la presencia de uno o dos primordios de hojas es crítico para la supervivencia en este proceso de erradicación de virus (Papstein et al. 2008). Por lo tanto, el método de termoterapia con calor seguida del cultivo de meristemos de las yemas terminales, ha resultado ser una combinación eficaz para conseguir erradicar la presencia de virus y lograr multiplicar, vegetativamente, plantas libres de virus (Cieślińska 2002; Hansen & Lane 1985; Knapp et al. 1995; Manganaris et al. 2003; Wang et al. 2006) aunque la larga duración del proceso y la baja supervivencia a altas temperaturas influyan negativamente en la tasa final de éxito.

1.7 Virus

La mayoría de los virus presentes en las plantas son patógenos causantes de enfermedades que se traduce en una alteración del metabolismo de la planta, menor productividad, síntomas de daño visibles, y por último la muerte, aparte de ser focos de infección para nuevas plantas. En el caso de los frutales de pepita, como manzano y peral, predominan algunos virus que son comunes a la familia de las rosáceas. Así, el virus de la mancha clorótica de la hoja del manzano (ACLSV; Betaflexiviridae género *Trichovirus*), y el virus del mosaico del manzano (ApMV; Bromoviridae género *Ilarvirus*) son virus ampliamente distribuidos por todo el mundo, comunes en la familia de las rosáceas que afectan a manzana, pera, membrillo, cereza, melocotón, ciruela y albaricoque (Lister 1970; Nemeth 1986). La presencia de ACLSV fue manifestada por primera vez en *Malus* spp en 1959 (Mink & Shay 1959) y es uno de los virus más importantes que causan daños en este cultivo; su tasa de infección puede ser entre el 80 y 100% en manzanas comerciales, con pérdidas de rendimiento de entre el 30 y el 40% (Cembali et al. 2003). En campo, es difícil observar en ocasiones plantas infectadas por ACLSV, debido a la infección latente del virus con ausencia de síntomas visibles y al

aspecto aparentemente saludable e incluso el alto rendimiento en plantas madre de élite (Watpade et al. 2012). El modo de propagación de este virus es desconocido, aunque se ha detectado la propagación en condiciones de campo (Ji et al. 2013; Wang et al. 2010).

El ApMV fue descrito por primera vez por White (1928) y Bradford & Joley (1933). Este virus a menudo se encuentra en infecciones mixtas, junto con el virus de la mancha clorótica de la hoja del manzano (ACLSV), con el virus del vástago del manzano (ASPV), el virus del ranurado del vástago del manzano (ASGV) y otros virus infectantes de manzano y peral (Petrzik & Lenz 2011). El ApMV reduce el crecimiento de los árboles y el rendimiento de la fruta, así como su calidad (Posnette & Cropley 1956, 1959), teniendo una incidencia mayor en árboles frutales viejos (Svoboda & Polák 2010). Los síntomas por ApMV son variables en diferentes plantas huésped y aunque en la mayoría de frutos de pomo son asintomáticos después de la infección, las variedades sensibles de manzano reaccionan a la presencia de virus mostrando diferentes síntomas foliares, (Svoboda & Polák 2010). En el caso del manzano y de peral, las hojas desarrollan un color amarillo con manchas irregulares (**Fig. 1.5**); estas lesiones pueden ser erráticas por el cambio de temperatura o por la distribución desigual de los virus (Posnette & Cropley 1956) dentro de la planta. La transmisión de este virus puede ser causada por injerto, utilizando material vegetal infectado para propagación, o bien por inoculación mecánica con utensilios (Fulton 1972).

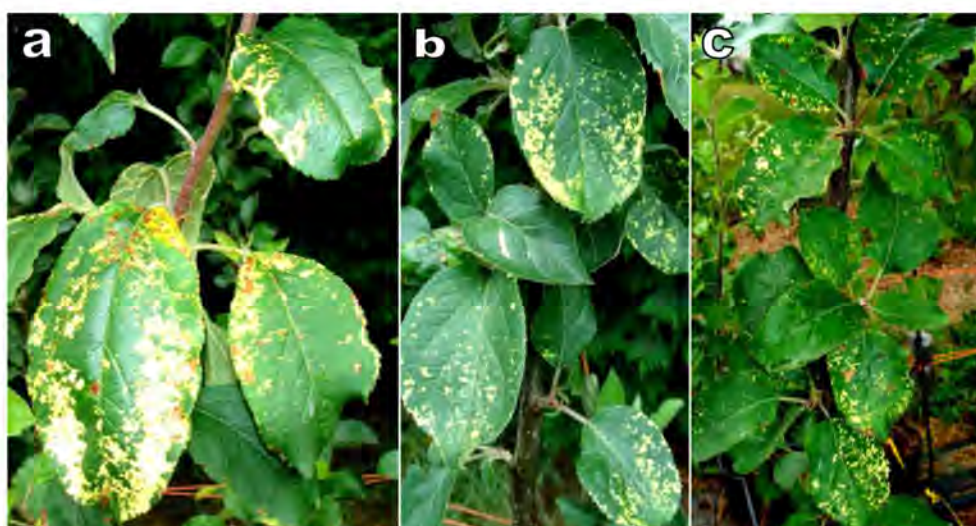


Figura 1.5 a, b, c) Plantas de distintos cultivares de manzano, infectadas con el virus ApMV mostrando los característicos síntomas de manchas irregulares y puntos amarillos.

Existe poca información sobre la propagación de ApMV en campo, debido a que no se conocen vectores naturales para este virus, sin embargo, otras especies de virus del género *Ilarvirus* son comúnmente transmitidas en asociación con trips (Jones 2005).

Hoy en día se utilizan varios métodos para la detección de virus. Algunos son métodos tradicionales como la inoculación del virus o del agente infeccioso a una especie huésped original o a una planta herbácea indicadora, sensible a los virus, para la identificación rápida de la presencia del virus por los síntomas producidos en ellas; en laboratorio, para identificar morfológicamente un virus, se ha utilizado la microscopía electrónica unida a técnicas serológicas (ISEM) con antisueros monoclonales y técnicas serológicas de ácido nucleicos (Hull 2002). Uno de los métodos más comunes dentro de las técnicas serológicas, está el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y dentro de este método el más usado para la detección de virus hoy en día es el DAS-ELISA o doble anticuerpo sándwich (Clark & Adams 1977; Thresh et al. 1977). Generalmente la intensidad y la velocidad del cambio de color en los pocillos de las placas de lectura con las muestras son un indicativo del título de virus (Clark & Adams 1977). Otro método conocido y utilizado respecto al diagnóstico de virus es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), descubierta por Kary Mullis en 1983, técnica muy usada por su alta especificidad y aplicación, que trata de producir muchas copias a partir de una región de ADN provocando su desnaturalización, separando las hebras de ADN por calor para su posterior alineamiento, dejando luego que la reacción se enfríe para que los cebadores puedan unirse a sus secuencias complementarias en el molde de ADN y por último se realice la amplificación cuando la enzima ADN polimerasa extienda los cebadores sintetizando así nuevas cadenas de ADN. Este proceso se realiza durante varios ciclos (Madigan et al. 1997).

La reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR, *Reverse transcription polymerase chain reaction*), es una variante de la PCR convencional. La amplificación exponencial mediante PCR en transcripción reversa supone una técnica altamente sensible, que puede detectar un número de copias de ARN muy bajo. Los principales usos de la RT-PCR están relacionados con el campo del diagnóstico molecular y con la investigación científica. Puede utilizarse como método de detección molecular de genes, para estudiar el genoma de virus ARN como son

muchos de los virus de plantas. Dado que la mayoría de los virus de las plantas son ARN monocatenarios, esta técnica retrotranscribe una hebra de ARN en ADN complementario (ADNc) usando la enzima transcriptasa inversa; la fase RT, de retrotranscripción, debe realizarse antes de la PCR. Este es un método de detección basado en la amplificación de regiones específicas del genoma viral (Foster & Taylor 1998).

1.8 Bacterias Endófitas

Las superficies de las plantas son hábitats para gran cantidad de microorganismos (Campbell 1985), que pueden entrar en los tejidos de las plantas por las rizosfera de la planta o a través de heridas, mediante vectores, herramientas, etc. (Tarr 1972), provocando muchas veces enfermedades o desarrollando, a lo largo del tiempo, incluso durante la evolución de la especie, un microbioma propio o conjunto de microorganismos endófitos inter o intracelulares que conviven con la planta huésped, junto a los epífitos de su exterior.

Durante los últimos años, el término endófito ha aparecido cada vez con más frecuencia en investigaciones científicas. Dentro de los microorganismos endófitos o endofíticos un grupo importante son las bacterias endófitas, que son habituales en numerosas especies de plantas, conviviendo en su interior de forma simbiótica sin causarles daño y que, en algunos casos, ejercen efectos beneficiosos sobre sus huéspedes (Lodewyckx et al. 2002). Sin embargo, algunas endófitas pueden ser saprófitas y estar latentes hasta que la planta se muere o llegar a ser patógenas para las plantas bajo ciertas condiciones (James & Olivares 1997) e incluso causar la muerte de la planta. Dentro del microbioma del interior de la planta, existen diferentes especies bacterianas que son capaces de interactuar y establecer un equilibrio entre ellas (Fisher et al. 1992), aunque algunas de estas especies pueden ser dominantes (Van Peer et al. 1990) debido a que permanecen en el huésped con mayor frecuencia y en mayor número. Generalmente se observa una mayor concentración de poblaciones bacterianas en las raíces de las plantas frente a las partes aéreas de las plantas como hojas y tallos (Quadt-Hallman & Kloepper 1996). Este hecho se debe a que las raíces son la principal entrada en las plantas de estos endófitos que viven en el suelo o en el agua, colonizando

la superficie de la raíz antes de entrar en la planta o bien a través de heridas que se producen de forma natural, o no, (Sprent & de Faria 1988) e incluso en los puntos de emergencia de las raíces laterales en donde los tejidos no están completamente diferenciados facilitando de esta manera la penetración bacteriana (Reinhold-Hurek & Hurek 2011). Las bacterias también pueden entrar en las plantas a través de los estomas en las hojas, en flores, tallos y cotiledones, colonizando al final toda la planta (Compant et al. 2008) y trasladándose por su interior a través del xilema. El microbioma bacteriano endofítico promueve el crecimiento de las plantas y los efectos beneficiosos son, en muchos casos, mediados y caracterizados por interacciones metabólicas. Recientemente se han realizado avances en relación con la producción de diferentes tipos de metabolitos por los microbiontes de plantas. Estas sustancias desempeñan un papel en la competencia y en la defensa de la planta contra otros microorganismos, pero también pueden ser sustancias, o señales, necesarias para la interacción específica y la comunicación con el huésped.

La contaminación externa más frecuente detectada en los cultivos *in vitro* cuando se inicia el establecimiento de una especie, está causada por hongos, levaduras y bacterias, aunque existen otras menos frecuentes como las causadas por ácaros y trips (George 1993; Leifert et al. 1994). Esto se debe normalmente a una esterilización superficial insuficiente de los explantos, de los instrumentos accesorios, de los medios de cultivo o bien ser una contaminación por mala manipulación del material vegetal (Leifert et al. 1991a) o por exceso de contaminación en campo. Un tema muy distinto es la contaminación por bacterias endófitas, que habitan en el interior de las plantas, que suelen ser simbióticas, que no se eliminan por desinfección superficial de los explantos y cuyo conjunto conforma el microbioma interno de la planta.

En general, las bacterias son los contaminantes más comunes en el cultivo *in vitro* (George 1993; Leifert et al. 1994; Pérez 1998), y a menudo se puede detectar visualmente. En algunos casos, las bacterias no son visibles durante el cultivo debido a que son internas o endófitas y no cultivables, y son difícil de eliminar (Leifert et al. 1991b) porque se dispersan a través del xilema o floema (Cassells 1988; Deberegh & Zimmerman 1991) de manera que viven allí y se siguen propagando junto con el material vegetal *in vitro*. La presencia de bacterias endófitas en cultivo *in vitro* ha sido

ampliamente mostrado desde hace tiempo en numerosos trabajos (Abreu-Tarazi et al. 2010; Almeida et al. 2009; Días et al. 2009; Donnarumma et al. 2011; Marino & Gaggia 2015; Zaspel et al. 2008) debido a que ocasionan graves problemas, ya que compiten con los explantos por los nutrientes y componentes del medio causando daños directos o indirectos en los cultivos (Leifert et al. 1994). Estas bacterias endófitas se pueden manifestar, o no, en la fase de establecimiento, debido al efecto de ciertos factores como son el pH y algunas hormonas añadidas a los medios de cultivo que pueden inhibir su crecimiento. Por ello requieren un tiempo de adaptación a estas nuevas condiciones antes de expresarse en el medio de cultivo hecho que, por lo general, ocurre más en la etapa de multiplicación in vitro (Madoff & Lawson 1992; Pérez 1998), o bien pueden permanecer sin expresarse en los medios durante largos periodos de tiempo (George 1993). No todos los microorganismos endófitos se hacen patentes en los medios de cultivo como muchas de las bacterias ya descritas. Algunos son no cultivables (Dinsdale et al. 2008) como los fitoplasmas y únicamente se conocerá su existencia mediante el análisis del ADN de todo el microbioma de la planta. Los microorganismos endófitos desarrollan parte de su ciclo de vida en el interior de la planta sin causar síntomas en ella (Reinhold-Hurek & Hurek 1998). También se ha demostrado que las bacterias endófitas pueden tener un impacto importante en la productividad de los cultivos de interés agronómico porque estimulan mecanismos como la producción de hormonas que incide en el crecimiento de la planta (Hallmann et al. 1997; Sharma & Nowak 1998), intervienen en el antagonismo de patógenos (Krechel et al. 2002; Sturz et al. 1999; Wilhelm et al. 1997) o bien en la fijación de nitrógeno. Sin embargo, las bacterias fijadoras de nitrógeno no son el único grupo que puede colonizar el tejido interno de la planta, pero sí ha sido el principal grupo fisiológico estudiado dentro de la flora endofítica (Rodríguez et al. 2008). Diversos patógenos bacterianos oportunistas como *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Staphylococcus* y *Stenotrophomonas* han sido identificados como colonizadores de la rizosfera vegetal (Berg et al. 2005). Muchos endófitos facultativos son reclutados de la gran reserva del microbioma del suelo y especies rizosféricas y así las bacterias adaptadas para vivir en planta pueden incluir patógenos humanos o patógenos animales oportunistas. Algunas bacterias asociadas con infecciones humanas han sido aisladas del interior de la alfalfa (Ponka et al. 1995). Esta área necesita más investigación para

establecer los riesgos, si los hay, asociados con el desarrollo del nicho endofítico para aplicaciones biotecnológicas y los patógenos emergentes.

La identificación de bacterias endófitas en las plantas, constituye una herramienta importante para poder conocerlas, controlarlas o combatirlas, aunque muchas de estas asociaciones pueden y suelen ser beneficiosas y desempeñar un papel relevante en las plantas. Para la detección bacteriana en el cultivo *in vitro* es necesario disponer de un método simple, fiable, sensible y específico como es la técnica de secuenciación del ARN 16S y la metagenómica.

La amplificación del AND ribosómico 16S se utiliza para el estudio filogenético de las bacterias. Pueden emplearse enfoques moleculares basados en la amplificación del ADNr 16S para superar las limitaciones de los procedimientos de aislamiento clásicos que dependen del aislamiento de bacterias. Después de aislar el ADN total de la planta o de partes de plantas específicas, tales como raíces, fluido vascular u hojas, se emplean cebadores oligonucleotídicos para hibridarse en sitios conservados en el ADN y amplificar específicamente los genes 16S de ARNr bacterianos (Weisburg et al. 1991). El ADNr 16S amplificado con PCR puede clonarse y analizarse adicionalmente mediante secuenciación con el fin de identificar las bacterias.

En la actualidad la mayor parte de bacterias de interés pueden identificarse mediante técnicas microbiológicas convencionales, que requieren un aislado previo, cultivo y purificación, para luego ser identificadas mediante características fenotípicas. Sin embargo, en algunos casos la identificación fenotípica resulta difícil, confusa e incluso imposible. En estos casos la identificación molecular basada en el análisis del ARNr 16S representa una ventaja tanto en tiempo como en precisión. El ARN ribosómico es un polirribonucleótido de aproximadamente 1.500 nucleótidos, codificado por el gen *rrs* siendo la macromolécula más utilizada en los estudios de filogenia y taxonomía bacteriana. La identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S incluye tres etapas: a) amplificación del gen a partir de una muestra apropiada; b) determinación de la secuencia de nucleótidos y c) análisis de la secuencia. Finalmente se compara la secuencia del ARNr 16S obtenida con la secuencia depositada en bases de datos. Con esta técnica se puede mejorar el resultado de la identificación de cepas bacterianas, como mínimo a nivel de género, y muchas veces a nivel de especie

en algunos géneros bacterianos. Además, es el método imprescindible para la descripción de la cepa tipo de una nueva especie procariota (Stackebrandt et al. 2002).

1.8.1 Antibióticos

Los antibióticos son sustancias químicas de naturaleza muy diversa producidas por un ser vivo o bien derivados sintéticos de ella, capaces de inhibir el crecimiento bacteriano (bacteriostáticos) o causar su muerte (bactericida). El mecanismo de acción difiere entre las distintas familias de antibióticos siendo su actividad contra ellos dependiente de la propia naturaleza de la bacteria, de si son Gram-positivas o Gram-negativas y de la propia composición de su superficie. Muchas bacterias, sean o no patógenas, presentan resistencia o han desarrollado mecanismos de resistencia a agentes antimicrobianos, debido a que los patrones de resistencia cambian de forma constante por circunstancias ambientales o a través de mutaciones del propio genoma bacteriano. Por ello es necesario estudiar con frecuencia la sensibilidad individual de cada patógeno a diferentes antibióticos, para poder elegir el más activo contra el patógeno, el menos tóxico para el huésped, el que nos proporcione resultados más favorables y establecer las dosis efectivas. En el caso de bacterias endófitas, no patógenas, el uso de antibióticos en el medio de cultivo se utiliza únicamente para controlar su crecimiento, aunque aún no se conoce en profundidad todos los cambios que pueden ocasionar en la planta la eliminación o inactivación de este microbioma.

1.8.2 Antibiograma

El antibiograma es una prueba microbiológica que se realiza para determinar la susceptibilidad de una colonia bacteriana a un antibiótico o grupo de antibióticos y que permite definir para cada antibiótico, si la bacteria es sensible (antibiótico eficaz), o resistente (antibiótico ineficaz). Por tanto, el antibiograma permite medir la capacidad de un antibiótico a inhibir el crecimiento bacteriano haciendo posible evaluar la eficacia de un antibiótico sobre una determinada bacteria. Los antibiogramas se realizan en cultivos bacterianos puros, que nos permitan obtener resultados fiables sobre la eficacia de un antibiótico. También es importante determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) que corresponde a la menor concentración de una gama de diluciones

de antibióticos capaz de para inhibir el crecimiento bacteriano de forma visible después de su incubación. Esta técnica nos permite establecer categorías de cepas bacterianas en función de su sensibilidad frente al antibiótico probado. Una cepa bacteriana puede ser sensible, resistente o de resistencia intermedia a un determinado antibiótico. Esta prueba de sensibilidad, mejorada por Bauer et al. (1966), se realiza colocando pequeños discos de papel de filtro especial con una dilución determinada de antibiótico sobre una placa con cultivo de bacterias puras sembradas de forma uniforme o césped, que nos permiten ensayar un gran número de pruebas diferentes. A pesar de ser una técnica cualitativa el método del antibiograma de difusión en agar (o método Kirby-Bauer) fue estandarizado y correlacionado con las CMI y aún es el más utilizado en todo el mundo.

1.8.3 Metagenómica

El estudio del material genético obtenido de la microbiota de las muestras de todos los microorganismos y su entorno natural, que lo constituye en este caso la planta completa con la que convive, configura una nueva rama de la ciencia que está experimentando un espectacular desarrollo y de la que se espera conocer más acerca de cómo el microbioma interactúa con la planta y de las interacciones entre ellas. Aunque las técnicas de secuenciación de ADN, la metagenómica, han permitido una nueva visión de la localización y diversidad de los microorganismos que puedan habitar en las plantas, no explican ni aclaran nada sobre la función y dinámica de la comunidad.

La técnica de metagenómica nos permite secuenciar todo el genoma existente de forma global de las comunidades microbianas o microbiota en su entorno natural, que en el caso del sistema interno dentro de la planta, mediante el análisis del ADN extraído de la planta que contiene el de toda la población endófito y determinar así su contenido genético, evitando la necesidad del aislamiento y cultivo de los distintos microorganismos endófitos (Streit & Schmitz 2004) así como poder determinar también aquellos endófitos no cultivables (Dinsdale et al. 2008). La metagenómica nos ofrece la posibilidad de secuenciar directamente los genomas de microbios, sin necesidad de cultivarlos abre nuevas posibilidades que suponen un cambio de rumbo en la microbiología. Este hecho es una revolución científica debido a su alto rendimiento y el

bajo coste. Permite acceder al genoma sin ver a los microorganismos ni cultivarlos constituyendo una valiosa herramienta para la identificación, caracterización de los microorganismos endófitos y epífitos que nos permite entender mejor la interacción entre microorganismo con la planta huésped, así como su potencial beneficio para la planta. En esta interacción planta-microbio, las plantas son capaces de favorecer el crecimiento de estos microorganismos que son beneficiosos para su crecimiento e incluso necesarios para la supervivencia. Muchos de estos microorganismos endófitos favorecen la disponibilidad de nutrientes necesario para el crecimiento de la planta y también, de manera muy eficaz, pueden defender a su huésped del ataque de otros microorganismos patógenos o bien inhibir su crecimiento. Sin embargo, se necesitan más investigaciones que nos ayude a comprender mejor esta interacción, ya que estos microorganismos asociados a las plantas pueden ser considerados como factores clave para la salud de las plantas, la productividad, la composición de la comunidad y el funcionamiento de los ecosistemas.

OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

2. OBJETIVOS

El objetivo del presente proyecto de tesis doctoral fue conseguir la erradicación de los virus ApMV y ACLSV, de cultivares de frutales tradicionales de Galicia, ocho de manzano y dos de peral, a fin de conseguir la micropropagación y aclimatación de plantas testadas libres de virus en condiciones ambiente.

Los objetivos específicos de este estudio fueron:

- I. Conseguir el establecimiento in vitro, multiplicación y enraízamiento, de ocho cultivares seleccionados de manzano ‘Cacharela’, ‘Camoesa’, ‘Gravillán’, ‘José Antonio’, ‘Ollou Mouro’, ‘Príncipe Grande’, ‘Repinaldo’ y ‘Tres en Cunca’ y de dos cultivares de peral ‘Barburiña’ y ‘Manteca Oscura’ de máximo interés para Galicia, estableciendo los protocolos de cada paso para cada cultivar.

- II. Sanear y recuperar el material vegetal establecido in vitro de manzano y peral, con la erradicación de los principales virus que les afectan a todos los cultivares: *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) y *Apple mosaic virus* (ApMV), estableciendo un método eficaz de termoterapia combinada con el cultivo de ápices meristemáticos. Comprobar mediante técnicas de DAS-ELISA y RT-PCR la ausencia de dichos virus de los brotes obtenidos a partir del cultivo de los meristemas aislados que fueron sometidos a termoterapia.

- III. Conseguir la micropropagación de todos los cultivares de manzano y peral testados libres de virus y su aclimatación a las condiciones ambiente después de su enraízamiento y paso a tierra.

- IV. Identificar las principales bacterias endófitas componentes del microbioma interno existente en cada uno de los ocho cultivares de manzano y los dos de peral cultivados in vitro, mediante análisis metagenómico.

2.1 Justificación

En la comunidad autónoma de Galicia ha disminuido en campo el número de muchos de los frutales tradicionales de *Pyrus* y *Malus*, muy apreciados por sus características organolépticas. Debido al abandono de la agricultura tradicional y como consecuencia de las malas prácticas agrícolas, estos cultivares de manzano y peral, se encuentran en condiciones fitosanitarias muy precarias incluso en los bancos de germoplasma donde están registrados y almacenados.

Mediante la ayuda de métodos biotecnológicos como el cultivo in vitro, el aislamiento de meristemos apicales y la aplicación de termoterapia se puede sanear y recuperar los distintos cultivares de manzano y peral, de las principales enfermedades víricas que les afectan, causadas por los virus *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) y *Apple mosaic virus* (ApMV). De esta manera se pueden lograr cultivares saneados, en buenas condiciones fitosanitarias aptos, según la normativa vigente de la EPPO para su comercialización y para la conservación de su germoplasma a largo plazo.

Se ha querido dar el primer paso que nos lleve al conocimiento del microbioma que convive con estos cultivares y que abre nuevas vías de conocimiento en la interrelación huésped–microorganismos endófitos que existe entre los distintos cultivares de manzano y peral con su microbioma.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

Como material vegetal de partida se utilizaron estaquillas anuales con yemas axilares en dormición de dos cultivares de peral (**Fig. 3.1**) ‘Barburiña’ y ‘Manteca Oscura’, y de ocho cultivares de manzano (**Fig. 3.2 y 3.3**) ‘Cacharela’, ‘Camoesa’, ‘Gravillán’, ‘José Antonio’, ‘Ollo Mouro’, ‘Príncipe Grande’, ‘Repinaldo’ y ‘Tres en Cunca’, todos caracterizados genéticamente, pertenecientes al Banco de Germoplasma del Centro Investigaciones Agrarias de Mabegondo (CIAM).

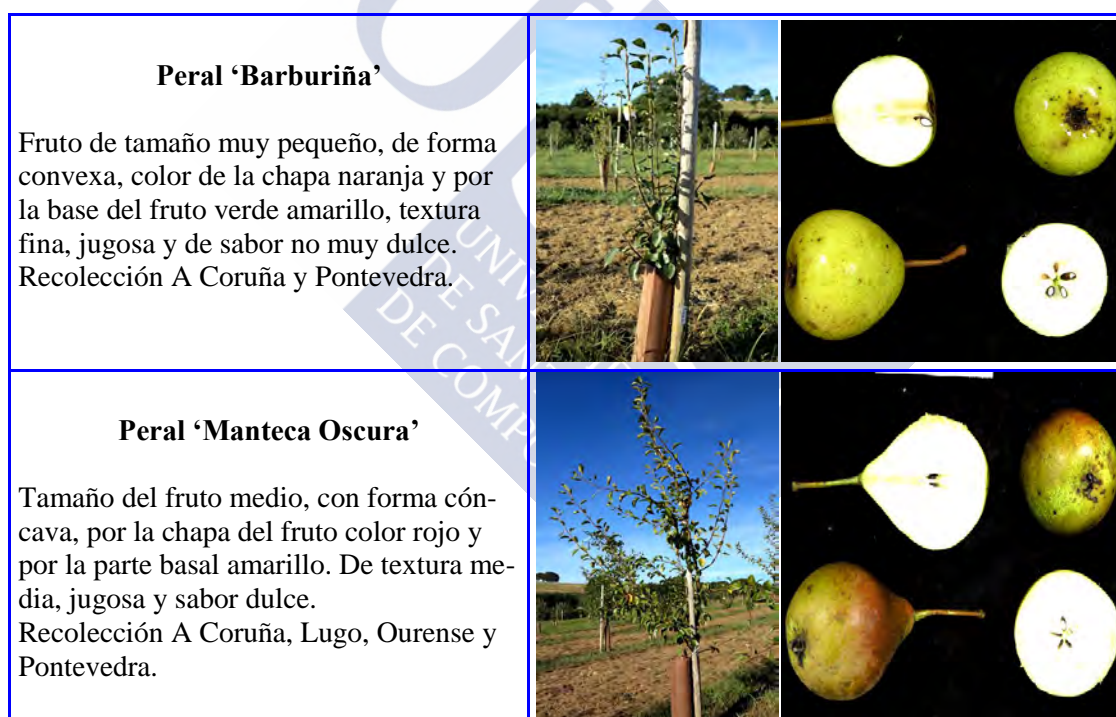


Figura 3.1 Cultivares de peral caracterizados genéticamente y pertenecientes al Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo. Fotos de ambos perales cedidas por el Dr. Santiago Pereira Lorenzo.

<p align="center">Manzano ‘Cacharela’</p> <p>Fruto de color amarillo de tamaño medio con forma oblonga cónica, color de pulpa crema de textura crocante y jugosidad intermedia. De sabor débil y con poco aroma. Recolección en A Coruña</p>		
<p align="center">Manzano ‘Camoesa’</p> <p>Fruto de tamaño grande, con forma plana globosa de color amarillo, color de pulpa blanca crema, medianamente jugosa, de textura intermedia, con sabor ácido-dulce y con poco aroma. Destino mesa. Recolección Pontevedra.</p>		
<p align="center">Manzano ‘Gravillán’</p> <p>Fruto tamaño grande de color amarillo, de forma plana globosa, color de pulpa amarilla crema, de textura y jugosidad intermedia, sabor del fruto ácido bajo y aromática. Destino mixto. Recolección Ourense.</p>		
<p align="center">Manzano ‘José Antonio’</p> <p>Fruto bicolor de tamaño medio con forma plana globosa, color de pulpa blanca amarilla, con una textura y jugosidad intermedia. Sabor ácido medio y dulce medio, aromática. Destino mesa. Recolección A Coruña.</p>		

Figura 3.2 Cultivares de manzano tradicionales de Galicia, caracterizados genéticamente y pertenecientes al Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo.

<p align="center">Manzano ‘Ollo Mouro’</p> <p>Fruto de color amarillo de tamaño medio con forma plana globosa, color de pulpa amarilla de textura y jugosidad intermedia, aromática y de sabor débil. Recolección A Coruña.</p>		
<p align="center">Manzano ‘Príncipe Grande’</p> <p>Fruto de tamaño grande, bicolor de forma plana globosa, color de pulpa blanca de textura intermedia, jugosa con sabor ácido dulce y con poco aroma. Destino mixto. Recolección A Coruña.</p>		
<p align="center">Manzano ‘Repinaldo’</p> <p>Fruto color amarillo con un tamaño medio, con forma globosa cónica, color de pulpa crema-amarilla, de textura harinosa y medianamente jugosa con sabor ácido - dulce y aromática. Destino mesa. Recolección Lugo.</p>		
<p align="center">Manzano ‘Tres en Cunca’</p> <p>Fruto de tamaño grande con forma plana globosa, de color amarillo, color de pulpa blanca de textura y jugosidad intermedia, sabor ácido dulce y aromático. Destino mesa. Recolección A Coruña</p>		

Figura 3.3 Cultivares de manzano tradicionales de Galicia, caracterizados genéticamente y pertenecientes al Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo.

La recolección del material vegetal, a partir del cual se inició el establecimiento en cultivo *in vitro*, se llevó a cabo durante el invierno de los años 2012, 2013 y 2014, entre los meses de enero y febrero. La recolección se hizo atendiendo a su ciclo vegetativo, ya que el estado de reposo del crecimiento de los frutales de ambas especies coincide en dicho periodo (Torres et al. 1998). Únicamente se recolectaron aquellas ramas del año bien desarrolladas, evitando coger estaquillas más antiguas o deterioradas, con el fin de poder iniciar los cultivos con material lo más joven y sano posible (Moutia et al. 1999). Según el estado vegetativo del árbol se recolectaron un número variable de estaquillas de cada cultivar, intentando coger aquellas con una longitud entre los 20 y 40 cm con, al menos 4-6 yemas nodales, a fin de facilitar su almacenamiento y posterior manipulación. Durante el proceso de la recolección, todas las estaquillas fueron debidamente etiquetadas y empaquetadas para su traslado al laboratorio. La desinfección superficial del material vegetal se hizo, en laboratorio, bajo agua corriente con un cepillo suave, teniendo cuidado especial en no dañar las yemas, pero procurando eliminar la mayor parte de los diversos microorganismos o agentes contaminantes que llevaban en su superficie externa. La base de corte de las estaquillas fue parafinada, para evitar posibles agresiones de patógenos, la entrada de fungicida por los vasos del xilema y la desecación de la estaquilla. Como control preventivo para eliminar los hongos y evitar su crecimiento durante el almacenamiento, se sumergieron las estaquillas durante 20 minutos en bandejas con una solución acuosa al 8% de fungicida Capluq-50 (Luqsa[®]), eliminando gran parte de ellos e inhibiendo de esta manera la posible germinación de esporas. Una vez bien secas las estaquillas y debidamente etiquetadas con el nombre del cultivar y fecha de recolección, se empaquetaron con film plástico y finalmente se almacenaron durante un mes en una cámara fría, a una temperatura de 4°C. Transcurrido ese tiempo y para poder inducir la brotación de las estaquillas seleccionadas, se retiraron de la cámara fría, se les cortó la zona basal parafinada y se pusieron en un frasco con agua destilada en un fitotrón a 24°C día y 18°C noche, una intensidad luminosa de 40 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y con un fotoperiodo de 16 horas hasta su brotación (**Fig. 3.4**).

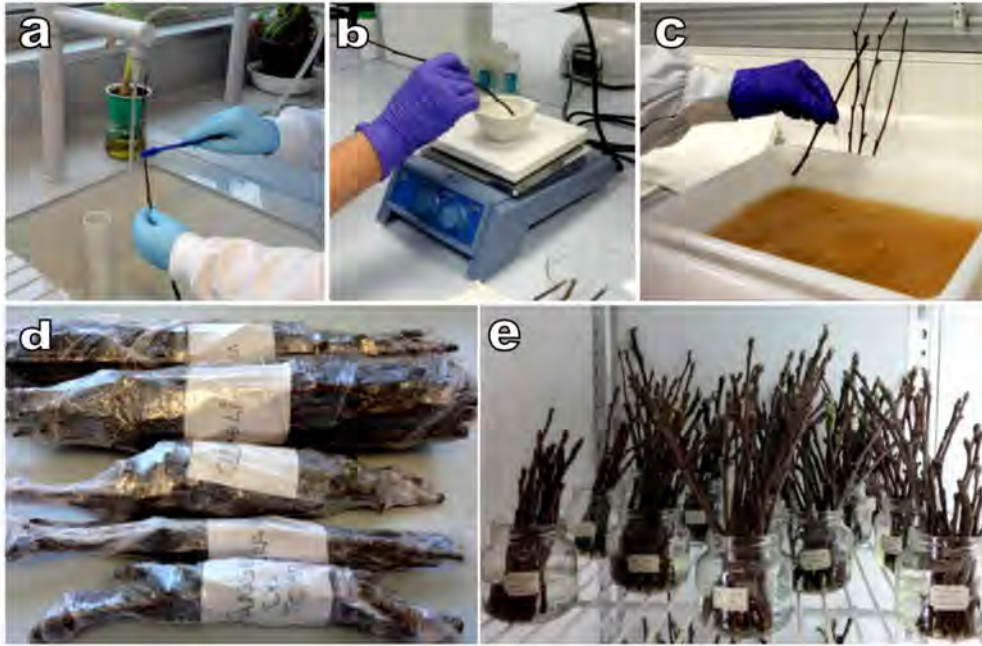


Figura 3.4 a) Desinfección superficial bajo agua corriente de estaquillas de manzano y peral provenientes de campo b) Parafinado de la zona de corte de las estaquillas. c) Desinfección con fungicida Capluq-50 d) Estaquillas almacenadas en cámara fría a 4°C e) Estaquillas puestas a brotar en cámara de crecimiento a 24°C.

3.2 Establecimiento en Cultivo Aséptico

3.2.1 Esterilización del material vegetal

Una vez que las estaquillas brotaron, los nuevos brotes desarrollados, de entre 2 a 4 cm, se cortaron, parafinando la base y ya en cámara de flujo laminar (Esco Laminar flow cabinet[®]) se esterilizaron, durante 15 minutos en una solución acuosa al 10% de Domestos[®], lejía comercial con 1.5% (v/v) de hipoclorito sódico y una gota del agente humectante Tween 20[®] por cada 100 mL de solución y en agitación. Seguidamente, se realizaron tres lavados con agua destilada estéril, el primero inmediato y rápido, y otros dos de 15 minutos cada uno, también con agitación, para eliminar todo resto de cloro (Banno et al. 1989; Erig & Fortes 2002; Espinosa et al. 2006; Moraes et al. 2004). Los brotes ya esterilizados se secaron ligeramente sobre papel filtro estéril y se mantuvieron dentro del mismo envase, sin agua, hasta su utilización y puesta en cultivo (**Fig. 3.5**).

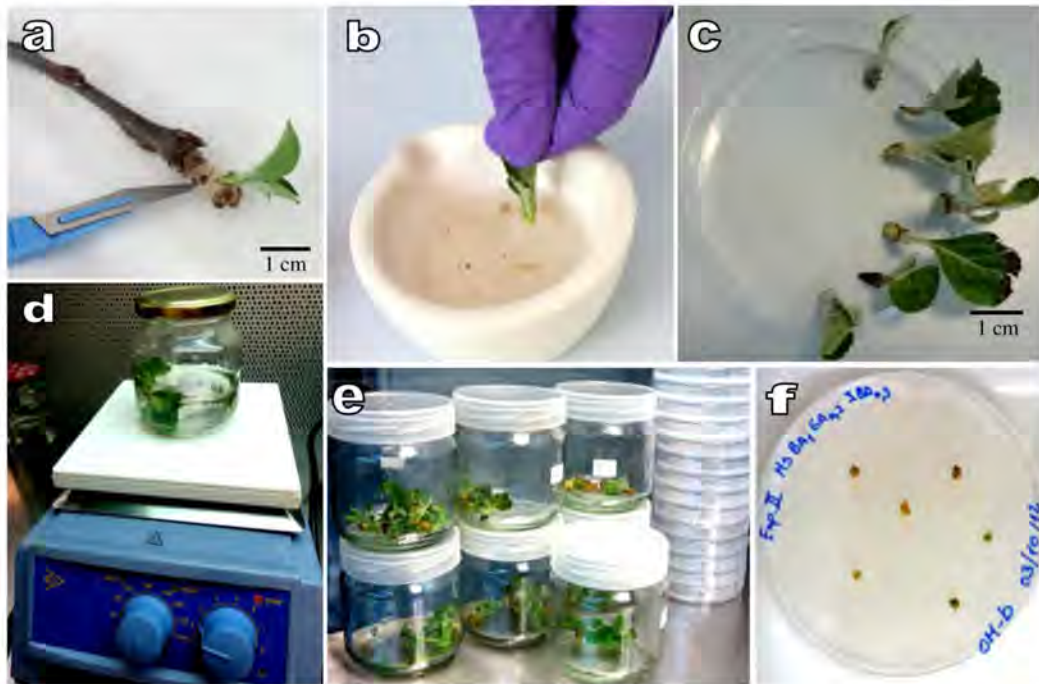


Figura 3.5 a) Corte de los brotes desarrollados. b) Parafinado de la zona basal del corte. c) Brotes parafinados. d) Esterilización de los brotes con hipoclorito sódico. e) Brotes esterilizados de los distintos cultivares de manzano y peral para su puesta en cultivo en cámara de flujo laminar. f) Ápices establecidos in vitro después de dos semanas en cultivo.

3.2.2 Medios y condiciones de cultivo

Una vez esterilizados los brotes, se procedió a su establecimiento en cultivo aséptico para lo cual se aislaron los ápices de las yemas terminales con ayuda de pinzas y bisturís estériles, suprimiendo todas las hojas expandidas y dejando, únicamente, la yema apical con solo dos hojitas ya formadas visibles bajo lupa. La longitud de estos explantos iniciales fue entre 1.0 - 1.5 mm, un tamaño pequeño con el fin de minimizar, en la medida de lo posible, el número de contaminaciones pero facilitando al mismo tiempo, con este tamaño, su supervivencia. Se colocaron varias yemas aisladas del mismo cultivar en cada placa de Petri con medio de cultivo seleccionado para el establecimiento.

Puesto que manzanos y perales son dos especies muy próximas filogenéticamente, según la bibliografía consultada (Bommineni et al. 2001; Rafail & Mosleh 2010; Sedlák et al. 2001) encontramos similitudes en la composición de los

medios de cultivo para ambas especies. Para su establecimiento utilizamos en todos los cultivares un medio basal conteniendo sales minerales MS (Murashige & Skoog 1962) incluyendo las vitaminas MS modificadas (con tiamina 10x), sacarosa (Duchefa[®]) al 3% (p/v) como fuente de carbono y micro-agar (Duchefa[®]) al 0.7% (p/v) como agente gelificante. Al medio de establecimiento, se añadieron reguladores de crecimiento, indispensables para que los cultivos reaccionen: una citoquinina, 6-Benciladenina (BA) 1 mgL⁻¹, y las auxinas ácido giberélico (GA₃) 0.2 mgL⁻¹ y ácido 3-indolbutírico (AIB) 0.3 mgL⁻¹, (Li X et al. 2002), estableciendo así las concentraciones adecuadas para la puesta en cultivo de todos los cultivares. El pH del medio fue ajustado (pH meter Basic 20, Crison[®]) a un valor de 5.8 con NaOH (1N) y/o HCl (1N), antes de ser esterilizado en autoclave (Autotester 437-G, Selecta[®]) a 121°C durante 20 minutos (George 1993), dispensando 25 mL de medio en placas Petri estériles (Sterilin[®]) de 90 mm de diámetro. Durante los primeros días del establecimiento in vitro y para evitar el crecimiento de bacterias endófitas que interfiriera con el desarrollo de los ápices, se colocó sobre el medio de cultivo de cada placa, un disco de papel de filtro estéril, libre de cloro, y sobre él se dispusieron las yemas aisladas de cada cultivar. Una vez selladas y rotuladas las placas, todos los cultivos fueron mantenidos en cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 16 horas de luz suministrada por lámparas fluorescentes *cool white* (50W Osram), con una irradiancia de 40 μmol m⁻² s⁻¹ a una temperatura de 24°C±1 día y 18°C±1 noche. Los brotes desarrollados a partir de las yemas a las cuatro semanas de su cultivo fueron transferidos a tubos de ensayo, de 15 cm longitud y 2.2 cm de diámetro conteniendo 20 mL de medio fresco de la misma composición, pero sin añadirle GA₃.

3.3 Micropropagación

3.3.1 Multiplicación de explantos y medios de cultivo

Para llevar a cabo el estudio de multiplicación, se realizaron subcultivos cada cuatro semanas de los brotes establecidos con el fin de conseguir material vegetal suficiente y uniforme para iniciar los diferentes experimentos. La multiplicación in vitro de brotes de los distintos cultivares de manzano y peral se realizó sobre medio mineral MS con vitaminas modificadas MS (tiamina 10x), sacarosa (30 gL⁻¹) solidificado con

micro-agar (7 gL^{-1}) y adicionado de citoquininas y auxinas a distintas concentraciones ajustando su pH a 5.8 antes de esterilizar, durante 20 minutos, a 121°C , en autoclave. Se utilizó siempre medio mineral MS con diferentes citoquininas BA, Zeatina, 2iP y TDZ a distintas concentraciones (0.25 , 0.5 y 1 mgL^{-1}) combinadas con AIB (0.1 mgL^{-1}) o sin AIB, empleando medio basal MS, sin reguladores de crecimiento, como control (MS0). Se utilizaron jarras de cristal de 350 mL de capacidad (8.5 cm longitud x 7.5 cm de diámetro) dispensando 50 mL de medio en cada una de las jarras. Se colocaron 6 brotes de aproximadamente 10 a 15 mm, en cada jarra y una vez tapadas y debidamente etiquetadas, fueron selladas con film plástico transparente y puestas en cámara de crecimiento con las condiciones ambientales establecidas de luz, con fotoperiodo de 16 horas y con una irradiancia luminosa de $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, y temperatura 24°C día y 18°C noche. Se realizaron tres repeticiones de cada uno de los tratamientos ($n=54$) para cada cultivar.

Para la obtención de resultados, se tomaron datos del número total de brotes, cada cuatro semanas, anotando los que presentaban un desarrollo normal y el número de brotes hiperhídricos formados por cada explanto. Para establecer el protocolo de multiplicación óptimo para cada cultivar, se tuvieron en cuenta los resultados y se seleccionó la citoquinina y la concentración de la misma, con o sin auxina, con la que se obtuvo la mayor tasa de multiplicación de brotes con aspecto normal. Como medio de multiplicación de cada cultivar se consideró aquel en el que, multiplicando bien, los explantos tenían buen crecimiento y un aspecto similar a los brotes en campo, en cuanto a forma de hojas y ausencia de brotes hiperhídricos.

3.3.2 Enraízamiento de los brotes

El material utilizado para el estudio del enraízamiento fueron los brotes de manzano y peral conseguidos en la etapa anterior de multiplicación. Para la inducción de la rizogénesis se utilizaron brotes cultivados durante cuatro semanas en medio de multiplicación específico para cada cultivar y la presencia de una auxina rizogénica, empleando dos métodos:

1. Cultivo de brotes provenientes de un medio de inducción con citoquinina y auxina (BA y AIB) pasados a medio de expresión MS0 sin reguladores o bien pasados a medio MS sin citoquinina pero con 0.1 mgL^{-1} de AIB.
2. Inmersión basal (*dipping*) de los brotes provenientes de medio de multiplicación en una solución altamente concentrada (1000X) de auxina rizogénica durante un corto periodo de tiempo, de segundos. Para este método se introdujo la base de los brotes en una solución acuosa de auxina, AIB o ANA, a concentraciones de 1 gL^{-1} y 2 gL^{-1} , durante 45 segundos en ambos casos. Tras ese tiempo de inmersión, se procedió al paso inmediato de los explantos a medio sólido basal MS con vitaminas modificadas (MS0). Este último método fue el que se utilizó para el enraizamiento del material saneado libre de virus de todos los cultivares, usando únicamente la auxina AIB a dichas concentraciones de 1 y 2 gL^{-1} .

Con ambos métodos los cultivos se mantuvieron durante cuatro semanas en las condiciones ambientales de luz y temperatura establecidas, con fotoperiodo de 16 horas y una irradiancia luminosa de $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y 24°C día y 18°C noche. El recuento de los brotes enraizados así como los datos del número de raíces formadas y longitud de la raíz más larga se realizó a las 4 semanas de su puesta en cultivo.

3.3.3 Paso a tierra y aclimatación

Los brotes enraizados, de una muestra procedente de tres repeticiones ($n=54$), después de cuatro semanas en cultivo *in vitro*, fueron transferidos a tierra. La composición del sustrato utilizado fue una mezcla de turba rubia al 60%, corteza 20%, fibra de coco 10% y turba negra 10% (Siro[®]Royal), junto con una combinación de abono de liberación lenta (Osmocote[®] exact) con 15:9:12 de nitrógeno, fósforo y potasio (NPK) respectivamente. Se preparó la mezcla y se metió en bandejas de 40 alvéolos de $5 \times 7 \text{ cm}$. Una vez llenos con sustrato los alveolos, se plantaron los brotes enraizados, previamente lavados en agua para quitar restos de agar, y se fumigaron con insecticida granulado Clorpirifos (CHAS[®]5G) al 5% p/p, para reducir la proliferación de la mosca negra (*Simuliidae*) frecuente en los invernaderos. A continuación las bandejas de alveolos con las plántulas se depositaron en cajas de poliestireno expandido (poliespan),

se regaron con agua pulverizada y se cubrieron y sellaron con film plástico transparente para permitir la entrada de luz y, al mismo tiempo, poder mantener la humedad relativa alta en el interior de las cajas. Estos alveolos fueron colocados en cámara de enraizamiento con una temperatura fija de $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ con fotoperiodo de 16 horas luz. A los 15 días en estas condiciones, se agregó un fertilizante hidrosoluble (Peters[®]) 20:20:20 de N, P, K y (Abreverd[®]) que incluyen quelatos de Fe, Mn y Zn para facilitar el desarrollo de las plantas. Al mes y medio se hizo un primer recuento de supervivencia en el paso a tierra, pasando al mismo tiempo los alveolos con las plántulas a condiciones de invernadero en túnel con un sistema “fog” de pulverización de agua, como sistema de humidificación, proyectando una fina nebulización de micro gotas que mantiene una alta humedad ambiental cercana al 100%. El túnel dispone de bancadas con malla de sombreado y una cama caliente para evitar las bajadas de temperatura ambiental. Las bandejas se dispusieron encima, se regaron en suelo una vez por semana y mantuvieron riego nebulizado diario, durante 5 segundos, programado cada hora desde las 11:00 a 18:00 horas. Para la aclimatación se retiró el film a cada bandeja una semana después de permanecer en estas condiciones, y se fue abriendo poco a poco la cubierta del túnel. Durante este periodo se agregaron, en dos ocasiones una solución acuosa de sales minerales MS macro y micronutrientes a la mitad. Finalmente, cada plántula enraizada que sobrevivió se pasó a tiestos individuales (Teku[®]) de 11x11x12 cm con sustrato de la misma composición. Se colocaron en invernadero, con malla de sombreado, y nebulización controlada manteniendo un 70% de humedad relativa ya con fotoperiodo ambiental.

Para el paso a tierra de las plantas libres de virus obtenidas de los distintos cultivares de manzano y peral se utilizó alveolos del mismo tamaño y sustrato de la misma composición (Siro[®]Royal), pero esterilizado previamente durante 20 minutos en autoclave, evitando de esta manera la entrada de hongos, microorganismos o picaduras de insectos en las plantas que pudieran infectarlas de nuevo. En las siguientes etapas del paso a tierra, se mantuvieron las mismas condiciones que las descritas. La aclimatación, se hizo en invernadero en una cámara especial, completamente cubierta con una doble malla anti-trips de monofilamento, con un tamaño de malla 0.24 mm (Fertri). Los alveolos, con las plantas libres de virus, se pusieron encima de bandejas que las aislaban del contacto directo con el suelo de la bancada. Todo el proceso de paso a tierra y

aclimatación de las plantas micropropagadas in vitro se llevó a cabo en las instalaciones de Cultigar, Centro de Biotecnología Vegetal perteneciente a la Fundación Paideia, dedicado a la Investigación y Desarrollo Tecnológico en el campo de la producción, cultivo y calidad sanitaria de planta ornamental y forestal de alto nivel económico.

3.4 Erradicación de virus y técnicas de comprobación

3.4.1 Erradicación de virus del material vegetal in vitro

Todos los árboles de los diferentes cultivares de manzano y peral caracterizados genéticamente, que se encuentran depositados en el Banco de Germoplasma del CIAM, tienen presencia de virus ApMV y ACLSV que han sido diagnosticados por los síntomas que presentan en campo y comprobados mediante análisis DAS-ELISA.

El material vegetal de los ocho cultivares de manzano y dos de peral seleccionados para este estudio, una vez establecido in vitro y micropropagado, aunque externamente presentan una apariencia sana por estar en cultivo aséptico libre de contaminantes externos, contiene en su interior virus, fitoplasmas y bacterias endófitas que en el caso de los virus y fitoplasma deberán ser erradicados para poder garantizar y certificar según la normativa vigente (EPPO 1999), su estado fitosanitario de libre de virus. Para llevar a cabo el saneamiento se utilizaron dos técnicas complementarias: Termoterapia con altas temperaturas y cultivo de meristemas apicales.

3.4.1.1 Termoterapia

Para elegir un sistema adecuado en la aplicación de terapia de calor se probaron tres métodos alternativos a fin de encontrar uno que no afectara la supervivencia de los brotes y que fuera eficaz en la erradicación de los virus.

a. En el primer experimento, aplicando temperaturas muy elevadas de 51°C y 56°C, (Gisbert & Molina 2013) se utilizaron estaquillas anuales provenientes de campo, previamente lavadas, desinfectadas en superficie durante 20 minutos con una solución al 8% de fungicida Capluq-50 (Luqsa[®]) y almacenadas a 4°C en cámara fría durante un

mes. Pasado este periodo de tiempo, las estaquillas fueron cortadas aproximadamente de 20 cm de longitud, unificando de esta manera el material. La termoterapia se aplicó sumergiendo las estaquillas cortadas en agua destilada dentro de bolsas de plástico con cierre hermético, en un baño termostático (Indelab[®]) a una temperatura constante de 51°C o bien de 56°C, permaneciendo durante una hora en esas condiciones (**Fig. 3.6**). Transcurrido ese tiempo, se dispusieron las estaquillas de cada cultivar sobre bandejas de plástico de 23x34 cm, con una base de papel de filtro humedecido con agua destilada y rociadas con una solución de fungicida polivalente de acción preventiva y curativa (Compo[®]). Las bandejas fueron metidas en amplias bolsas de plástico transparentes con cremallera, puestas en cámara de crecimiento a temperatura de 24°C día y 18°C noche, con fotoperiodo de 16 horas e irradiancia luminosa de 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, hasta su brotación.

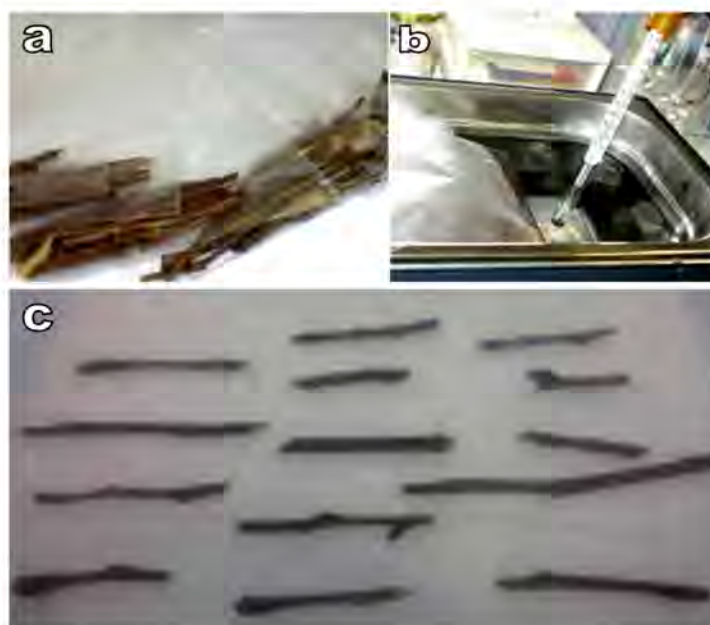


Figura 3.6 a) Secciones de estaquillas de cultivares de manzano y de peral en bolsas de plástico, (b) sumergidas con agua en un baño termostático a 51°C. c) Estaquillas de manzano puestas en bandejas en cámara de brotación a 24°C después de permanecer 1 hora a 51°C.

b. El segundo método de termoterapia, que se hizo con incremento gradual de la temperatura, consistió poner a brotar estaquillas del año cortadas en segmentos de unos 12-15 cm de longitud, en tubos de ensayo (15x2.2 cm) con agua, en una incubadora

(Foc 225E) a 25°C, subiendo de forma gradual la temperatura, 1°C por día, hasta llegar a 40°C durante el periodo de la brotación (**Fig. 3.7**). El porcentaje de estaquillas brotadas fue muy escaso y los pocos brotes desarrollados se encontraban, al final, quemados o no aptos para su puesta en cultivo.

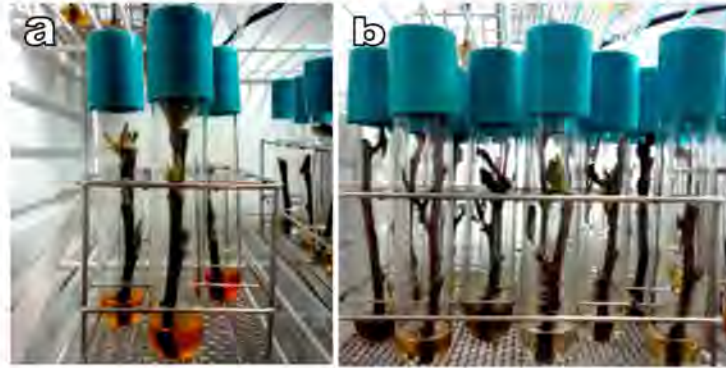


Figura 3.7 Estaquillas de (a) manzano y (b) peral puestas a brotar en Incubadora con termoterapia gradual desde los 25°C a los 40°C.

c. Un tercer método de termoterapia también gradual (desde 25° a 40°C), puesto a punto en nuestro laboratorio, se aplicó sobre los brotes cultivados in vitro, en jarras, en un medio mineral sólido con presencia de citoquinina y auxina. Dos semanas antes de comenzar a aplicar la termoterapia se hizo un subcultivo de los brotes a medio fresco de multiplicación, específico para cada cultivar, siendo MS BA 0.25 mgL⁻¹ y AIB 0.1 mgL⁻¹ el medio seleccionado para los cultivares ‘Cacharela’, ‘Camoesa’, ‘Gravillán’ y ‘Ollo Mouro’; el medio MS con BA 0.5 mgL⁻¹ y AIB 0.1 mgL⁻¹ para los cultivares ‘José Antonio’, ‘Príncipe Grande’, ‘Repinaldo’ y ‘Tres en Cunca’ y, por último, el medio de multiplicación MS con BA 1 mgL⁻¹ fue el utilizado para los cultivares de peral ‘Barburiña’ y ‘Manteca Oscura’. Los brotes subcultivados permanecieron 14 días en las condiciones establecidas de la cámara de crecimiento antes de aplicarles termoterapia. En el decimoquinto día de su cultivo comenzó la aplicación del tratamiento de calor, en una incubadora Refrigerator incubator (Foc 225 E), con control de temperatura, de manera que el aumento se hizo de forma gradual, con incremento de 1°C cada 24 horas, desde los 25°C iniciales hasta los 40°C, permaneciendo en esta última temperatura durante tres días consecutivos. La duración del tratamiento completo de termoterapia fue de tan solo 18 días, reduciendo de manera significativa el tiempo de tratamiento en

relación a los utilizados hasta la fecha (Hu et al. 2012; Knaap et al. 1995; Koubouris et al. 2007; Manganaris et al. 2003; Paprstein et al. 2008).

3.4.1.2 Aislamiento y Cultivo de ápices meristemáticos

Después de los 18 días de termoterapia *in vitro* se procedió al segundo paso del saneamiento del material vegetal: el aislamiento de zona apical con los meristemas de cada uno de los brotes que sobrevivieron a la termoterapia. El aislamiento de ápices meristemáticos, de 0.7- 1.0 mm de longitud, se realizó con ayuda de lupa binocular y en cámara de flujo laminar (Manganaris et al. 2003). Los ápices meristemáticos aislados se dispusieron en placas Petri con medio fresco de multiplicación, específico de cada cultivar, colocando sobre él, en cada placa, un disco de papel filtro estéril, para evitar, durante las primeras semanas de su nuevo establecimiento, el crecimiento de posibles bacterias endófitas que suelen impedir el desarrollo inicial del meristemo. Se llevaron a cámara de crecimiento bajo las mismas condiciones que las descritas anteriormente y al cabo de cuatro semanas, cuando los meristemas habían desarrollado una o dos hojitas, se transfirieron individualmente a tubos de ensayo (Fig. 3.8) con medio fresco de la misma composición que el utilizado para la multiplicación de los brotes de cada cultivar

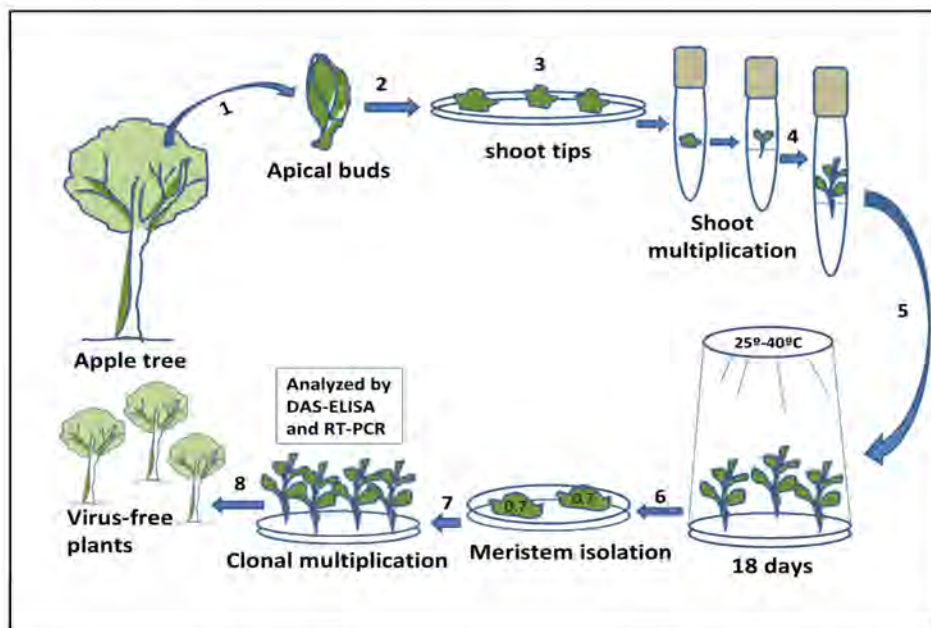


Figura 3.8 Esquema del método de termoterapia con incremento gradual de temperatura aplicada a brotes *in vitro*, combinado con el aislamiento y cultivo de ápices meristemáticos.

3.4.2 Comprobación de la presencia de virus

3.4.2.1 Métodos DAS-ELISA y RT-PCR

Los nuevos brotes de cada cultivar, supuestamente libre de virus, obtenidos a partir de los ápices meristemáticos aislados de brotes tratados previamente con termoterapia, fueron debidamente numerados, cultivados y subcultivados cada cuatro semanas y multiplicados hasta obtener un número suficientes de explantos con los que realizar los distintos análisis programados y los experimentos de enraizamiento.

Según la legislación vigente dada por *European and Mediterranean Plant Protection Organization* (EPPO) en 1999, una vez desarrollados los nuevos brotes tenemos que comprobar su estado fitosanitario para la presencia de los virus indicados para cada especie por lo que utilizamos dos técnicas distintas: el test DAS-ELISA (doble anticuerpo sándwich-ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) y la RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa). Además, según el esquema de certificación EPPO, las variedades de las dos especies en estudio, manzano y peral, tienen que ser testadas antes de la conservación de su germoplasma para los siguientes virus y fitoplasmas:

Para *Malus x domestica*: Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV); Apple mosaic virus (ApMV); Apple stem grooving virus (ASGV); Apple stem pitting virus (ASPV); Fitoplasma: Apple proliferation phytoplasma (AP).

Para *Pyrus communis*: Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV); Apple mosaic virus (ApMV); Apple stem grooving virus (ASGV); Apple stem pitting virus (ASPV); Fitoplasma: Pear decline phytoplasma (PD).

Los nuevos brotes de cada cultivar, supuestamente saneados, que derivan de cada meristemo aislado, fue el material vegetal utilizado para la detección de la presencia de ACLSV y ApMV los únicos virus presentes en todos los frutales de los que provenían los distintos cultivares estudiados. Para la detección de presencia de virus se aplicó la técnica de test DAS-ELISA, a partir de una muestra de 100 µL del extracto de tejido triturado. Para ello se siguió el protocolo del kit comercial de Bioreba, utilizando

placas de microtitulación (Nunec Certified Maxisorp microtiter plates) con los siguientes pasos:

1. Revestimiento de la placa con un anticuerpo específico, durante 4 horas a 37°C, en cámara húmeda, en estufa de incubación; efectuando un primer lavado con tampón fosfato salino con Tween 20 (PBST).
2. Incorporación del antígeno e incubación del extracto de la muestra (tejidos de la planta) durante 4 horas a 37°C; efectuando un segundo lavado.
3. Incorporación del tampón conjugado de la enzima, (se adhiere al antígeno unido al anticuerpo si lo hubiera), dejando un periodo de incubación y de nuevo lavado con tampón PBST.
4. Incorporación del tampón sustrato de la enzima. Después de este último paso, se hicieron tres lecturas a longitud de onda 405 nm de los ELISA, a la hora, tres horas y dejando actuar durante 12 horas (overnight). Una reacción positiva del color indicaría una muestra infectada que se detectó a continuación con un lector de placas (Thermo Multiskan-ex).

Para confirmar los resultados y como segunda prueba de presencia/ausencia de virus, se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR). El ARN para cada cultivar fue obtenido a partir de 400 µL de extracto de tejido triturado del conjunto de brotes, con el mismo número, derivados de cada uno de los ápices meristemáticos tratados con calor, aislados y cultivados in vitro en su medio de multiplicación. Para la extracción de ARN se utilizó el manual de Takara Bio Inc. y el kit comercial de extracción peqGOLD Plant RNA kit (Peqlab). Una vez extraído el ARN, se determinó la calidad de este, con un espectrofotómetro (NanoDrop 2000). Los componentes de reacción utilizados en la RT-PCR fueron: 2X One Step SYBR[®], RT-PCR Buffer, PrimeScript 1, step Enzyme Mix 2, RNase Free dH₂O, ROX Reference Dye (50X conc.) y como cebadores específicos para los virus: ApMV 1F y ACLSV 8F (Massart et al. 2009). La RT-PCR se realizó en un termociclador Applied Biosystems 7300 Real Time PCR System, utilizando un programa que consistió en un ciclo a 42°C durante 5 minutos, un ciclo a 95°C durante

10 segundos, 40 ciclos de 95°C durante 5 segundos y 55°C durante 30 segundos. Posteriormente se mantuvo la muestra a 4°C para su congelación y almacenamiento.

Condiciones de electroforesis

El análisis de los productos de amplificación de la RT-PCR, se realizó en gel de agarosa low EEO (Panreac) al 2% en tampón TE. El cargado de las muestras se llevó a cabo con micropipetas eppendorf con una solución de tinción para ácidos nucleicos (Realsafe) 2.5 µL y 12 µL de muestra. La electroforesis se llevó a cabo en una cubeta con una fuente de alimentación (Wealtec Corp.) durante 1.5 horas a 70 voltios. Las muestras se visualizaron en un transiluminador (Syngene).

3.5 Bacterias endófitas asociadas a manzano y peral

3.5.1 Cultivo de bacterias

Durante la micropropagación de los brotes obtenidos de los distintos cultivares, a partir de cultivos asépticos establecidos in vitro, se observó en el medio de cultivo un crecimiento bacteriano, en la zona de contacto con el explanto, debido probablemente a la presencia de bacterias endófitas. Para el aislamiento e identificación de bacterias, que no eran de contaminación externa, se cultivaron en placas de Petri explantos de hojas y tallos de cada uno de los cultivares de manzano y de peral establecidos in vitro, sobre el medio de multiplicación específico para cada cultivar (**Fig. 3.9**). Al cabo de 15 días, se observó la presencia de colonias de bacterias cultivables que dejaban la impronta de las nerviaciones de las hojas y de los tallos en el medio de cultivo. Con ayuda de un asa de cultivo, se cogió únicamente las cepas bacterianas del medio y se sembraron en un medio bacteriológico altamente nutritivo de uso general como es el caldo de triptona y soja (TSC), solidificado con micro-agar 12 gL⁻¹, (Duchefa®). Las placas inoculadas se incubaron a 24°C durante 3 días y se aislaron las diferentes colonias encontradas. Una vez aisladas colonias puras, cada cepa de bacteria encontrada se dispuso en un criovial estéril, debidamente etiquetado, con perlas y crioprotectores (Deltalab) y se guardó en un congelador a -80°C, para su conservación y uso posterior. Para la identificación de las bacterias, se descongelaron las cepas puras de los crioviales y cada una se pasó a

medio fresco nuevo (TSC). Una vez que las bacterias crecieron se obtuvo, mediante microcentrifugación, el pellet celular proveniente de 8 mL de caldo donde creció cada cepa aislada, guardándose en congelador a -20°C , hasta su uso.

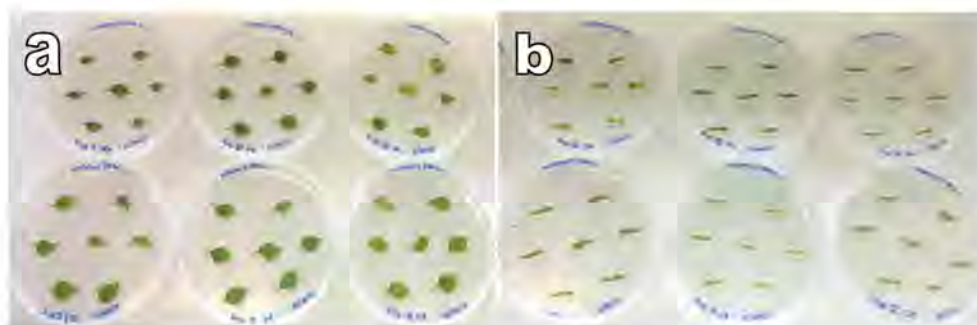


Figura 3.9 a) Hojas y (b) tallos de los distintos cultivares de manzano y peral en medio de multiplicación específico para cada cultivar.

El ADN de las diferentes cepas puras de bacterias, fue extraído a partir de 1 mL del pellet obtenido anteriormente, utilizando para ello el kit comercial de extracción Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega). La PCR se realizó con el kit comercial PuReTaq[™] Ready-To-Go[™] PCR Beads (GE Healthcare), en volúmenes de 25 μL , añadiendo 2 μL de ADN, 18 μL de agua mili-q, 2.5 μL primer S y primer ANTI (BioRad[®]). Realizada esta mezcla, se llevó a un termociclador (Mastercycler[®] gradient) utilizando un programa que consistió en 1 ciclo a 94°C durante 2 minutos, 35 ciclos a 94°C durante 15 segundos, 1 ciclo a 50°C durante 30 segundos y 1 ciclo a 72°C durante 2 minutos, seguido de un ciclo de 72°C durante 7 minutos. Posteriormente se mantuvo la muestra a 4°C hasta su congelación a -20°C .

Condiciones de electroforesis

El análisis de los productos de amplificación de la PCR se realizó en gel de agarosa (Nzytech) 0.2 g en 20 mL de tampón TAE, con 2 μL de un fluorescente (GelGreen[™] nucleic acid stain), cargando los pocillos, con 3 μL de muestra y 3 μL de DNA loading dye (Thermo scientific). La electroforesis se llevó a cabo, cubriendo el gel con tampón TAE, con una fuente de alimentación (BioRad[®]) a 70 voltios, durante 30 minutos. Para visualizar las bandas del gel, utilizamos un transiluminador (BioRad[®]).

3.5.2 Antibiograma

Una vez aisladas, cultivadas y purificadas las distintas bacterias endófitas, provenientes de cada cultivar, se realizó la identificación genética de las distintas cepas bacterianas con el producto de la PCR, por análisis de la secuenciación del gen ARNr 16S (Stab Vida), utilizando como base de datos el programa EzTaxon- EZbioCloud (Yoon et al. 2016). Una vez identificadas las distintas bacterias endófitas cultivables, asociadas a nuestro cultivos, y para determinar la sensibilidad o resistencia a distintos antibióticos se realizó las técnicas de antibiograma como prueba microbiológica

Se eligieron distintos antibióticos, pertenecientes a tres grupos diferentes, aminoglucósidos, betalactámicos y tetraciclina que poseen distinto espectro de acción sobre los microorganismos (Seija & Vignoli 2006). Los antibióticos utilizados fueron adquiridos en Sigma-Aldrich y se relacionan en la siguiente tabla.

Tabla 3.1 Relación de antibióticos de diferentes grupos utilizados para las pruebas de antibiograma.

1. Aminoglucósidos	2. Betalactámicos	3. Tetraciclina
Kanamicina	a. Penicilinas	Tetraciclina
Espectinomomicina	Penicilina G	
	Meticilina	
	Amoxicilina	
	Ampicilina	
	b. Cefalosporinas	
	1° Generación: Cefalotina	
	2° Generación: Cefaclor	
	3° Generación: Ceftriaxona	

Se prepararon soluciones stock de cada antibiótico en tubos eppendorf de 1.5 mL estériles, empleando concentraciones de 1mg/mL de cada uno de ellos en solución

acuosa con agua destilada estéril. Las disoluciones de antibióticos se conservaron en nevera, a 5°C. Para la realización del antibiograma, previamente se cultivó en medio sólido TSC, durante 48 horas, muestras de cada cepa bacteriana de los diferentes cultivares en estudio. Una vez crecidas, cada cepa bacteriana se resuspendió en medio líquido TSC, ajustando la turbidez del medio con los estándares de la escala McFarland 2 para conocer su concentración. Con el objetivo de conocer la sensibilidad de las bacterias a los distintos antibióticos y la concentración a utilizar de cada antibiótico, se hizo un experimento para determinar la concentración mínima de cada antibiótico capaz de inhibir el crecimiento de un microorganismo. En placas Petri con 25 mL de medio TSC, añadimos 100 µL de la suspensión bacteriana, sembrando en césped, por toda la superficie de la placa, con un asa de vidrio tipo Digrafsky. En cada una de las placas se colocaron 5 discos de papel (Dominique Dutcher) de 6 mm de diámetro, separados y equidistantes entre sí para que no se solapen, con el fin de introducir en cada uno de ellos un antibiótico distinto, de esta manera poder ver el efecto de cada uno sobre la bacteria, de los cuales hicimos diluciones para valorar posteriormente su capacidad inhibitoria sobre las distintas cepas bacterianas. Los volúmenes probados de cada uno de los antibióticos estudiados fueron de 5 µL y 10 µL a la misma concentración (1mg/mL). Tras la incubación de las placas a 24°C durante 48 horas, se midieron los halos de inhibición para cada cepa bacteriana, determinando de esta forma la concentración mínima inhibitoria de cada antibiótico.

3.5.3 Metagenómica

Finalmente se realizó como prueba la metagenómica para el estudio directo del microbioma interno completo de los brotes de cada cultivar *in vitro*, sin interferencias de contaminaciones externas, evitando así la necesidad de aislar y cultivar cada una de las cepas bacterianas endófitas encontradas en los ocho cultivares de manzano y los dos de peral. Este método de análisis de todo el ADN presente en el interior de una planta sirve para la identificación de todas las bacterias endófitas cultivables o no cultivables en medio MS con citoquinina y auxina o en medio bacteriológico TSC, así como para identificar todos los microorganismos que han pasado desapercibido o que no fueron detectados con la técnica del ARNr 16S. El análisis del ADN total nos da idea de la

diversidad de los microorganismos que puedan habitar en estas plantas. Por otro lado, confirma la comprobación de las cepas bacterianas cultivadas ya identificadas con el 16S. Para la metagenómica se utilizaron brotes provenientes de medio de multiplicación específico para cada cultivar estudiado. Se realizó la extracción de ADN para cada uno de los cultivares de manzano y peral, a partir de muestras de entre 80-100 mg de tejido de planta fresca in vitro y se utilizó el kit de extracción Qiagen DNA Plant Mini Kit, siguiendo el protocolo del mismo. Una vez obtenido el ADN purificado de cada uno de los cultivares, se enviaron las diez muestras en frío mediante empresa de mensajería, al laboratorio Molecular Research laboratory-USA para su análisis. La identificación del microbioma en cada uno de los cultivares de manzano y peral se hizo mediante procesos de secuenciación de amplicones codificados (bTEFAP®), un método universal para identificar una amplia gama de poblaciones bacterianas, utilizando la tecnología 799F "illumina 20K". La secuenciación de los datos fueron procesados y analizados utilizando un análisis MR DNA pipeline (MR DNA, Shallowater, TX, EE.UU.). A continuación las unidades taxonómicas operacionales (OTU) se definieron agrupando con un 97% de similitud. Por último las OTU finales se clasificaron taxonómicamente utilizando BLASTn contra una base de datos derivada de GreenGenes, RDPII y NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov, <http://rdp.cme.msu.edu>).

3.6 Técnicas histológicas

Para realizar el estudio histológico y poder localizar la presencia de bacterias en los diferentes tejidos de los explantos cultivados in vitro de manzano y peral, se seleccionaron las muestras de explantos foliares, segmentos de tallo y yemas. Estas muestras fueron fijadas con el fijador FAA: etanol (50°), ácido acético glacial y formaldehído al 40% (90:5:5 v/v/v) durante 24 horas.

A continuación, las muestras fueron deshidratadas gradualmente empleando series crecientes de 2-butanol (Probus p.a.) y etanol absoluto (Panreac p.a.), permaneciendo durante 12 horas en cada una de las series (Jensen 1962). Una vez deshidratadas las muestras fueron embebidas en Paraplast (Plus®) fundida para su inclusión realizando tres pasos de 24 horas cada uno y finalmente las muestras se

incluyeron, correctamente orientadas, en bloques de Paraplast (Plus®) que posteriormente fueron debidamente tallados para cortar. Se montaron los bloques en soportes y se cortaron, a temperatura ambiente, secciones de 12 µm de grosor, utilizando para ello un micrótopo Jung CM 1800. Las secciones se montaron en portaobjetos cubiertos con una fina capa de adhesivo Haupt (Jensen 1962), añadiendo, una vez seco, unas gotas de formalina al 4% (formaldehído 37%) y disponiéndolos sobre una fuente de calor para estirarlas. Una vez secadas en estufa a 38°C durante al menos 48 horas, se retiró la parafina de las preparaciones histológicas aplicando brevemente calor (56°C) y dos baños consecutivos en xileno de al menos 15 minutos cada uno, pasando las muestras a través de la serie decreciente de etanol para rehidratar de nuevo el tejido vegetal, y a continuación fueron teñidas.

Se utilizaron dos tipos de tinciones:

a) Una tinción específica para la localización y visualización de las bacterias endófitas en los tejidos (Stoughton 1930) en la que se empleó una doble coloración con Tionina (Sigma-Aldrich®) y Orange G (Sigma-Aldrich®). La Tionina se preparó al 0.5% en una solución acuosa de fenol al 5% y se tiñeron las muestras durante al menos una hora; seguidamente se deshidrataron con un paso breve en etanol absoluto y fueron teñidas durante 1 minuto con una mezcla al 50% de una solución (a) saturada de Orange G (Sigma-Aldrich®) en aceite de clavos y otra solución (b) igualmente saturada en etanol absoluto. A continuación se montaron las preparaciones con una gota de DePex mounting médium (Gurr®) y se cubrieron con un cubreobjetos. La visualización de bacterias en las preparaciones se realizó con un microscopio Zeiss Axioskop con objetivo 100X planacromático de inmersión y se fotografiaron.

b) La otra tinción empleada fue la doble coloración safranina-verde rápido (Jensen 1962) para el estudio de la estructura histológica y celular de los distintos explantos. Una vez teñidas las preparaciones se aclararon en xileno y se montaron con una gota de DePex mounting médium (Gurr®) y se cubrieron con un cubreobjetos. El análisis microscópico se llevó a cabo con un microscopio Zeiss Axioskop con objetivos planacromáticos de aumentos: 5X, 10X, 20X, 40X y 100X, siendo este último de inmersión.

3.7 Técnicas fotográficas

Para el estudio y seguimiento del desarrollo de los explantos con las diferentes citoquininas en cada uno de los cultivares de manzano y peral, se tomaron fotografías con una cámara digital Canon PowerShot G1X que también se utilizó para los procesos de enraizamiento, paso a tierra y aclimatación. También se realizaron fotografías con un estero microscopio Olympus[®] SZX7 con objetivo de (1x/ocular 10x) utilizando una cámara digital adaptada Olympus[®] E-330. Para el estudio histológico y bacteriológico, se utilizó un microscopio Zeiss Axioskop con objetivos planacromáticos con aumentos 5X, 10X, 20X, 40X y 100X, con una cámara AxioCam ERc 5s incorporada al microscopio.

3.8 Análisis estadístico

El estudio estadístico se realizó con datos de tres repeticiones de 18 explantos cada una (n=54) correspondiendo a 3 jarras con 6 explantos por jarra. Se analizaron los datos del número de brotes conseguidos en los tratamientos realizados con las cuatro citoquininas diferentes (BA, Zea, 2iP y TDZ) a distintas concentraciones (0.25, 0.5 y 1 mgL⁻¹) con o sin AIB (0.1 mgL⁻¹), más los datos del control en medio basal sin reguladores de crecimiento (MS0), para cada cultivar de manzano y peral. La normalidad de los datos obtenidos fue testada mediante el test de Kolmogorov-Smirnov a un 99% de confianza y después de comprobar la homogeneidad de varianzas mediante el estadístico de Levene, se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) factorial (P<0.05), que nos permite analizar más de dos variables en un mismo resultado y detectar las diferencias significativas en cuanto a la multiplicación de brotes normales e hiperhídricos para cada cultivar (Arce & Real 2001). Por último, se aplicó la prueba de post hoc HSD de Tukey (P<0.05), que nos permite la comparación de medias. El análisis estadístico se llevó a cabo con la ayuda del paquete estadístico SPSS versión 20 a un nivel de confianza del 95% (IBM SPSS 2011).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Micropropagación

4.1.1 Establecimiento en cultivo aséptico

Aunque en un principio fueron seleccionados once cultivares de manzano y cinco de peral, solo se llegaron a establecer con éxito en cultivo in vitro ocho cultivares de manzano y dos de peral. La recogida de las estaquillas de todos los cultivares de ambas especies provenientes del Banco de Germoplasma del CIAM, se hizo siempre a finales de enero y principio de febrero de los años 2012, 2013 y 2014 siendo paulatino y no simultáneo el establecimiento de todos ellos.

Aplicando los métodos antes descritos en el capítulo 3. Material y Métodos como son la recolección en campo de estaquillas de un año de los distintos cultivares, desinfección del material vegetal y posterior almacenamiento a 4°C durante un mes, se indujo la brotación de las estaquillas, en condiciones controladas de luz y temperatura, para su establecimiento en cultivo in vitro.

En estudios preliminares realizados, no descritos aquí, rechazamos un método de brotación de las estaquillas en sustrato de vermiculita y perlita dado que la brotación de yemas axilares fue muy lenta. Esta no se inició hasta pasados veinte días de ser puestas a brotar en cámara de crecimiento lo que produjo la muerte de muchas de ellas. Por el contrario, cuando se colocaron las estaquillas en agua, en las mismas condiciones establecidas de luz y temperatura, se produjo la brotación en un menor periodo de tiempo de entre 10 y 18 días, siendo este último el método seguido con todos los cultivares y descrito en la metodología de este proyecto.

Una vez puestas a brotar las estaquillas en jarras de vidrio con agua destilada y colocadas en un fitotrón con control de luz y temperatura (24°C-18°C, 16h fotoperiodo, $40 \mu\text{m m}^{-2} \text{s}^{-1}$) se comprobó que el tiempo de brotación varió entre los diferentes cultivares, considerando como más precoces a los cultivares de manzano ‘Gravillán’, ‘Morro de Liebre’ y ‘Repinaldo’, que empezaron a emitir yemas vegetativas al cabo de 10 días. Por otro lado, los cultivares que tuvieron un periodo de brotación intermedio

fueron ‘José Antonio’, ‘Príncipe Grande’, ‘Tres en Cunca’ y ‘Camoesa’, y los perales ‘Donguindo’, ‘Libra’, ‘Manteca Oscura’ y ‘Urraca’, emitiendo yemas vegetativas entre 12 y 15 días después de ponerlos a brotar. Los cultivares más tardíos en su brotación fueron ‘Cacharella’, ‘Marafonsa’, ‘Sangre de Toro’ y ‘Ollo Mouro’, y el peral ‘Barburiña’, considerando como tardío el hecho de emitir yemas vegetativas después de 15 días de su puesta para brotación.

Los nuevos brotes como material de partida para su establecimiento en cultivo *in vitro* fueron, en general, muy escaso debido al distinto tamaño y grosor de las estaquillas de un año recogidas en campo, a veces muy pequeñas y delgadas, que influyó en el número de yemas axilares presentes en cada una de ellas. El diámetro de las estaquillas fue también un factor determinante a la hora de la brotación, puesto que las estaquillas con menor diámetro eran más propensas a marchitarse sin emitir yema vegetativa alguna. Otro aspecto a considerar en la etapa de brotación, fue que no todas las yemas que brotaron fueron de carácter vegetativo (**Fig. 4.1**) siendo en algunos casos yemas florales. Por último, el exceso de contaminación externa principalmente por hongos y bacterias y también por microorganismos endofíticos, afectó considerablemente al desarrollo y supervivencia de las pocas yemas vegetativas formadas en cada una de las estaquillas, disminuyendo así el material vegetal de partida en la etapa de brotación.



Figura 4.1 a) Brotación de las estaquillas de distintos cultivares de manzano y peral después de 12 días en cámara de crecimiento en condiciones controladas de luz y temperatura. b) Cultivar ‘Tres en Cunca’ con formación de yemas florales, después de 15 días en cámara de crecimiento junto al cultivar ‘Ollo Mouro’ mostrando escasa brotación de yemas vegetativas a los 18 días en cámara de crecimiento.

Los brotes desarrollados, de más de 2 cm de longitud, se cortaron y se realizó la esterilización de los mismos en cámara de flujo laminar para su puesta en cultivo in vitro sobre un medio mineral MS con reguladores de crecimiento.

Según la bibliografía consultada (Li X et al. 2002) para el establecimiento en cultivo aséptico, para casi todos los cultivares de las especies frutales leñosas pertenecientes a los géneros *Malus* y *Pyrus* de la familia Rosaceae, se utilizó con buenos resultados, como medio de establecimiento, el medio mineral MS adicionado de 1 mgL^{-1} de BA, 0.2 mgL^{-1} de GA_3 y 0.3 mgL^{-1} de AIB.

En la etapa de establecimiento el estado fitosanitario de cada cultivar fue un factor determinante mostrando, en la mayoría de cultivares, altas tasas de contaminación por organismos endofíticos, que afectaba visiblemente el crecimiento y desarrollo de los explantos (**Fig. 4.2**). Después de 7 días de su establecimiento in vitro se observó en muchos de ellos necrosis apical, volviéndose paulatinamente todo el explanto de color pardo y muriendo más tarde. Con el fin de reducir en lo posible la contaminación y aumentar la tasa de supervivencia en esta fase, disminuimos el tamaño inicial de los explantos en su establecimiento. Así, de cada brote previamente esterilizado, se cortó la yema apical aislando el ápice meristemático de entre 1.0 - 1.5 milímetros.

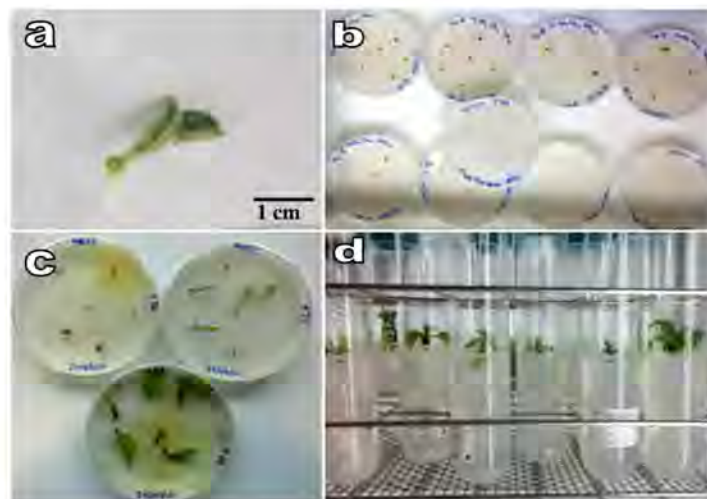


Figura 4.2 a) Brote de manzano b) Establecimiento de ápices de los distintos cv. de manzano y peral c) Contaminación en la fase de establecimiento d) Brotes de manzano desarrollados después de 2 subcultivos.

En cada placa Petri, sobre el medio de cultivo se depositó un disco de papel filtro estéril y sobre él se dispusieron las yemas apicales, disminuyendo así, en gran medida, el rápido crecimiento de microorganismos endofíticos. Después de cuatro semanas en medio de establecimiento, las yemas ya crecidas se transfirieron a tubos de ensayo con un medio mineral basal MS adicionado con 1 mgL^{-1} de BA y 0.1 mgL^{-1} de AIB sin GA3. La tasa de supervivencia en el establecimiento fue muy baja y falló algunos años (**Tablas 4.1, 4.2 y 4.3**) en los que no se consiguió establecer determinados cultivares.

Tabla 4.1 Resultado de la fase de establecimiento in vitro y porcentaje de supervivencia en el primer muestreo (2012) de los distintos cultivares de manzano y peral seleccionados.

cv. Manzano	Año 2012			
	Número de estaquillas	Número de brotes emitidos/esterilizados	Número de yemas establecidas	Supervivencia in vitro (%)
‘Camoesa’	4	3	3	0.00
‘Gravillán’	7	8	7	0.00
‘José Antonio’	4	7	6	0.00
‘Marafonsa’	8	2	2	0.00
‘Morro de Liebre’	5	2	2	0.00
‘Ollo Mouro’	7	9	8	0.00
‘Príncipe Grande’	6	5	5	0.00
‘Repinaldo’	8	11	11	27.27
‘Sangre de Toro’	9	10	9	0.00
‘Tres en Cunca’	9	10	9	22.22
cv. Peral				
‘Barburiña’	5	0	0	0.00
‘Libra’	4	0	0	0.00
‘Donguindo’	4	0	0	0.00
‘Manteca Oscura’	5	0	0	0.00
‘Urraca’	4	0	0	0.00

Tabla 4.2 Resultados de la fase de establecimiento in vitro y porcentaje de supervivencia en el segundo muestreo (2013) de los distintos cultivares de manzano y peral.

cv. Manzano	Año 2013			
	Número de estaquillas	Número de brotes emitidos/esterilizados	Número de yemas establecidas	Supervivencia in vitro (%)
‘Cacharela’	25	7	7	28.57
‘Camoesa’	33	28	27	11.11
‘Gravillán	31	28	28	25.00
‘José Antonio’	30	4	4	0.00
‘Morro de Liebre’	18	4	4	0.00
‘Ollo Mouro’	33	21	10	30.00
‘Sangre de Toro’	11	2	2	0.00
cv. Peral				
‘Barburiña’	10	6	6	50.00
‘Libra’	8	0	0	0.00
‘Donguindo’	6	0	0	0.00

Tabla 4.3 Resultados de la fase de establecimiento in vitro y porcentaje de supervivencia en el tercer muestreo (2014) de los distintos cultivares de manzano y peral seleccionados.

cv. Manzano	Año 2014			
	Número de estaquillas	Número de brotes emitidos/esterilizados	Número de yemas establecidas	Supervivencia in vitro (%)
‘José Antonio’	9	8	8	50.00
‘Príncipe Grande’	13	9	9	55.55
‘Sangre de Toro’	13	12	8	0.00
cv. Peral				
‘Libra’	10	8	0	0.00
‘Manteca Oscura’	7	8	8	37.50
‘Urraca’	12	6	0	0.00

Al final, para realizar el estudio de saneamiento de frutales, seleccionamos los ocho cultivares de manzano y dos cultivares de peral que fueron establecidos en los tres muestreos siendo descartados los cultivares de peral ‘Libra’, ‘Donguindo’ y ‘Urraca’ y de manzano ‘Marafonsa’, ‘Morro de Liebre’ y ‘Sangre de Toro’ por el mal estado fitosanitario y la gran dificultad para su establecimiento.

Una vez establecidas las yemas y transferidas al cabo de cuatro semanas a tubos con medio MS, con 1 mgL^{-1} de BA y 0.1 mgL^{-1} de AIB, los brotes desarrollados se subcultivaron, cada cuatro semanas, en medio fresco de la misma composición iniciándose así la etapa de multiplicación. La tasa de multiplicación varió entre los distintos cultivares y se seleccionó para cada cultivar, aquellos medios de cultivo que fueron más adecuados para conseguir, después de cinco a siete subcultivos, un número de brotes suficiente en la mayoría de los cultivares e iniciar así el estudio de micropropagación, los ensayos de termoterapia y el aislamiento de meristemas para la erradicación de virus de cada cultivar.

4.1.2 Multiplicación in vitro de cultivares de manzano y peral

En el estudio de micropropagación de cultivares de manzano y peral hemos aplicado uno de los métodos de multiplicación más utilizados para lograr la micropropagación de plantas leñosas cultivadas in vitro, mediante el desarrollo de yemas axilares a partir de brotes establecidos, induciendo este proceso en un medio mineral basal con la presencia de citoquininas, a diferentes concentraciones, combinadas con una auxina o bien sin ella.

Se ha tratado de comprobar por un lado la acción que ejercen las diferentes citoquininas estudiadas (BA, Zea, 2iP y TDZ), a tres concentraciones diferentes de 0.25, 0.5 y 1 mgL^{-1} , sobre el crecimiento y multiplicación de los brotes laterales, en condiciones in vitro, de los ocho cultivares de manzano, junto a los dos de peral y al mismo tiempo estudiar la influencia de la presencia de la auxina AIB en el medio de cultivo, a una única concentración establecida de 0.1 mgL^{-1} , en combinación con las diferentes concentraciones de las cuatro citoquininas analizadas. Además de tratar de conseguir la mejor tasa de multiplicación para cada cultivar, el material vegetal

obtenido tendrá que ser un material manejable, con un desarrollo normal ya que se precisa para tratarlo con termoterapia, aislar sus meristemos y sanearlo de los virus ACLSV y ApMV y, además, para que enraíce fácilmente y conseguir su micropropagación.

Los resultados de multiplicación en la fase experimental con todos los tratamientos indicados, veinticuatro combinaciones diferentes, permitió evaluar la capacidad de multiplicación de cada una de las variedades de manzano y peral estudiadas atendiendo principalmente a dos parámetros: a) el número total de brotes laterales desarrollados por explanto en cada uno de los tratamientos y b) el número de brotes hiperhídricos formados en cada tratamiento. Estos brotes hiperhídricos se eliminaron tanto para la multiplicación como para el enraizamiento, pudiendo así establecer cuál es la combinación de citoquinina y auxina más favorable para lograr la mayor tasa de multiplicación de cada cultivar. Además, se valoró que los brotes tuvieran el aspecto morfológico normal de cada cultivar como otro parámetro a tener en cuenta para realizar posteriormente la termoterapia y el aislamiento de ápices meristemáticos.

Se analizaron por tanto los datos cuantificables de la multiplicación de yemas axilares desarrolladas en los diferentes medios de cultivo, así como la morfología de los explantos formados. Hay que señalar que el genotipo ha sido un factor determinante a la hora de evaluar los resultados en los distintos cultivares seleccionados de las dos especies de frutales estudiadas (*Malus* y *Pyrus*) ya que la respuesta a los tratamientos ha sido muy variable. Por ello y para una mejor comprensión de los resultados obtenidos se decidió mostrarlos de forma independiente para cada cultivar estudiado.

4.1.2.1 Multiplicación de Cultivares de Manzano

Cultivar ‘Cacharela’

El número de brotes totales obtenidos en los distintos tratamientos con citoquininas y auxina a diferentes concentraciones, mostró diferencias significativas para este cultivar. Como resultado del análisis estadístico se comprobó que las medias más altas se obtuvieron en los medios que contenía la citoquinina TDZ o también con BA. Cuando esta última citoquinina se añadió al medio de cultivo a una concentración de 1 mgL^{-1} , se obtuvo la mayor tasa de multiplicación, con una media de 6.15 brotes de

los cuales una media de 6.04 brotes, casi en su totalidad (98.2%), fueron hiperhídricos. Sin embargo, al utilizar una concentración de BA menor (0.25, 0.5 mgL⁻¹), la media de brotes laterales desarrollados fue menor pero también lo fue la tasa de brotes hiperhídricos formados. El análisis de los datos muestra diferencias significativas entre tratamientos en cuanto a la media de brotes laterales desarrollados por explanto cuando se utilizó en el medio BA (F=29.004; P< 0.001).

En todos los tratamientos con Zeatina los brotes mostraron una tasa de multiplicación muy baja, aunque los explantos presentaban buen aspecto, con hojas grandes expandidas y de un verde intenso. Con todas las combinaciones probadas de esta citoquinina, de las tres concentraciones con o sin AIB, se logró una media cercana al valor 1, es decir, que apenas se desarrollaron brotes axilares, siendo la media más alta de tan solo 1.13 brotes, cuando esta citoquinina se incluyó en el medio a una concentración de 1 mgL⁻¹. En ninguno de los tratamientos con Zeatina se formaron brotes hiperhídricos, ni hubo diferencias significativas entre tratamientos.

La media de brotes axilares desarrollados para los tratamientos con 2iP fue muy similar a la obtenida en los tratamientos con Zeatina consiguiendo la media más baja de todos los tratamientos analizados con las diferentes citoquininas en este cultivar. Con una media máxima de 1.04 brotes desarrollados por explanto cuando se agregó al medio 1 mgL⁻¹ de 2iP combinada con la auxina AIB a 0.1 mgL⁻¹, los resultados no mostraron diferencia significativa para esta citoquinina entre las distintas combinaciones probadas, pero sí en relación a los tratamientos en los que BA o TDZ estaba presente en el medio.

En el caso de TDZ, la única citoquinina probada derivada de la fenilurea, hay que decir que en todos los tratamientos con cualquiera de sus concentraciones y tanto con AIB como sin auxina, se consiguió las mejores medias de multiplicación en relación a los tratamientos con las otras citoquininas utilizadas como BA, Zeatina o 2iP, logrando la mayor media de 6.46 brotes totales y una escasa formación de brotes hiperhídricos con una media máxima de 1.22, cuando se utilizó TDZ a una concentración de 0.5 mgL⁻¹ sin añadir AIB en el medio de cultivo. Hay que destacar también la escasa formación de brotes hiperhídricos a partir de yemas axilares en todas las otras combinaciones de TDZ probadas, que fue siempre menor a 1 (**Tabla 4.4**).

Tabla 4.4 Resultados de las medias obtenidas por la acción de distintas concentraciones de BA, Zea, 2iP y TDZ, con o sin AIB, en número de brotes axilares después de 4 semanas de cultivo.

Cultivar 'Cacharela'				
Citoquininas	Concentración (mgL⁻¹)	AIB (mgL⁻¹)	Media de número total de brotes ± DE	Media de brotes hiperhídricos ± DE
BA	0.25	0	2.69 ± 1.50	0.00 ± 0.00
		0.1	4.09 ± 1.34	0.07 ± 0.33
	0.5	0	3.61 ± 1.55	1.02 ± 1.04
		0.1	3.74 ± 1.08	1.54 ± 0.95
	1	0	6.15 ± 1.98	6.04 ± 2.15
		0.1	4.15 ± 1.77	3.54 ± 1.86
Zea	0.25	0	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
		0.1	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	0.5	0	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
		0.1	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	1	0	1.13 ± 0.34	0.00 ± 0.00
		0.1	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
2iP	0.25	0	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
		0.1	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	0.5	0	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
		0.1	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	1	0	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
		0.1	1.04 ± 0.19	0.00 ± 0.00
TDZ	0.25	0	5.56 ± 2.00	0.15 ± 0.56
		0.1	5.57 ± 1.41	0.33 ± 0.67
	0.5	0	6.46 ± 1.76	1.22 ± 1.22
		0.1	5.44 ± 1.31	0.48 ± 0.86
	1	0	5.50 ± 1.24	0.44 ± 0.90
		0.1	5.37 ± 1.40	0.85 ± 1.19

Por otro lado, y a pesar de haber alcanzado valores medios muy altos, los brotes desarrollados con TDZ fueron de pequeño tamaño, con hojas rizadas, entrenudos muy cortos y engrosados, con callo en la base de los brotes que daban al conjunto un aspecto compacto y arracimado. Esas características morfológicas dificultaron su manejo para aislarlos e individualizarlos tanto para su recuento como para posteriores ensayos de enraizamiento o aislamiento de meristemas. El análisis estadístico de los datos muestra diferencia significativa ($F=3.712$; $P=0.003$) para esta citoquinina entre tratamientos en cuanto a la media de brotes desarrollados por explanto.

En el cultivar ‘Cacharela’ los datos obtenidos del recuento total de brotes desarrollados en cada uno de los tratamientos, después de cuatro semanas de cultivo in vitro en las condiciones ya descritas, fueron analizados con un análisis multivariante, mostrando diferencias significativas entre la acción de las citoquininas ($F=1429.476$; $P<0.001$), así como para el factor concentración ($F=16.576$; $P<0.001$). El efecto de la presencia de la auxina, también mostró diferencia significativa ($F=5.269$; $P=0.022$) frente a los tratamientos en la que no estaba presente (**Fig. 4.3**). Así mismo, se muestra el diferente aspecto morfológico de los brotes con cada tratamiento (**Fig. 4.4**).

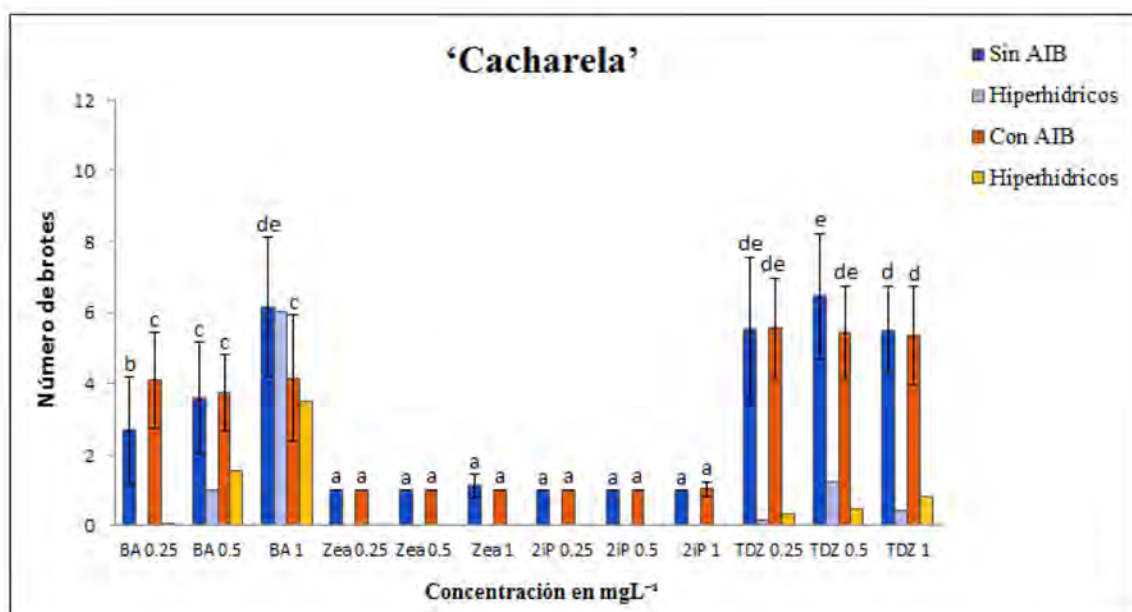


Figura 4.3 Representación gráfica de las medias del número de brotes obtenidos con las cuatro citoquininas a las tres concentraciones combinadas o no con AIB. Letras diferentes sobre los histogramas indican diferencias significativas entre tratamientos.

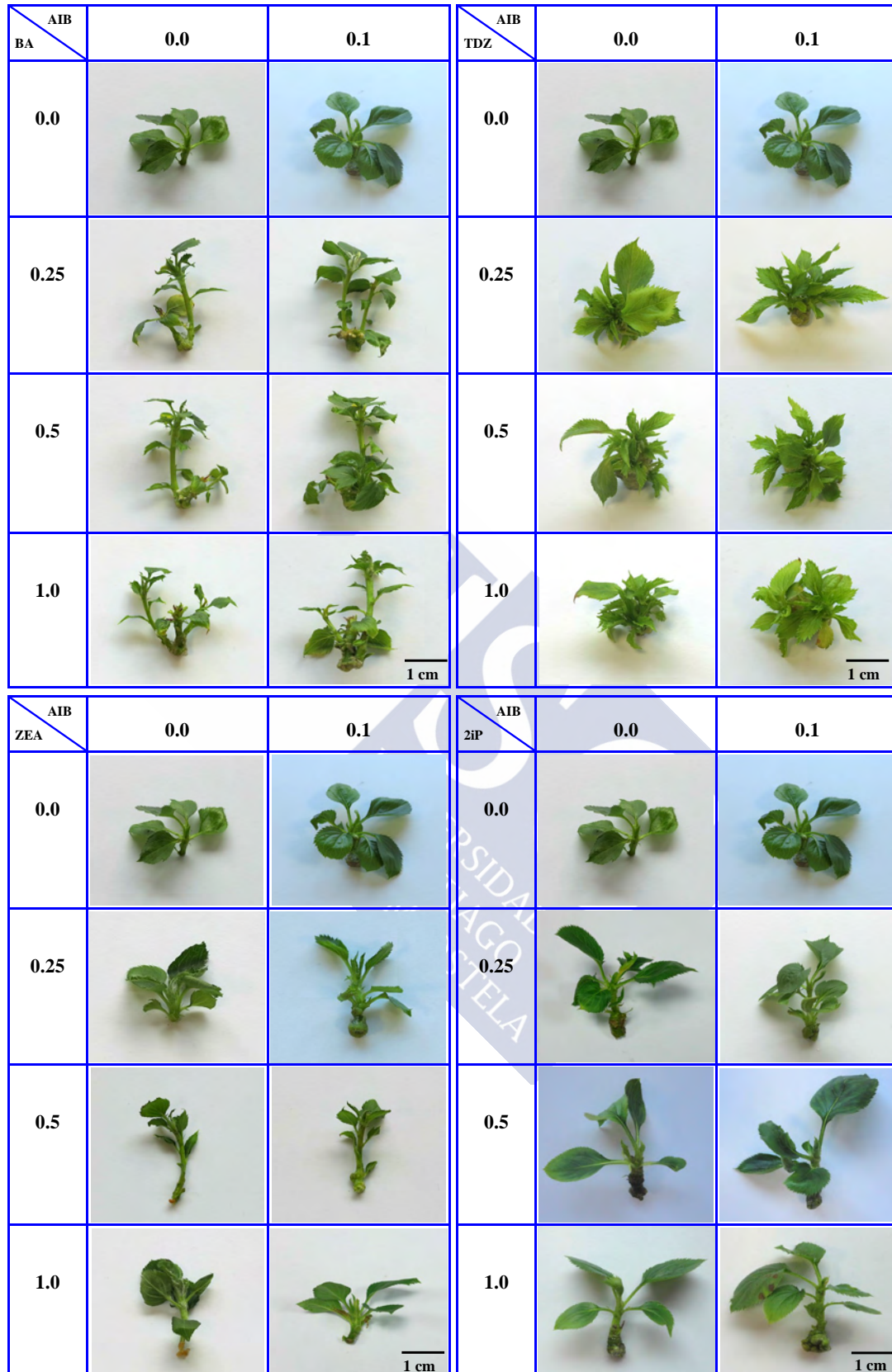


Figura 4.4 Aspecto morfológico de los brotes desarrollados con las diferentes concentraciones de las cuatro citoquininas (BA, Zea, 2iP y TDZ) con o sin AIB en la etapa de multiplicación.

Cultivar 'Camoesa'

La tasa de multiplicación obtenida en este cultivar con las diferentes concentraciones de las distintas citoquininas probadas, junto con la auxina AIB a una única concentración, mostraron diferencias significativas. Los brotes desarrollados a partir de las yemas axilares en los tratamientos con BA, presentaron el aspecto normal del cultivar en su desarrollo siendo de porte alargado con una longitud, de entre 25-30 mm, hojas ovaladas con el borde aserrado, entrenudos del tallo largo y con algo de callo en su parte basal. El valor más alto de la media de brotes totales desarrollados con esta citoquinina, se logró con la concentración de 1 mgL^{-1} añadida al medio, con valor medio de 3.11 brotes, de los cuales una media de 1.04 fueron brotes hiperhídricos. El análisis estadístico de los datos obtenidos para este cultivar en los tratamientos con BA, mostraron diferencias significativas en la media de brotes desarrollados por explanto ($F=18.061$; $P<0.001$).

En todos los tratamientos tanto con Zeatina como con 2iP, los brotes laterales que se formaron tuvieron un desarrollo normal de las hojas, pero con un tamaño pequeño y presentaban una longitud del tallo menor frente a los brotes desarrollados en medios con BA a cualquiera de las concentraciones utilizadas. Sin embargo, pese al buen aspecto de los brotes desarrollados en los distintos tratamientos con Zeatina y 2iP, la tasa de multiplicación fue muy baja en comparación con la obtenida con BA o TDZ, siendo para ambas citoquininas las medias más altas de tan solo 1.48 brotes para Zeatina y 1.50 brotes con 2iP, cuando estas citoquininas se añadieron al medio a una concentración de 1 mgL^{-1} , sin presencia de la auxina AIB (**Tabla 4.5**).

En todos los tratamientos conteniendo TDZ, con y sin AIB para la multiplicación de los brotes del cultivar 'Camoesa', el estudio estadístico de los datos obtenidos mostró diferencias significativas entre tratamientos según el test ANOVA ($F=3.835$; $P<0.001$). El mayor número de brotes, con una media de 5.80 brotes por explanto y con escasa formación de brotes hiperhídricos de solo un 10.8%, se obtuvo cuando se le añadió al medio TDZ 0.25 mgL^{-1} . Sin embargo, a pesar de este buen resultado, el aspecto morfológico de los brotes no fue normal en ningún caso ya que presentaban hojas con bordes muy ondulados casi rizados, con tallo muy corto y engrosado, casi inexistente a veces, y con abundante callo en la base del tallo.

Tabla 4.5 Resultados de las medias obtenidas por la acción de distintas concentraciones de BA, Zea, 2iP y TDZ, con o sin AIB, en número de brotes axilares después de 4 semanas de cultivo.

Cultivar 'Camoesa'					
Citoquininas	Concentración (mgL ⁻¹)	AIB (mgL ⁻¹)	Media del número total de brotes ± DE	Media de brotes hiperhídricos ± DE	
BA	0.25	0	2.61 ± 0.94	0.17 ± 0.69	
		0.1	1.35 ± 0.52	0.00 ± 0.00	
	0.5	0	2.72 ± 1.04	0.69 ± 0.97	
		0.1	1.96 ± 1.18	0.89 ± 0.95	
	1	0	3.11 ± 1.34	1.04 ± 1.29	
		0.1	2.11 ± 1.30	1.85 ± 1.46	
	Zea	0.25	0	1.06 ± 0.23	0.22 ± 0.50
			0.1	1.00 ± 0.00	0.20 ± 0.41
0.5		0	1.28 ± 0.45	0.37 ± 0.59	
		0.1	1.00 ± 0.00	0.17 ± 0.38	
1		0	1.48 ± 0.57	0.65 ± 0.78	
		0.1	1.41 ± 0.60	0.56 ± 0.74	
2iP		0.25	0	1.04 ± 0.19	0.06 ± 0.23
			0.1	1.06 ± 0.23	0.06 ± 0.23
	0.5	0	1.09 ± 0.29	0.00 ± 0.00	
		0.1	1.00 ± 0.00	0.02 ± 0.14	
	1	0	1.50 ± 0.64	0.19 ± 0.55	
		0.1	1.15 ± 0.45	0.09 ± 0.29	
	TDZ	0.25	0	5.80 ± 1.79	0.63 ± 1.28
			0.1	5.26 ± 1.87	1.31 ± 1.60
0.5		0	4.57 ± 1.09	0.59 ± 1.12	
		0.1	5.07 ± 1.69	1.06 ± 1.57	
1		0	4.83 ± 1.38	0.50 ± 1.00	
		0.1	5.26 ± 1.47	1.09 ± 1.89	

Esas características morfológicas dificultaron en gran medida la manipulación de los brotes para individualizarlos en el recuento de los mismos, para multiplicarlos, así como para el posterior estudio de enraizamiento.

Transcurridas cuatro semanas en cultivo *in vitro* con cada una de las citoquininas los datos del recuento de número de brotes obtenidos, se analizaron mediante un análisis multivariante, mostrando diferencias significativas (**Fig. 4.5**), entre cada una de ellas ($F=1148.742$; $P<0.001$), a las diferentes concentraciones ($F=8.749$; $P<0.001$); la presencia de la auxina AIB a una única concentración 0.1 mgL^{-1} también mostró diferencias significativas frente a la ausencia de esta auxina en todos los tratamientos con las diferentes citoquininas estudiadas para este cultivar ($F=27.363$; $P<0.001$).

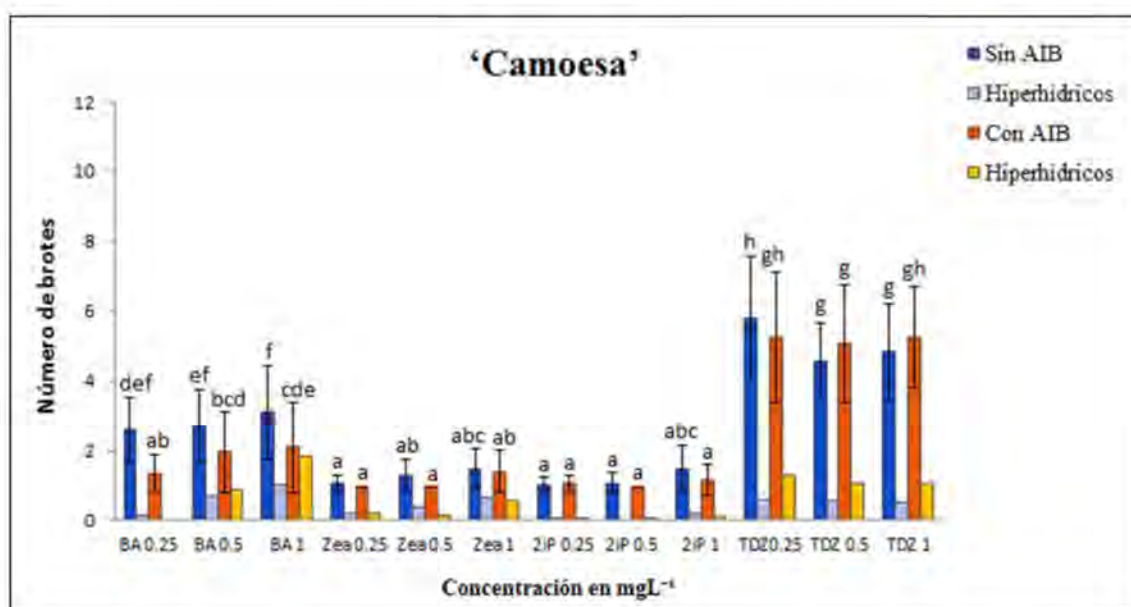


Figura 4.5 Representación gráfica de las medias del número de brotes obtenidos en este cultivar con las cuatro citoquininas, a las tres concentraciones, combinadas o no con AIB. Letras diferentes sobre los histogramas indican diferencias significativas entre tratamientos.

Después de cuatro semanas de cultivo, el aspecto morfológico de los brotes axilares desarrollados en cada uno de los tratamientos con las diferentes concentraciones de cada una de las citoquininas, con y sin AIB, fue tenido en cuenta para la elección del mejor medio de multiplicación de este cultivar (**Fig. 4.6**).

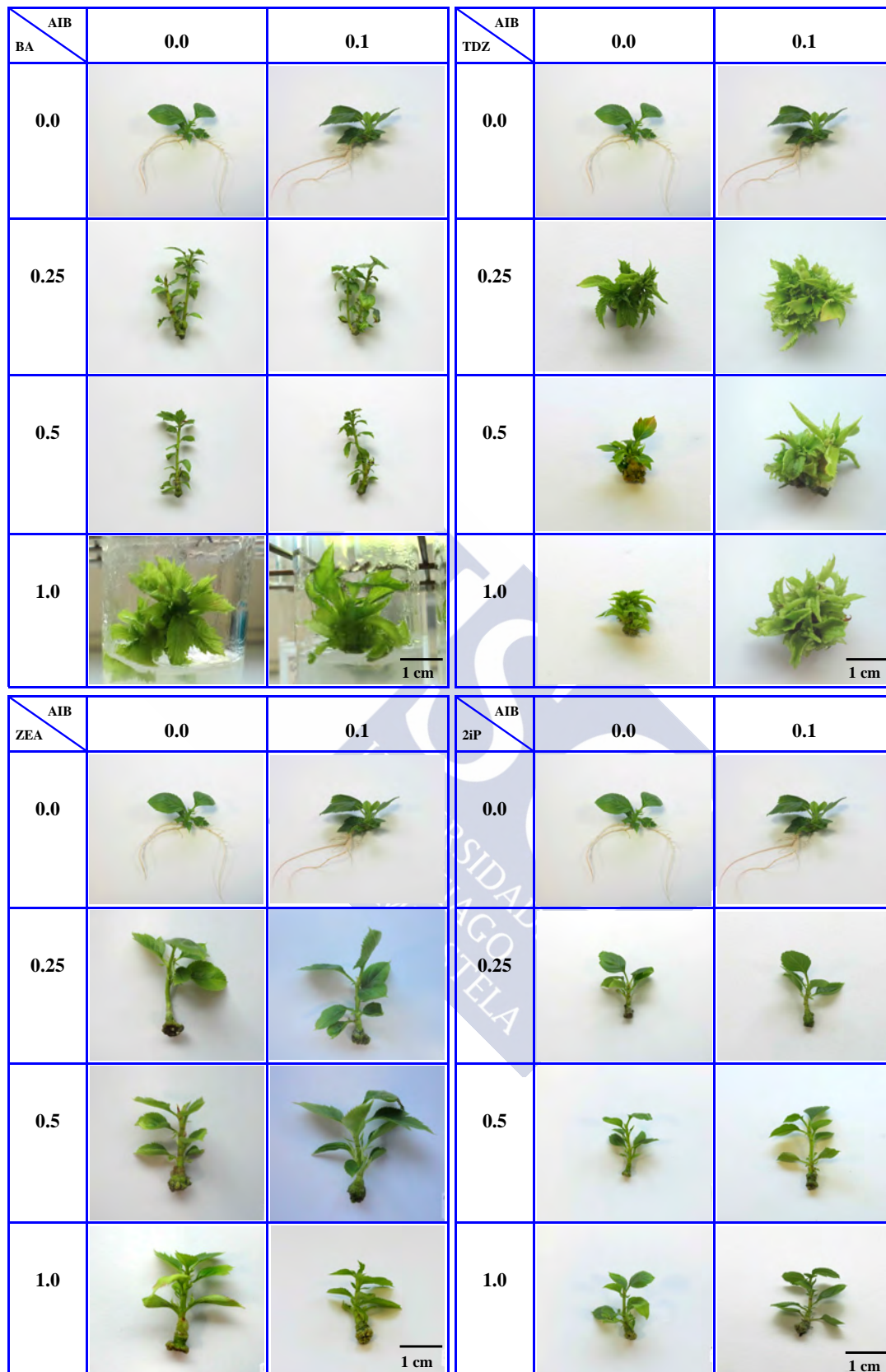


Figura 4.6 Aspecto morfológico de los brotes desarrollados con las diferentes concentraciones de las cuatro citoquininas (BA, Zea, 2iP y TDZ) con o sin AIB en la etapa de multiplicación.

Cultivar ‘Gravillán’

El análisis estadístico de los datos obtenidos del recuento del número de brotes con las distintas combinaciones de las cuatro citoquininas a diferentes concentraciones, mostraron entre ellas diferencia significativa para este cultivar.

El aspecto de los brotes desarrollados en los distintos tratamientos con BA, tanto con AIB como sin él, fue normal, con hojas ovaladas, características de este cultivar, y de color verde claro. Los tallos presentaban mayor longitud frente a los obtenidos en los tratamientos con las otras citoquininas probadas, facilitando así su manejo en fases posteriores como fue la inmersión basal de los brotes utilizados para el enraizamiento en una solución de auxina. El mejor resultado de multiplicación se alcanzó cuando se utilizó esta citoquinina a una concentración de 0.5 mgL^{-1} sin combinar con AIB, dando una media de 3.33 brotes de los cuales una media de 2.30 fueron brotes hiperhídricos, lo que representa un 69.6% del total. El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre los diferentes tratamientos con esta citoquinina ($F=8.162$; $P<0.001$).

En los tratamientos con Zeatina, los brotes axilares formados presentaron un aspecto normal en su desarrollo. El mejor resultado obtenido en la multiplicación de brotes con Zeatina fue a una concentración de 1 mgL^{-1} y sin la presencia de la auxina AIB, en el que la media fue de 2.02 brotes por explanto y la media de brotes hiperhídricos fue muy baja siempre <1 . El test ANOVA mostró diferencias significativas en cuanto al número de brotes entre todos los tratamientos con esta citoquinina ($F=15.576$; $P<0.001$).

En los tratamientos con la citoquinina 2iP se observó un crecimiento normal de los brotes cultivados siendo, sin embargo, la tasa de multiplicación de yemas axilares la más baja de todos los tratamientos probados con este cultivar, con una media de solo 1.78 brotes por explanto. La formación de brotes hiperhídricos también fue baja con una media de 0.56 brotes lo que representa un 31.4% del total. El análisis estadístico de los datos (**Tabla 4.6**) mostró diferencias significativas entre todos los tratamientos con esta citoquinina ($F=34.926$; $P<0.001$).

Tabla 4.6 Resultados de las medias obtenidas por la acción de distintas concentraciones de BA, Zea, 2iP y TDZ, con o sin AIB, en número de brotes axilares después de 4 semanas de cultivo.

Cultivar ‘Gravillán’				
Citoquininas	Concentración (mgL⁻¹)	AIB (mgL⁻¹)	Media del número total de brotes ± DE	Media de brotes hiperhídricos ± DE
BA	0.25	0	1.91 ± 1.00	1.57 ± 0.77
		0.1	2.02 ± 0.96	0.61 ± 0.94
	0.5	0	3.33 ± 1.53	2.30 ± 1.53
		0.1	2.50 ± 1.71	1.48 ± 1.18
	1	0	2.74 ± 1.52	2.33 ± 1.37
		0.1	2.83 ± 1.36	1.69 ± 1.44
Zea	0.25	0	1.39 ± 0.49	0.00 ± 0.00
		0.1	1.09 ± 0.29	0.00 ± 0.00
	0.5	0	1.56 ± 0.63	0.00 ± 0.00
		0.1	1.35 ± 0.52	0.19 ± 0.39
	1	0	2.02 ± 0.79	0.96 ± 1.08
		0.1	1.61 ± 0.63	0.00 ± 0.00
2iP	0.25	0	1.00 ± 0.00	0.06 ± 0.23
		0.1	1.00 ± 0.00	0.02 ± 0.14
	0.5	0	1.15 ± 0.36	0.20 ± 0.45
		0.1	1.19 ± 0.39	0.17 ± 0.42
	1	0	1.78 ± 0.63	0.56 ± 0.84
		0.1	1.61 ± 0.56	0.43 ± 0.72
TDZ	0.25	0	6.96 ± 2.16	2.76 ± 1.83
		0.1	6.22 ± 1.97	2.20 ± 1.84
	0.5	0	5.81 ± 1.37	3.87 ± 1.87
		0.1	5.06 ± 1.25	2.37 ± 1.72
	1	0	4.57 ± 1.14	3.00 ± 1.87
		0.1	6.46 ± 1.73	2.22 ± 2.05

Para los cultivos que crecieron en medio MS con TDZ, el aspecto morfológico de los explantos, al igual que con otros cultivares, fue muy diferente de los brotes desarrollados en medio basal o bien con otras citoquininas como BA o Zeatina. En los tratamientos con TDZ se constató la formación de un elevado número de yemas con tallo diminuto, arracimadas, en la base extremadamente engrosada del tallo del explanto inicial. De acuerdo con los datos, la mayor media de 6.96 brotes por explanto se logró con TDZ a una concentración de 0.25 mgL^{-1} sin AIB. Sin embargo, con este tratamiento, la media de brotes hiperhídricos fue de 2.76, representando un 39.6% del total de brotes formados. Según el test ANOVA, hay diferencias significativas en cuanto a la media de brotes por explanto con esta citoquinina ($F=15.937$; $P<0.001$). El número total de brotes de 'Gravillán' desarrollados en los 24 tratamientos probados, después de 4 semanas de cultivo, fueron analizados con un análisis multivariante tanto para el factor citoquinina (**Fig. 4.7**), dando diferencias significativas entre cada una de las cuatro ($F=1126.047$; $P<0.001$) así como para el factor concentración ($F=6.261$; $P<0.001$). Sin embargo, la presencia de AIB no fue significativa en ninguno de los tratamientos. El diferente aspecto morfológico de los brotes con cada tratamiento ha servido para elegir el medio de multiplicación adecuado para este cultivar (**Fig. 4.8**).

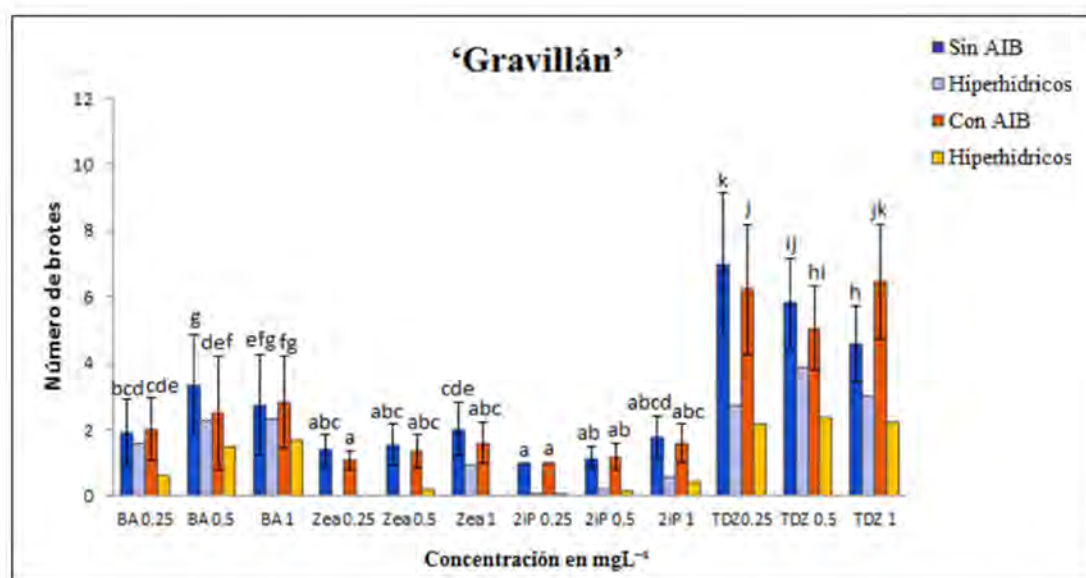


Figura 4.7 Representación gráfica de las medias del número de brotes obtenidos en este cultivar con las cuatro citoquininas, a las tres concentraciones, combinadas o no con AIB. Letras diferentes sobre los histogramas indican diferencias significativas entre tratamientos.

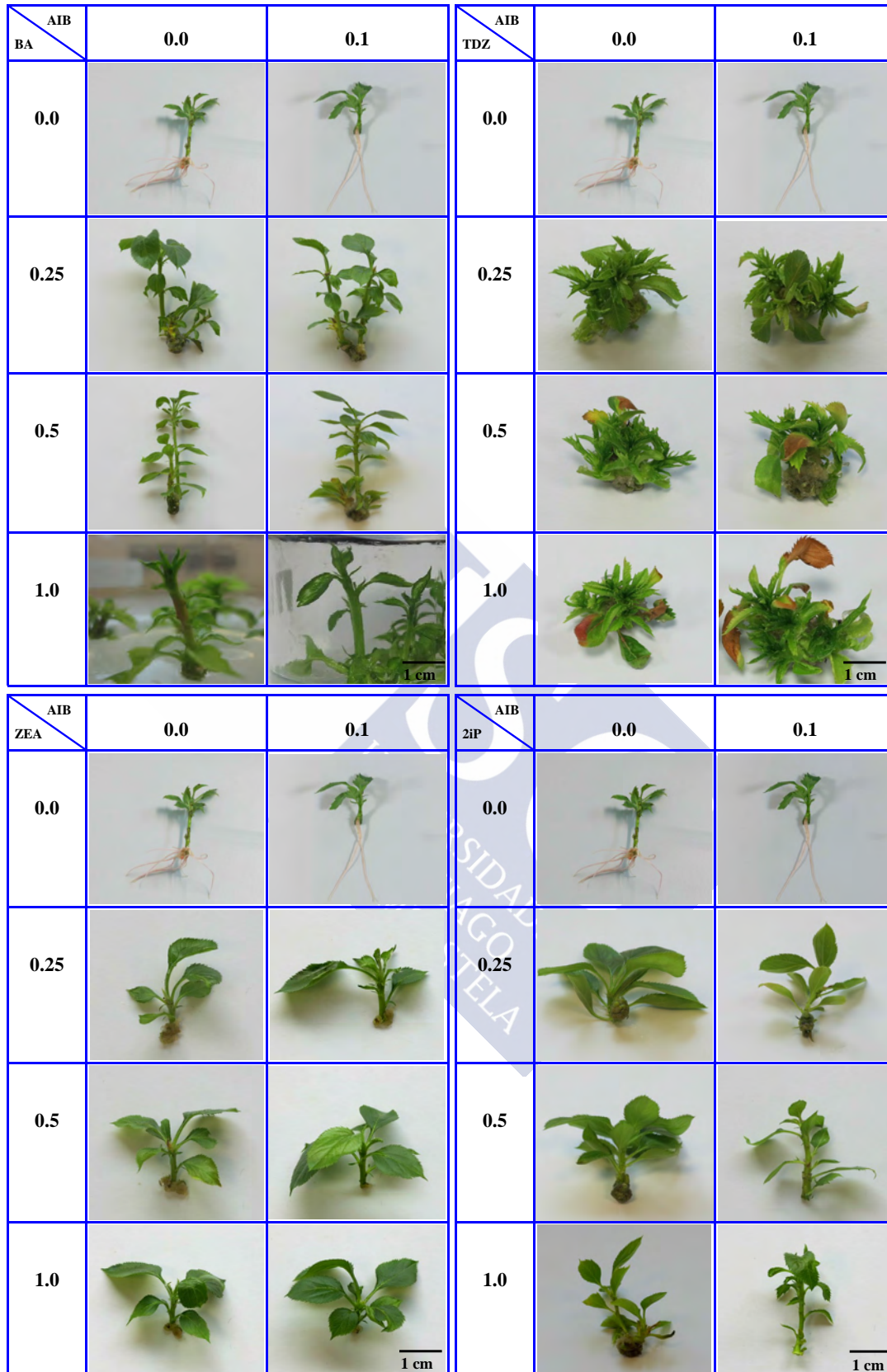


Figura 4.8 Aspecto morfológico de los brotes desarrollados con las diferentes concentraciones de las cuatro citoquininas (BA, Zea, 2iP y TDZ) con o sin AIB en la etapa de multiplicación.

Cultivar ‘José Antonio’

Para este cultivar nuevamente fue la citoquinina TDZ la que indujo el desarrollo de un mayor número de brotes, a la concentración de 1 mgL^{-1} , combinada con la auxina AIB alcanzando una media total de 7.37 brotes por explanto. Frente a las otras citoquininas estudiadas ha sido TDZ, a cualquiera de las concentraciones utilizadas, con o sin auxina, con la que se obtuvo la mayor tasa de multiplicación. Sin embargo, en cualquiera de los tratamientos, la formación de brotes hiperhídricos también tuvo una media muy alta de 5.46, considerándose este 74% como brotes no viables, por su aspecto engrosado, tallo muy corto y hojas curvadas y engrosadas que presentaban. Estos brotes junto con los no hiperhídricos se desarrollaron en todos los casos de manera apiñada, formando un conjunto muy compacto, dificultando así la manipulación y su recuento. El análisis estadístico de los datos recogidos mostró diferencias significativas entre todos los tratamientos cuando esta citoquinina estuvo presente en el medio de cultivo a cualquiera de las concentraciones probadas ($F=18.367$; $P<0.001$).

Los brotes desarrollados con la presencia de BA en el medio de cultivo, presentaron un aspecto normal en su desarrollo, con entrenudos largos y mayor longitud del tallo. Los largos brotes axilares bien desarrollados eran independientes facilitando su recuento. La tasa de multiplicación del cultivar ‘José Antonio’, con las distintas concentraciones de BA y combinaciones, fue alta alcanzando una media máxima de 3.83 brotes por explanto cuando esta citoquinina se añadió al medio de cultivo a una concentración de 1 mgL^{-1} . La formación de brotes hiperhídricos con esta citoquinina fue escasa con valores medios siempre <1 . El análisis de los datos mostró diferencias significativas entre todos los tratamientos con BA ($F=37.724$; $P<0.001$).

Con la citoquinina 2iP presente en el medio, los brotes cultivados tuvieron siempre menor respuesta en el desarrollo de brotes axilares, consiguiendo una baja tasa de multiplicación de tan solo 1.39 brotes por explanto, aunque fue el valor medio más alto alcanzado cuando se utilizó 2iP a una concentración de 1 mgL^{-1} en el medio de cultivo. Sin embargo, el desarrollo morfológico de los explantos era bueno, presentaba aspecto normal, con hojas grandes ovaladas bien desarrolladas y con un diámetro de los tallos similar al control (**Tabla 4.7**).

Tabla 4.7 Resultados de las medias obtenidas por la acción de distintas concentraciones de BA, Zea, 2iP y TDZ, con o sin AIB, en número de brotes axilares después de 4 semanas de cultivo.

Cultivar 'José Antonio'				
Citoquininas	Concentración (mgL⁻¹)	AIB (mgL⁻¹)	Media del número total de brotes ± DE	Media de brotes hiperhídricos ± DE
BA	0.25	0	1.20 ± 0.40	0.00 ± 0.00
		0.1	2.00 ± 0.72	0.00 ± 0.00
	0.5	0	1.65 ± 0.73	0.09 ± 0.35
		0.1	2.65 ± 0.93	0.00 ± 0.00
	1	0	3.83 ± 1.93	0.70 ± 0.90
		0.1	2.94 ± 1.42	0.15 ± 0.36
Zea	0.25	0	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
		0.1	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	0.5	0	1.09 ± 0.29	0.00 ± 0.00
		0.1	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	1	0	1.39 ± 0.65	0.00 ± 0.00
		0.1	1.44 ± 0.53	0.00 ± 0.00
2iP	0.25	0	1.02 ± 0.13	0.00 ± 0.00
		0.1	1.04 ± 0.19	0.00 ± 0.00
	0.5	0	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
		0.1	1.07 ± 0.26	0.00 ± 0.00
	1	0	1.39 ± 0.56	0.00 ± 0.00
		0.1	1.22 ± 0.46	0.00 ± 0.00
TDZ	0.25	0	4.39 ± 1.90	2.93 ± 2.14
		0.1	5.80 ± 3.11	2.98 ± 2.57
	0.5	0	4.59 ± 1.46	4.56 ± 1.42
		0.1	5.57 ± 2.12	3.26 ± 2.40
	1	0	4.09 ± 1.30	4.09 ± 1.31
		0.1	7.37 ± 2.10	5.46 ± 2.83

En el caso de los tratamientos con Zeatina a distintas concentraciones, a pesar de conseguir un desarrollo normal de los brotes con aspecto vigoroso, la fase de multiplicación y desarrollo de los brotes axilares no fue efectiva alcanzando, con tan solo 1.44 brotes, la mejor media de multiplicación cuando se cultivaron en un medio con Zeatina 1 mgL^{-1} combinada con la auxina AIB 0.1 mgL^{-1} . Es importante destacar que en ninguno de los tratamientos tanto con Zeatina como con 2iP, hubo formación de brotes hiperhídricos.

Con un análisis multivariante, la tasa de multiplicación lograda con este cultivar presentó diferencias significativas (**Fig. 4.9**), entre las cuatro citoquininas ($F=847.441$; $P<0.001$), así como las tres concentraciones empleadas ($F=50.271$; $P<0.001$). La presencia de la auxina o no en los medios de cultivo también mostró diferencia significativa ($F=63.718$; $P<0.001$).

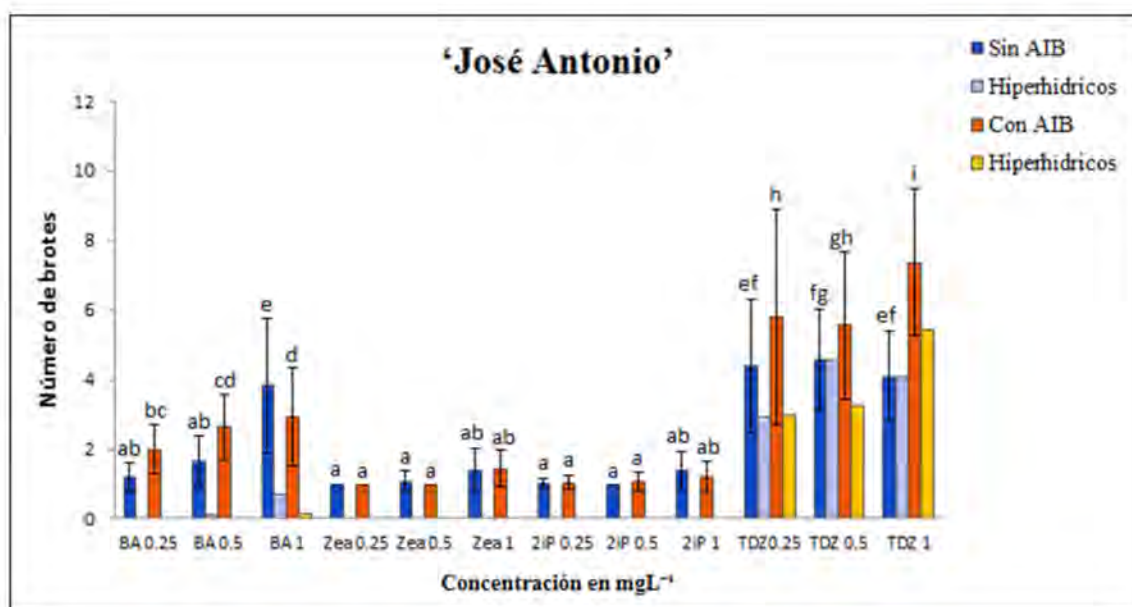


Figura 4.9 Representación gráfica de las medias del número de brotes obtenidos con las cuatro citoquininas a las tres concentraciones combinadas o no con AIB. Letras diferentes sobre los histogramas indican diferencias significativas entre tratamientos.

Después de cuatro semanas en cultivo, el aspecto morfológico de los brotes axilares desarrollados fue diferente en cada uno de los tratamientos (**Fig. 4.10**).

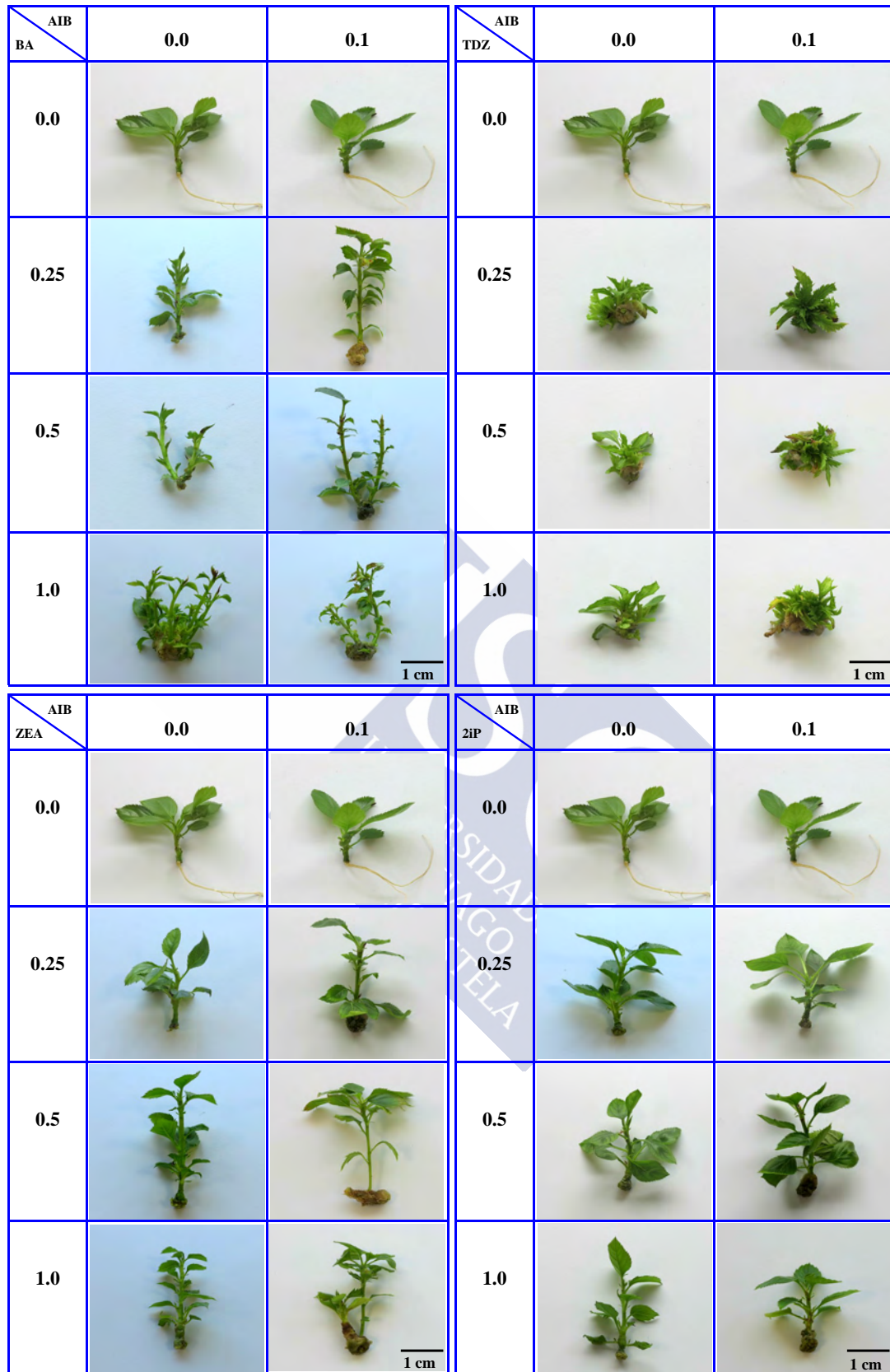


Figura 4.10 Aspecto morfológico de los brotes desarrollados con las diferentes concentraciones de las cuatro citoquininas (BA, Zea, 2iP y TDZ) con o sin AIB en la etapa de multiplicación.

Cultivar ‘Ollou Mouro’

El análisis estadístico de los datos relativos al número de brotes axilares obtenidos en la multiplicación de este cultivar, mostró diferencias significativas en todos los tratamientos con las diferentes citoquininas. La presencia de BA añadida al medio de cultivo fue favorable en el desarrollo de brotes axilares, presentando estos un ligero engrosamiento de los tallos, respecto al control en medio basal MS0. Para este cultivar, en todos los tratamientos cuando estuvo presente BA en el medio de cultivo, el aspecto de las hojas desarrolladas fue normal en su forma, pero más pequeñas que en el control mientras que la longitud de los tallos fue mayor. La media más alta de brotes alcanzada de 2.46 brotes por explanto, en la multiplicación se obtuvo en los cultivos con una concentración de 1 mgL⁻¹ de BA. El análisis de los datos mostró diferencias significativas en todos los tratamientos para esta citoquinina (F= 19.804; P<0.001).

Por otro lado, para este cultivar, la presencia de Zeatina en el medio de cultivo apenas produjo efecto en la etapa de multiplicación de los brotes, consiguiendo la media más alta, de tan solo 1.31 brotes por explanto, cuando se utilizó a una concentración de 1 mgL⁻¹ combinada con la auxina AIB 0.1 mgL⁻¹. La formación de brotes hiperhídricos también fue escasa en todos los tratamientos con esta citoquinina. Sin embargo, el desarrollo de los brotes presentó un aspecto morfológico normal y bueno, con hojas grandes de color verde intenso, entrenudos largos y un diámetro de tallo normal.

En el caso de los brotes que crecieron en medio de cultivo que contenía 2iP, el aspecto de los brotes desarrollados fue normal, con hojas bien desarrolladas y grandes, características de este cultivar, y diámetro de los tallos parecidos al control. Sin embargo, la presencia de esta citoquinina en los medios de cultivo tampoco fue efectiva en la fase de multiplicación para incrementar el número de yemas axilares, permaneciendo el brote inicial sin formar apenas brotes laterales, logrando así una media máxima de tan solo 1.41 brotes por explanto, cuando la citoquinina 2iP fue añadida en el medio de cultivo a una concentración de 1 mgL⁻¹ y combinada con 0.1 mgL⁻¹ de la auxina AIB (**Tabla 4.8**).

Tabla 4.8 Resultados de las medias obtenidas por la acción de distintas concentraciones de BA, Zea, 2iP y TDZ, con o sin AIB, en número de brotes axilares después de 4 semanas de cultivo.

Cultivar ‘Ollo Mouro’					
Citoquininas	Concentración (mgL⁻¹)	AIB (mgL⁻¹)	Media del número total de brotes ± DE	Media de brotes hiperhídricos ± DE	
BA	0.25	0	1.22 ± 0.46	0.72 ± 0.45	
		0.1	1.61 ± 0.60	0.00 ± 0.00	
	0.5	0	1.67 ± 0.80	1.39 ± 0.60	
		0.1	1.81 ± 0.70	0.04 ± 0.27	
	1	0	2.46 ± 1.16	1.72 ± 0.90	
		0.1	2.37 ± 0.81	0.00 ± 0.00	
	Zea	0.25	0	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
			0.1	1.06 ± 0.23	0.00 ± 0.00
0.5		0	1.00 ± 0.00	0.13 ± 0.34	
		0.1	1.04 ± 0.19	0.13 ± 0.39	
1		0	1.20 ± 0.45	0.09 ± 0.29	
		0.1	1.31 ± 0.51	0.07 ± 0.26	
2iP		0.25	0	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
			0.1	1.02 ± 0.14	0.09 ± 0.29
	0.5	0	1.04 ± 0.19	0.00 ± 0.00	
		0.1	1.11 ± 0.32	0.07 ± 0.26	
	1	0	1.24 ± 0.51	0.00 ± 0.00	
		0.1	1.41 ± 0.57	0.24 ± 0.47	
	TDZ	0.25	0	3.65 ± 1.23	3.46 ± 1.41
			0.1	3.13 ± 1.36	1.52 ± 1.34
0.5		0	2.20 ± 1.09	2.19 ± 1.10	
		0.1	2.70 ± 1.13	2.24 ± 1.21	
1		0	2.48 ± 1.48	2.48 ± 1.48	
		0.1	3.15 ± 1.04	2.93 ± 1.36	

En la fase de multiplicación los mejores resultados para este cultivar, se consiguieron en medios de cultivo adicionados con casi todas las concentraciones de TDZ probadas, logrando alcanzar la media de brotes axilares más alta frente a las demás citoquininas, con una media de 3.65 brotes laterales desarrollados por explanto, con TDZ 0.25 mgL⁻¹ sin AIB. Sin embargo, con este tratamiento se produjo también gran cantidad de brotes hiperhídricos inviables, con una media de 3.46, lo que representa un 94.79% del total. El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre los tratamientos con esta citoquinina (F=9.797; P<0.001). El análisis multivariante de los datos de la multiplicación de brotes para este cultivar, después de cuatro semanas de cultivo, mostró diferencias significativas (**Fig. 4.11**) entre las cuatro citoquininas estudiadas (F=386.851; P<0.001), a las diferentes concentraciones (F=27.553; P<0.001) así como para la presencia de la auxina en los distintos tratamientos (F=9.291; P<0.001). Otro aspecto a considerar en los resultados con TDZ fue el aspecto morfológico de los brotes, con hojas muy rizadas, pequeñas y engrosadas, y disposición de los brotes agrupados, casi apiñados en la base del tallo del explanto inicial. Algunos de estos brotes se podían aislar fácilmente, pero la gran cantidad de callo basal producido y el apiñamiento de los brotes dificultaban, en gran medida, el recuento de los mismos, así como distinguir su origen, bien axilar o adventicio (**Fig. 4.12**).

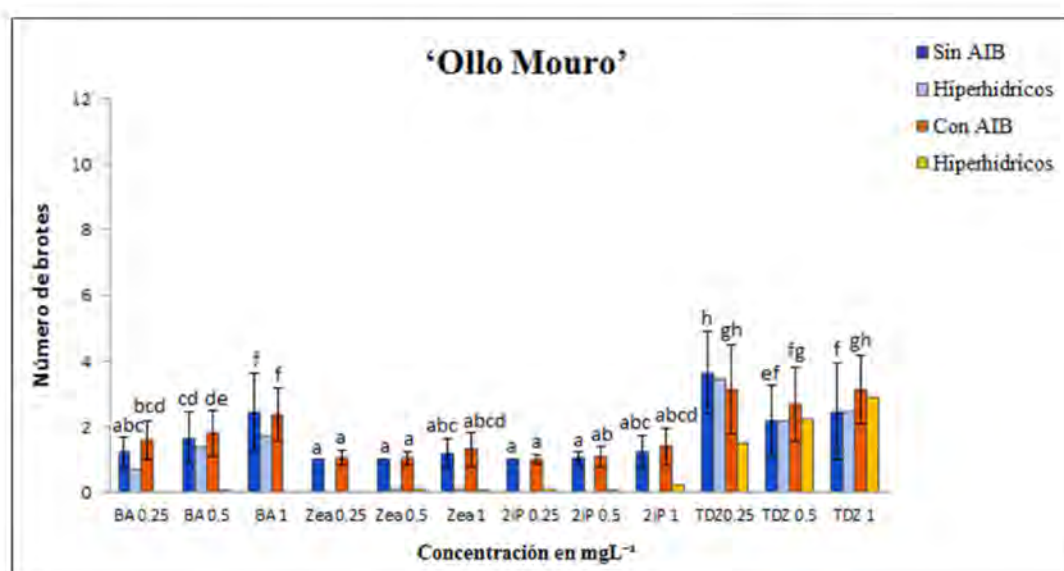


Figura 4.11 Representación gráfica de las medias del número de brotes obtenidos con las cuatro citoquininas a las tres concentraciones combinadas o no con AIB. Letras diferentes sobre los histogramas indican diferencias significativas entre tratamientos.

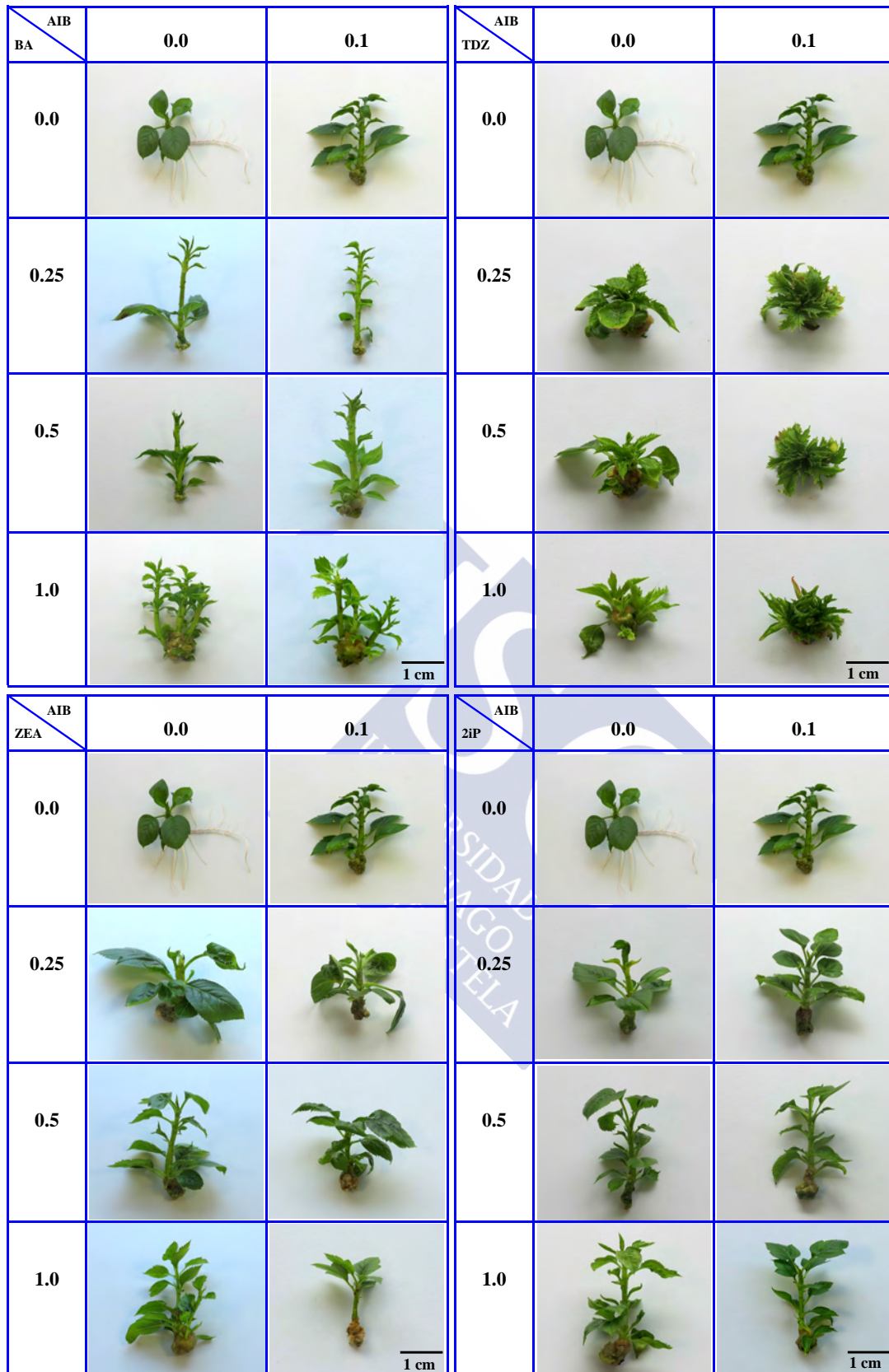


Figura 4.12 Aspecto morfológico de los brotes desarrollados con las diferentes concentraciones de las cuatro citoquininas (BA, Zea, 2iP y TDZ) con o sin AIB en la etapa de multiplicación.

Cultivar ‘Príncipe Grande’

De los veinticuatro tratamientos con las diferentes concentraciones de las cuatro citoquininas probadas fue en los explantos cultivados en medio con 0.5 mgL^{-1} de TDZ donde se consiguió una mayor tasa de multiplicación alcanzando una media de 8.26 brotes por explanto. Sin embargo, más de la mitad de ellos fueron hiperhídricos, con una media de 4.37, considerándolos como no viables. El aspecto morfológico de los brotes desarrollados en este cultivar fue semejante a los obtenidos con TDZ en otros cultivares de manzano, de hojas contraídas de bordes rizados, que difieren mucho del aspecto normal de las hojas formadas en los brotes del control de este cultivar y en los obtenidos con otras citoquininas como BA o Zeatina. Los brotes hiperhídricos se desarrollaron de forma apiñada con las hojas muy rizadas, tallos diminutos de tan solo unos pocos milímetros, dificultando su recuento y la posible manipulación posterior en fases como el repique o el enraizamiento. El análisis estadístico de los datos mostró diferencias significativas entre todos los tratamientos con TDZ ($F= 12.610$; $P<0.001$).

En el caso de los tratamientos con BA, la tasa de multiplicación de los brotes fue alta, con un desarrollo normal de brotes. Con esta citoquinina se alcanzó la máxima tasa de multiplicación de brotes laterales con una media de 4.24 brotes por explanto, cuando se añadió 1 mgL^{-1} de BA al medio de cultivo combinado con 0.1 mgL^{-1} de la auxina AIB. Es importante destacar que en todos los tratamientos con BA no hubo formación de brotes hiperhídricos, siendo todos viables y favoreciendo así el posterior enraizamiento de los brotes. Según el test ANOVA los resultados de multiplicación de brotes laterales (**Tabla 4.9**) con esta citoquinina mostraron diferencias significativas entre todos sus tratamientos para este cultivar ($F= 62.370$; $P<0.001$).

Cuando se utilizó Zeatina en los medios de cultivo para el desarrollo de brotes axilares, se obtuvo una tasa de multiplicación muy baja, cercana a 1, siendo la media más alta obtenida de tan solo 1.07 brotes por explanto con 1 mgL^{-1} de Zeatina combinada con 0.1 mgL^{-1} de AIB. Los brotes desarrollados presentaban un aspecto normal, respecto al control, con hojas grandes ovaladas de borde muy aserrado, característica de este cultivar. La formación de brotes hiperhídricos fue prácticamente nula.

Tabla 4.9 Resultados de las medias obtenidas por la acción de distintas concentraciones de BA, Zea, 2iP y TDZ, con o sin AIB, en número de brotes axilares después de 4 semanas de cultivo.

Cultivar 'Príncipe Grande'					
Citoquininas	Concentración (mgL⁻¹)	AIB (mgL⁻¹)	Media del número total de brotes ± DE	Media de brotes hiperhídricos ± DE	
BA	0.25	0	1.28 ± 0.49	0.00 ± 0.00	
		0.1	1.65 ± 0.76	0.00 ± 0.00	
	0.5	0	2.11 ± 1.06	0.00 ± 0.00	
		0.1	2.06 ± 0.71	0.00 ± 0.00	
	1	0	4.04 ± 1.77	0.00 ± 0.00	
		0.1	4.24 ± 1.64	0.00 ± 0.00	
	Zea	0.25	0	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
			0.1	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.5		0	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	
		0.1	1.04 ± 0.19	0.07 ± 0.26	
1		0	1.04 ± 0.19	0.00 ± 0.00	
		0.1	1.07 ± 0.26	0.00 ± 0.00	
2iP		0.25	0	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
			0.1	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	0.5	0	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	
		0.1	1.04 ± 0.19	0.00 ± 0.00	
	1	0	1.07 ± 0.26	0.00 ± 0.00	
		0.1	1.09 ± 0.29	0.00 ± 0.00	
	TDZ	0.25	0	5.80 ± 2.59	1.06 ± 1.47
			0.1	5.81 ± 3.51	0.00 ± 0.00
0.5		0	8.26 ± 2.30	4.37 ± 3.04	
		0.1	4.96 ± 2.17	1.13 ± 1.66	
1		0	8.07 ± 2.78	2.50 ± 2.99	
		0.1	7.50 ± 3.52	2.13 ± 2.14	

En todos los tratamientos con la citoquinina 2iP, con o sin AIB, el aspecto morfológico que presentaban los brotes desarrollados fue normal similares al control o a los brotes iniciales. Los tallos presentaban menor longitud frente a otros tratamientos como con BA. Sin embargo, la tasa de multiplicación con 2iP fue bastante baja con medias de prácticamente un solo brote por explanto, en todos los tratamientos, sin llegar a desarrollar brotes laterales. Al mismo tiempo hay que señalar que no se produjo la formación de brotes hiperhídricos en ninguna de las combinaciones utilizadas cuando 2iP, estuvo presente en los medios de cultivo.

Los resultados del análisis estadístico multivariante de los datos obtenidos en la fase de multiplicación para este cultivar mostraron diferencias significativas (**Fig. 4.13**) entre los distintos tratamientos con las cuatro citoquininas ($F= 978.396$; $P<0.001$), también mostró diferencia significativa para el factor concentración ($F= 67.792$; $P<0.001$), así como para la presencia de auxina en los medios de cultivo ($F=9.596$; $P<0.001$). Así mismo, se muestra el diferente aspecto morfológico de los brotes de este cultivar con cada tratamiento después de cuatro semanas de cultivo (**Fig. 4.14**).

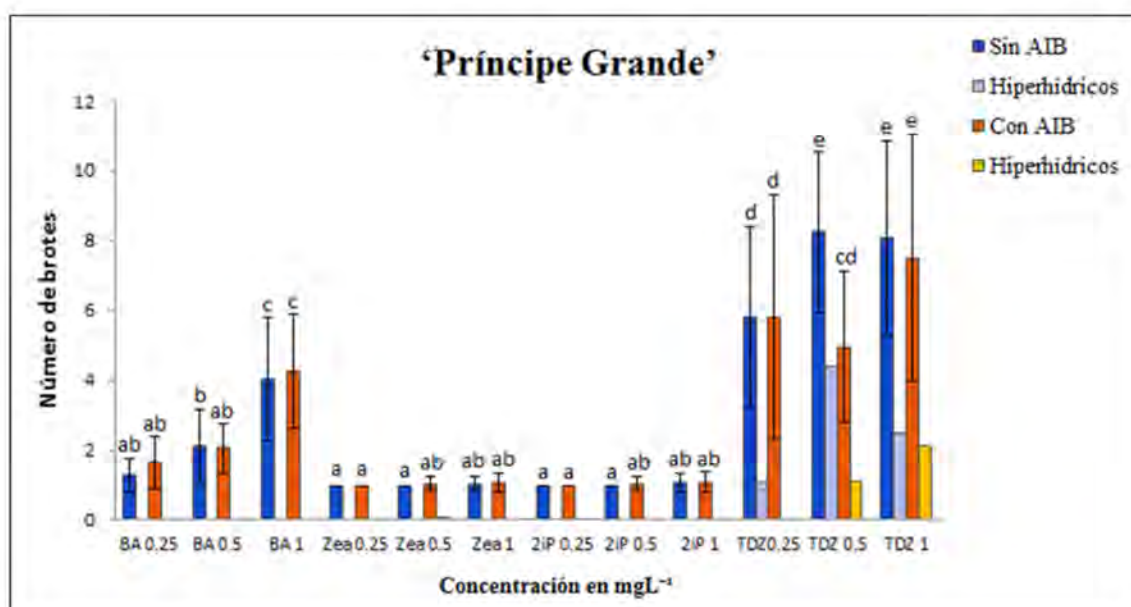


Figura 4.13 Representación gráfica de las medias del número de brotes obtenidos con las cuatro citoquininas a las tres concentraciones combinadas o no con AIB. Letras diferentes sobre los histogramas indican diferencias significativas entre tratamientos.

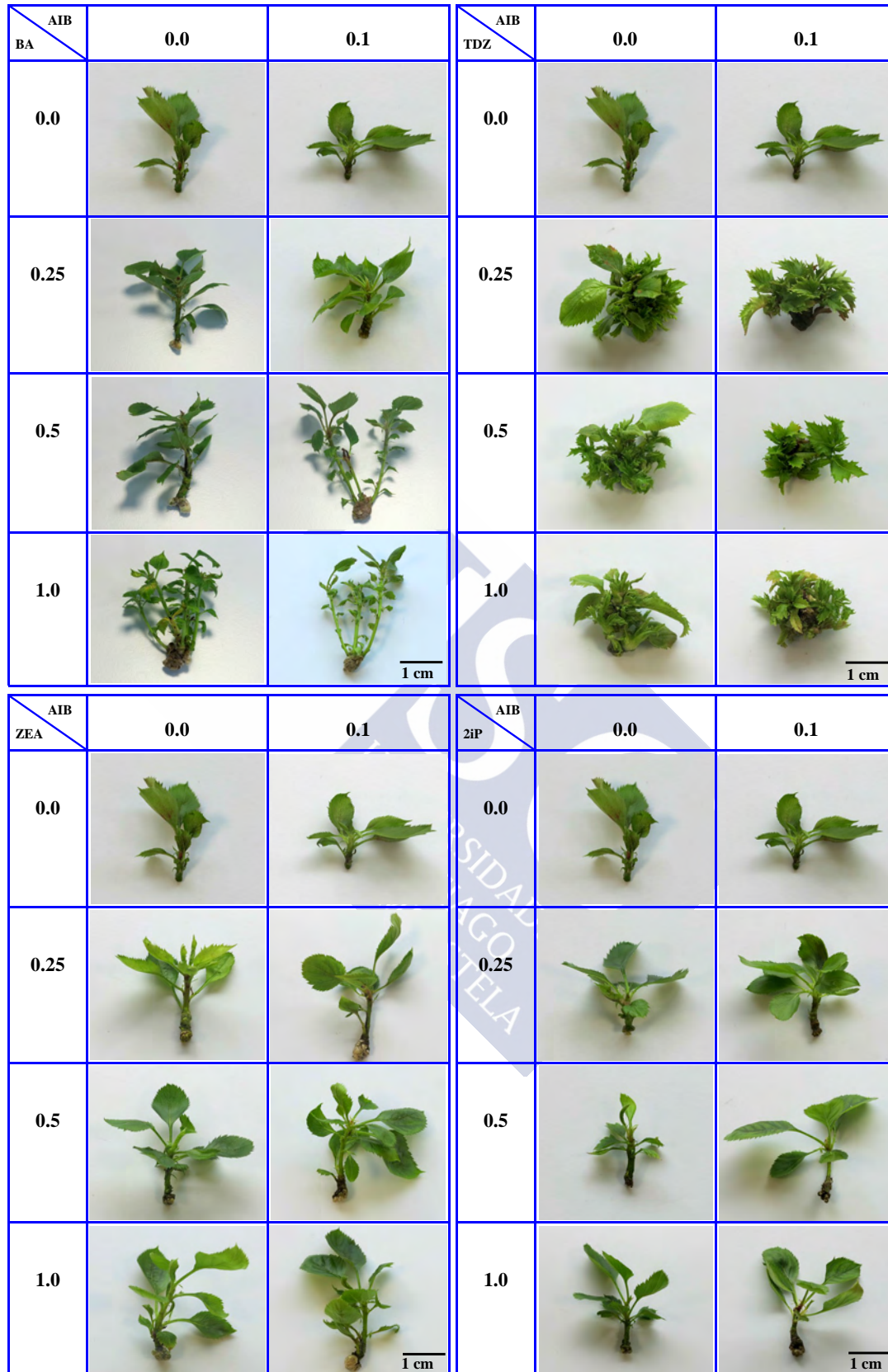


Figura 4.14 Aspecto morfológico de los brotes desarrollados con las diferentes concentraciones de las cuatro citoquininas (BA, Zea, 2iP y TDZ) con o sin AIB en la etapa de multiplicación.

Cultivar ‘Repinaldo’

Para la multiplicación de brotes del cultivar ‘Repinaldo’, los distintos tratamientos con las tres concentraciones probadas de la citoquinina TDZ, dieron una respuesta buena ya que se desarrolló un número mayor de brotes en los cultivos que con las otras citoquininas estudiadas. En cuanto al aspecto morfológico de los brotes, estos se formaron de manera agrupada en la base engrosada del tallo del explanto inicial, cubiertos en ocasiones con algo de callo por la base. Las hojas eran pequeñas, curvadas y con el borde irregular y ondeado. Los brotes formados estaban tan juntos que daba al conjunto de cada explanto un aspecto compacto, apiñado, dificultando su recuento y posterior manejo para enraizar. La media de brotes axilares alcanzada con esta citoquinina TDZ a la concentración de 0.5 mgL^{-1} combinada con 0.1 mgL^{-1} de la auxina AIB, fue de 5.41 brotes por explanto. El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre todos los tratamientos probados con esta citoquinina ($F= 9.168$; $P<0.001$).

Los brotes desarrollados en medios con BA, alcanzaron una media de multiplicación alta de 3.89 brotes por explanto cuando se utilizó a una concentración de 1 mgL^{-1} sin la presencia de AIB. También el tratamiento con 0.5 mgL^{-1} de BA produjo una media de 3.37 brotes, sin formar hiperhídricos. En todos los casos, los brotes desarrollados con BA fueron de aspecto normal en cuanto a forma de hojas y longitud del tallo. El análisis estadístico de los datos mostró diferencias significativas entre todos los tratamientos con esta citoquinina ($F= 33.512$; $P<0.001$).

En los brotes de ‘Repinaldo’ que crecieron cultivados en medio con Zeatina el desarrollo de los brotes laterales fue escaso y, por lo tanto, como en casi todos los cultivares de manzano estudiados, se ha mostrado como una citoquinina poco adecuada para la multiplicación. Sin embargo, el aspecto morfológico de los brotes formados fue normal, ya que tenían hojas ovaladas de un intenso color verde y con tallos erguidos, no engrosados, de longitud casi doble que la inicial. En todos los tratamientos con Zeatina se obtuvo la menor respuesta en el desarrollo de brotes, con la media más alta de 1.15 brotes por explanto en el tratamiento con Zeatina 1 mgL^{-1} y AIB 0.1 mgL^{-1} y sin formación de hiperhídricos (**Tabla 4.10**).

Tabla 4.10 Resultados de las medias obtenidas por la acción de distintas concentraciones de BA, Zea, 2iP y TDZ, con o sin AIB, en el número de brotes axilares después de 4 semanas de cultivo.

Cultivar 'Repinaldo'					
Citoquininas	Concentración (mgL ⁻¹)	AIB (mgL ⁻¹)	Media del número total de brotes ± DE	Media de brotes hiperhídricos ± DE	
BA	0.25	0	1.56 ± 0.86	0.00 ± 0.00	
		0.1	1.56 ± 0.74	0.00 ± 0.00	
	0.5	0	3.37 ± 1.50	0.00 ± 0.00	
		0.1	1.70 ± 0.82	0.00 ± 0.00	
	1	0	3.89 ± 2.38	0.31 ± 0.51	
		0.1	1.74 ± 0.81	0.00 ± 0.00	
	Zea	0.25	0	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
			0.1	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.5		0	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	
		0.1	1.02 ± 0.14	0.00 ± 0.00	
1		0	1.02 ± 0.14	0.00 ± 0.00	
		0.1	1.15 ± 0.41	0.00 ± 0.00	
2iP		0.25	0	1.02 ± 0.14	0.00 ± 0.00
			0.1	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	0.5	0	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	
		0.1	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	
	1	0	1.37 ± 0.56	0.00 ± 0.00	
		0.1	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	
	TDZ	0.25	0	4.02 ± 1.68	0.06 ± 0.41
			0.1	3.02 ± 1.45	0.00 ± 0.00
0.5		0	3.74 ± 1.48	0.00 ± 0.00	
		0.1	5.41 ± 2.08	0.78 ± 1.34	
1		0	4.41 ± 2.03	0.00 ± 0.00	
		0.1	4.31 ± 2.58	1.11 ± 1.45	

Los tratamientos con la citoquinina 2iP en el medio de cultivo, tampoco fue efectiva en la etapa de multiplicación, mostrando valores significativamente similares a los tratamientos con Zeatina, es decir, sin desarrollo de brotes laterales, alcanzando la media más alta de 1.37 brotes por explanto. El desarrollo de los brotes fue normal, pero con un tallo de longitud menor frente a los tratamientos con BA. El estudio estadístico multivariante de los datos obtenidos (**Fig. 4.15**), después de cuatro semanas de cultivo, en la multiplicación de los brotes para este cultivar, mostró diferencias significativas respecto a las cuatro citoquininas ($F=503.296$; $P<0.001$), a las diferentes concentraciones utilizadas ($F=31.920$; $P<0.001$) así como para la presencia de la auxina AIB en los distintos tratamientos ($F=19.681$; $P<0.001$).

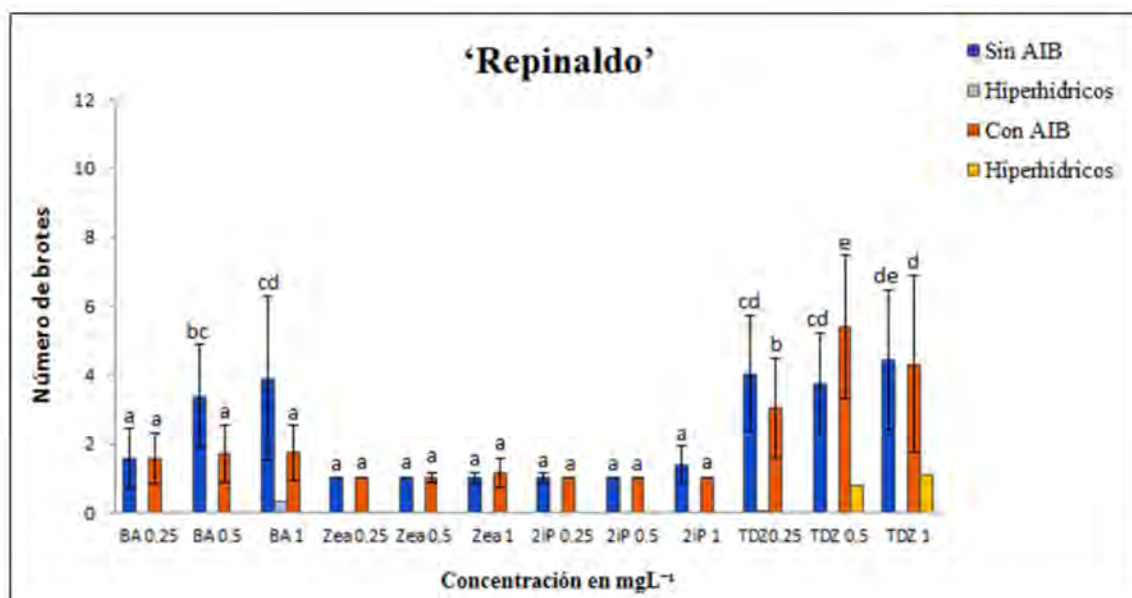


Figura 4.15 Representación gráfica de las medias del número de brotes obtenidos con las cuatro citoquininas a las tres concentraciones combinadas o no con AIB. Letras diferentes sobre los histogramas indican diferencias significativas entre tratamientos.

El aspecto morfológico de los brotes fue diferente en cada uno de los tratamientos con las distintas citoquininas, después de cuatro semanas en in vitro y fue tenido en cuenta para la elección del mejor medio de multiplicación de este cultivar (**Fig. 4.16**).

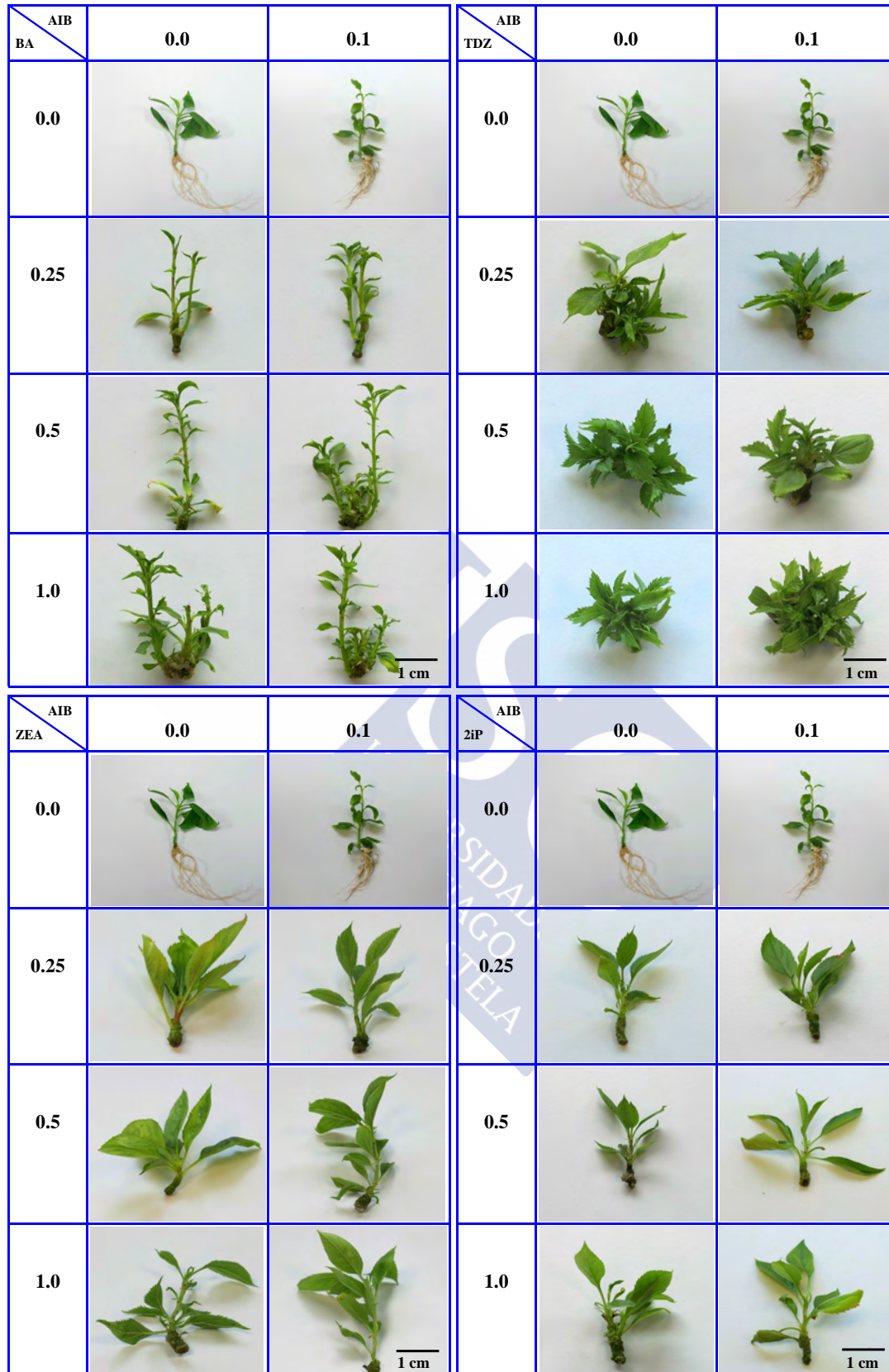


Figura 4.16 Aspecto morfológico de los brotes desarrollados con las diferentes concentraciones de las cuatro citoquininas (BA, Zea, 2iP y TDZ) con o sin AIB en la etapa de multiplicación.

Cultivar ‘Tres en Cunca’

En los distintos tratamientos con citoquininas y auxinas en este cultivar, tanto en multiplicación como en enraizamiento, ha sido el que más diferencias de respuesta presentó en relación a los otros siete cultivares de manzano estudiados. A diferencia de otros cultivares, la tasa de multiplicación en ‘Tres en Cunca’ fue muy similar al utilizar BA o TDZ, y en ningún caso se produjeron brotes hiperhídricos.

En la etapa de multiplicación en medios con BA los brotes desarrollados presentaban un aspecto normal, con hojas pequeñas ovales, longitud de los tallos regular con verticilos largos similar al control. A una concentración de 1 mgL^{-1} de BA combinada con 0.1 mgL^{-1} de la auxina AIB, se alcanzó la media más alta de 2.11 brotes por explanto inicial. El análisis de los datos mostró diferencias significativas entre todos los tratamientos con las distintas concentraciones de BA ($F=16.776$; $P<0.001$).

Según los resultados la citoquinina que proporcionó una tasa mayor de multiplicación de brotes del cultivar ‘Tres en Cunca’ fue TDZ, logrando una media de 2.87 brotes por explanto, cuando se cultivaron en un medio con 1 mgL^{-1} de TDZ combinado con 0.1 mgL^{-1} de AIB. Sin embargo, los brotes desarrollados no presentaban un aspecto normal pues los tallos eran diminutos con una coloración rojiza, tamaño de hojas irregular y formación de abundante callo en la parte basal del explanto inicial. El análisis de los datos mostró diferencias significativas en todos los tratamientos cuando TDZ estuvo presente en los medios de cultivo ($F=18.332$; $P<0.001$).

En el caso de todos los tratamientos con Zeatina junto con los de 2iP, con o sin presencia de AIB, se obtuvieron los peores resultados de multiplicación de este cultivar ya que la media estuvo, prácticamente, en un valor de 1. En ambos casos fueron poco efectivas y apenas hubo respuesta en el desarrollo de brotes axilares. Se obtuvieron los mejores valores de media de 1.06 brotes por explanto a una concentración de 1 mgL^{-1} de Zeatina combinado con 0.1 mgL^{-1} de AIB, y un valor medio de 1.04 brotes por explanto cuando se utilizó 1 mgL^{-1} de 2iP combinado con 0.1 mgL^{-1} de AIB. En cuanto al aspecto morfológico que presentaban los brotes para este cultivar fue normal en ambos casos, con desarrollo simétrico de las hojas, coloración del tallo verde, longitud de tallo y sin presencia de callo en la parte basal del explanto inicial (**Tabla 4.11**).

Tabla 4.11 Resultados de las medias obtenidas por la acción de distintas concentraciones de BA, Zea, 2iP y TDZ, con o sin AIB, en el número de brotes axilares después de 4 semanas de cultivo.

Cultivar 'Tres en Cunca'					
Citoquininas	Concentración (mgL⁻¹)	AIB (mgL⁻¹)	Media del número total de brotes ± DE	Media de brotes hiperhídricos ± DE	
BA	0.25	0	1.07 ± 0.26	0.00 ± 0.00	
		0.1	1.13 ± 0.39	0.00 ± 0.00	
	0.5	0	1.61 ± 0.76	0.00 ± 0.00	
		0.1	1.91 ± 1.12	0.00 ± 0.00	
	1	0	1.96 ± 0.85	0.00 ± 0.00	
		0.1	2.11 ± 1.00	0.00 ± 0.00	
	Zea	0.25	0	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
			0.1	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.5		0	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	
		0.1	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	
1		0	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	
		0.1	1.06 ± 0.23	0.00 ± 0.00	
2iP		0.25	0	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
			0.1	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	0.5	0	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	
		0.1	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	
	1	0	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	
		0.1	1.04 ± 0.19	0.00 ± 0.00	
	TDZ	0.25	0	1.39 ± 0.63	0.00 ± 0.00
			0.1	1.48 ± 0.67	0.00 ± 0.00
0.5		0	1.78 ± 0.86	0.00 ± 0.00	
		0.1	2.13 ± 0.97	0.00 ± 0.00	
1		0	2.11 ± 1.06	0.00 ± 0.00	
		0.1	2.87 ± 1.24	0.00 ± 0.00	

Este cultivar ha tenido una tasa de multiplicación muy baja con cualquiera de las citoquininas probadas y sus diferentes concentraciones, tanto en presencia de AIB como en ausencia de la auxina. Además, no se ha observado formación de brotes hiperhídricos en ninguno de los tratamientos por lo que su respuesta a la hiperhidricidad se asemeja más a la de los cultivares de peral.

La tasa de multiplicación expresada por la media del número de brotes totales, obtenidos tras un periodo de cuatro semanas para este cultivar fue escaso frente a los demás cultivares de manzano señalando de nuevo que no produjo hiperhídricos. Sin embargo, la acción de las distintas citoquininas (**Fig. 4.17**) mostraron diferencias significativas entre sí ($F= 193.152$; $P<0.001$), el factor concentración también mostró diferencias significativas ($F= 74.761$; $P<0.001$) así como la presencia de la auxina AIB a una única concentración 0.1 mgL^{-1} ($F= 19.225$; $P<0.001$).

El diferente aspecto morfológico de los brotes desarrollados en cada uno de los tratamientos, ha servido para elegir el medio de multiplicación más adecuado para este cultivar (**Fig. 4.18**).

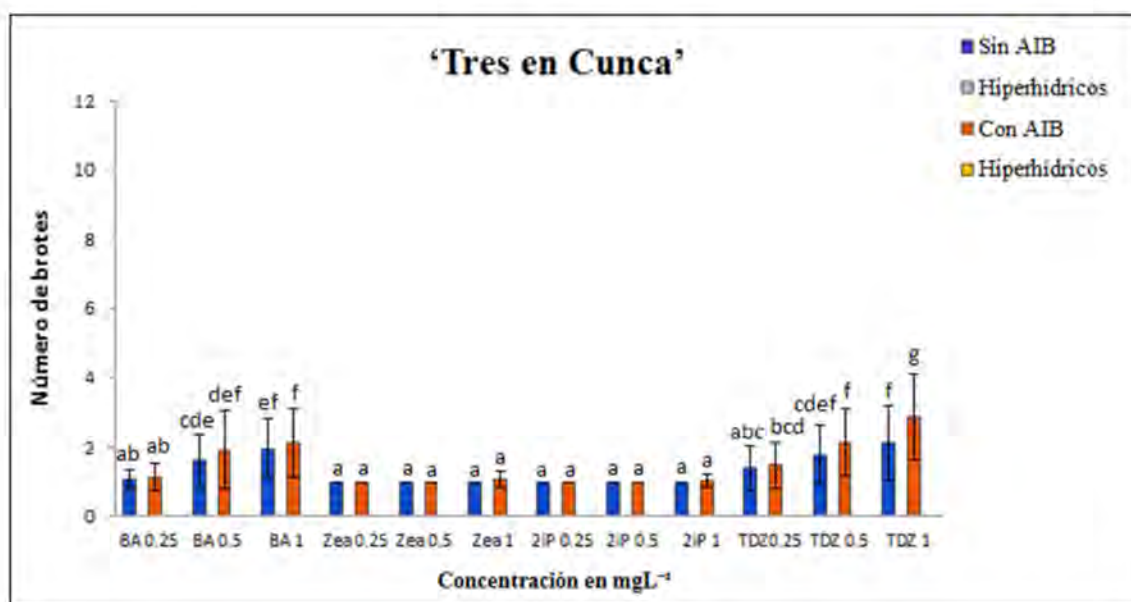


Figura 4.17 Representación gráfica de las medias del número de brotes obtenidos con las cuatro citoquininas a las tres concentraciones combinadas o no con AIB. Letras diferentes sobre los histogramas indican diferencias significativas entre tratamientos.

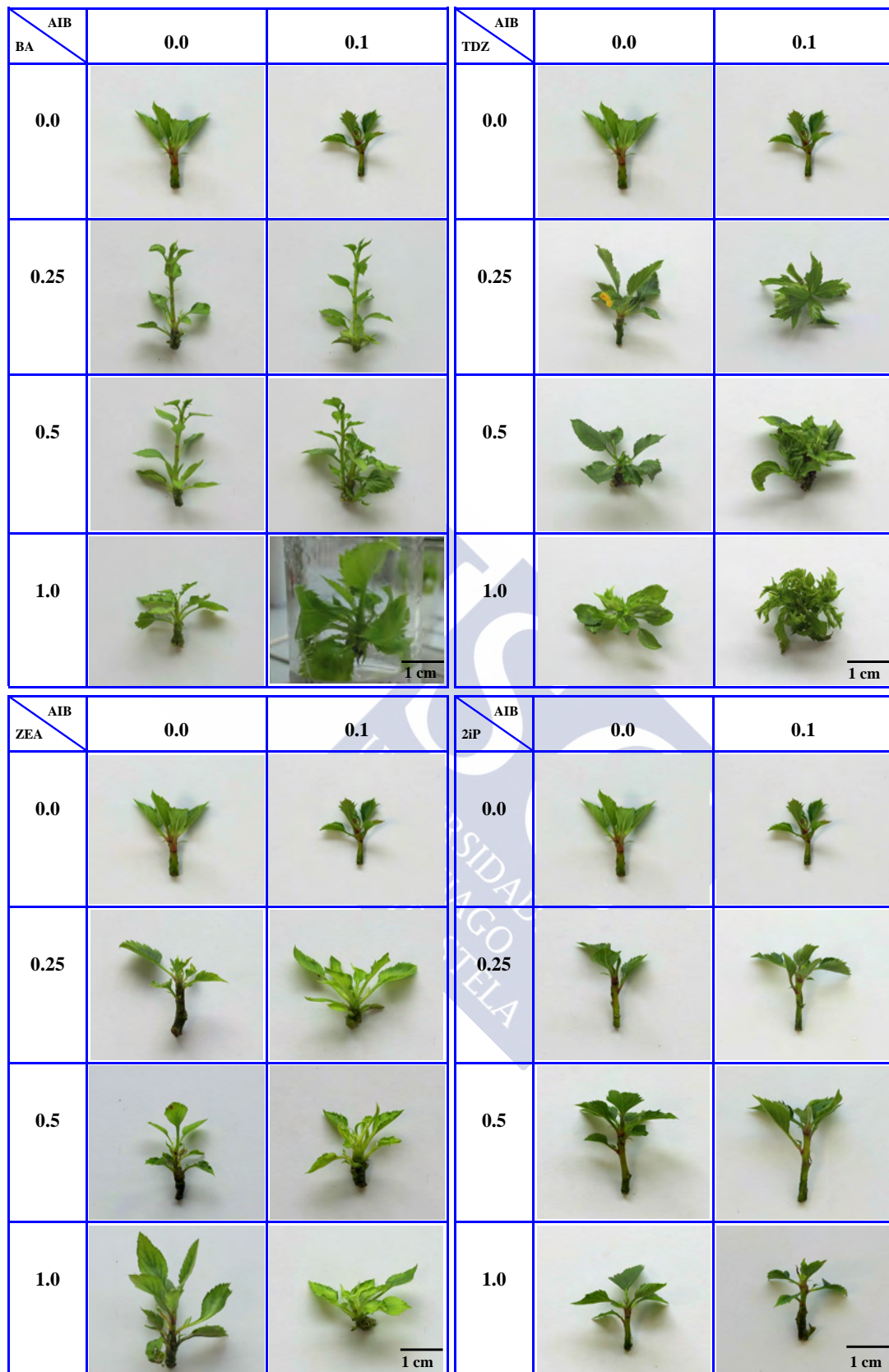


Figura 4.18 Aspecto morfológico de los brotes desarrollados con las diferentes concentraciones de las cuatro citoquininas (BA, Zea, 2iP y TDZ) con o sin AIB en la etapa de multiplicación.

4.1.2.2 Multiplicación de Cultivares de Peral

Cultivar 'Barburiña'

Al igual que con los cultivares de manzano, la citoquinina más eficaz ha sido también TDZ a la hora de multiplicar los brotes de peral. El análisis de los resultados obtenidos en la etapa de multiplicación para el cultivar Barburiña mostró que, en los explantos cultivados en todos los medios con las distintas concentraciones de TDZ se alcanzó un mayor número de brotes con respecto a las demás citoquininas, logrando una media máxima de 5.52 brotes por explanto cuando se utilizó a una concentración de 1 mgL^{-1} combinada con 0.1 mgL^{-1} de la auxina AIB. Sin embargo, el desarrollo de los brotes con esta citoquinina no tuvo un aspecto normal siendo diminutos los tallos de los nuevos brotes, de tan solo unos milímetros, hojas menudas con bordes rizados, desarrollo de brotes agrupados casi apiñados o en conjunto, dificultando mucho su recuento y su manipulación. El análisis de los datos mostró diferencias significativas entre todos los tratamientos con TDZ ($F=64.833$; $P<0.001$).

Cuando se utilizó BA en cualquiera de sus concentraciones en los medios de cultivo, el aspecto morfológico de los brotes fue normal, similar al control, con tallos erguidos y largos, hojas de forma y bordes normales. Los brotes desarrollados eran independientes separándose fácilmente. La media más alta de multiplicación de 2.13 brotes por explanto se alcanzó cuando se añadió al medio de cultivo 1 mgL^{-1} de esta citoquinina sin presencia de AIB. El análisis estadístico de los datos mostró diferencias significativas en todos los tratamientos con esta citoquinina ($F=36.132$; $P<0.001$).

Los brotes desarrollados en todos los tratamientos con las citoquininas Zeatina y 2iP presentaron aspecto normal en cuanto a la morfología de sus hojas y la longitud de su tallo. Sin embargo, la tasa de multiplicación con estas dos citoquininas no fue efectiva, consiguiendo una media de solo 1.07 brotes por explanto cuando se utilizó Zeatina y una media de tan solo 1.04 brotes por explanto, cuando se añadió 2iP al medio; en ambos casos las citoquininas estaban a una concentración de 1 mgL^{-1} combinada con 0.1 mgL^{-1} de AIB (**Tabla 4.12**).

Tabla 4.12 Resultados de las medias obtenidas por la acción de distintas concentraciones de BA, Zea, 2iP y TDZ, con o sin AIB, en el número de brotes axilares después de 4 semanas de cultivo.

Cultivar 'Barburriña'				
Citoquininas	Concentración (mgL ⁻¹)	AIB (mgL ⁻¹)	Media del número total de brotes ± DE	Media de brotes hiperhídricos ± DE
BA	0.25	0	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
		0.1	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	0.5	0	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
		0.1	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	1	0	2.13 ± 1.20	0.00 ± 0.00
		0.1	1.69 ± 0.84	0.00 ± 0.00
Zea	0.25	0	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
		0.1	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	0.5	0	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
		0.1	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	1	0	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
		0.1	1.07 ± 0.33	0.00 ± 0.00
2iP	0.25	0	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
		0.1	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	0.5	0	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
		0.1	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	1	0	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
		0.1	1.04 ± 0.19	0.00 ± 0.00
TDZ	0.25	0	3.94 ± 1.07	0.00 ± 0.00
		0.1	2.35 ± 0.59	0.00 ± 0.00
	0.5	0	4.94 ± 1.19	0.00 ± 0.00
		0.1	3.07 ± 0.75	0.00 ± 0.00
	1	0	5.31 ± 1.86	0.00 ± 0.00
		0.1	5.52 ± 1.16	0.00 ± 0.00

Para este cultivar de peral no se produjo la formación de brotes hiperhídricos por lo que siempre aparece representado con un valor cero y, por lo tanto, ‘Barburiña’ junto con el manzano ‘Tres en Cunca’ fueron los únicos de todos los cultivares estudiados que no formaron brotes hiperhídricos en ninguno de los tratamientos con las diferentes citoquininas.

El análisis estadístico multivariante de los datos del recuento del número de brotes a las cuatro semanas de cultivo mostró diferencias significativas (**Fig.4.19**) entre las distintas citoquininas ($F=1763.791$; $P<0.001$), también el factor concentración ($F=171.690$; $P<0.001$) así como la presencia de la auxina ($F=65.941$; $P<0.001$).

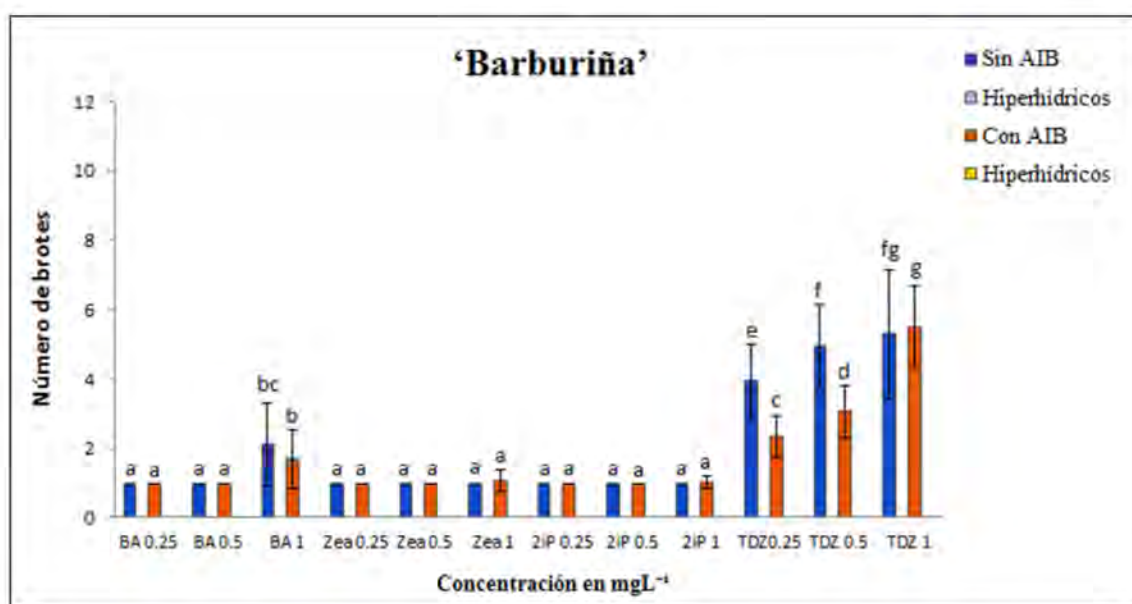


Figura 4.19 Representación gráfica de las medias del número de brotes obtenidos con las cuatro citoquininas a las tres concentraciones combinadas o no con AIB. Letras diferentes sobre los histogramas indican diferencias significativas entre tratamientos.

El aspecto morfológico de los brotes fue diferente en cada uno de los tratamientos probados, después de cuatro semanas en in vitro y fue tenido en cuenta para elegir el medio de multiplicación más adecuado para este cultivar (**Fig. 4.20**).

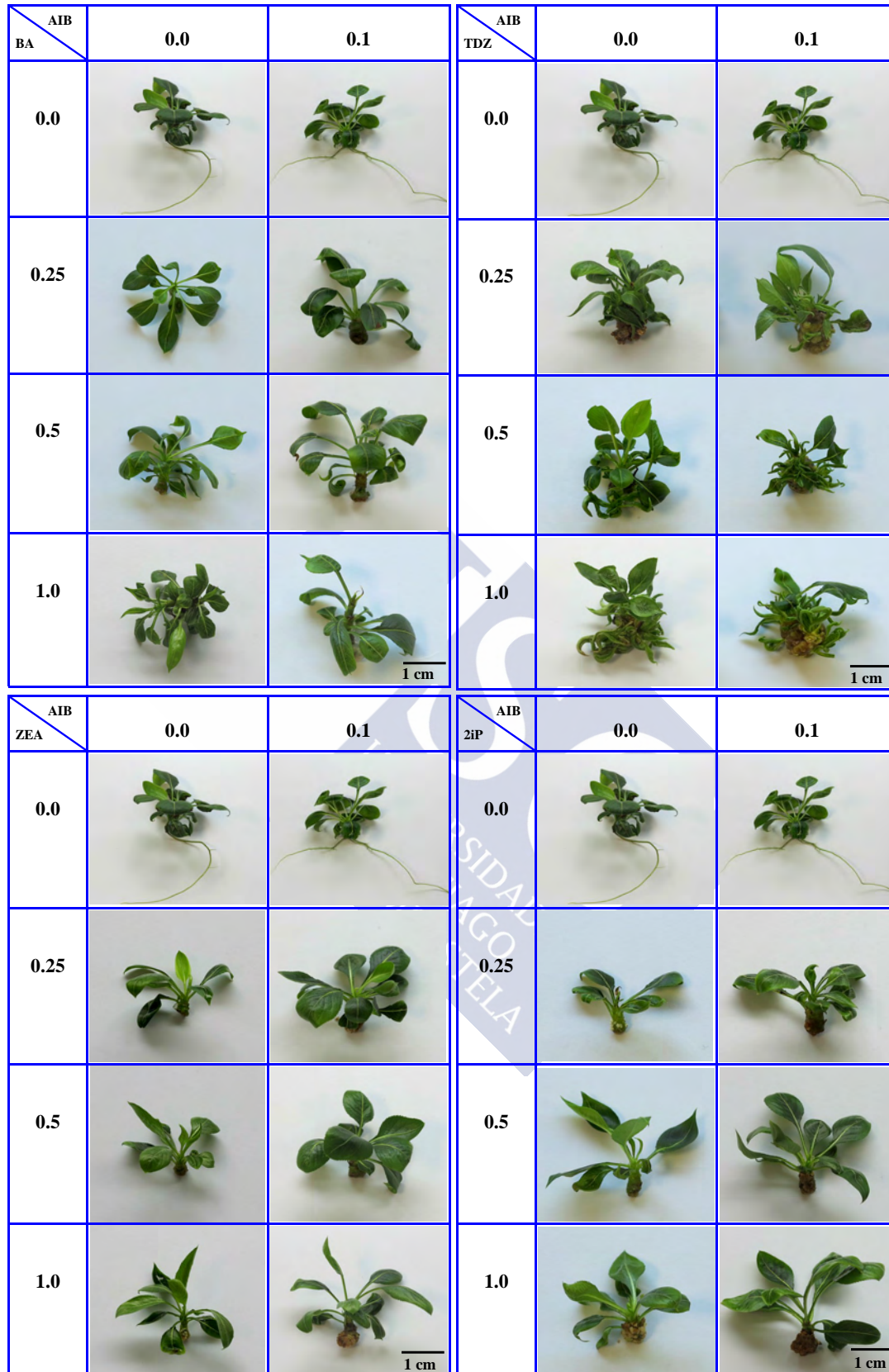


Figura 4.20 Aspecto morfológico de los brotes desarrollados con las diferentes concentraciones de las cuatro citoquininas (BA, Zea, 2iP y TDZ) con o sin AIB en la etapa de multiplicación.

Cultivar ‘Manteca Oscura’

La respuesta en la multiplicación de este cultivar con la presencia de la citoquinina TDZ en el medio de cultivo fue, como en todos los cultivares estudiados, la más eficaz obteniendo la mayor tasa de multiplicación frente al resto de citoquininas. En la multiplicación de ‘Manteca Oscura’ se logró la mayor media de brotes totales con un valor de 7.16 brotes por explanto y con muy escasa formación de hiperhídricos cuando se combinó 1 mgL^{-1} de TDZ con 0.1 mgL^{-1} de AIB. Sin embargo, el aspecto de los brotes no era normal: estaban muy ramificados, creciendo en todas direcciones, de forma agrupada, con tallos diminutos casi unidos que a simple vista no se diferenciaban unos de otros, dificultando su recuento y la manipulación de los explantos. Al mismo tiempo las hojas eran pequeñas con bordes rizados, dando un aspecto como en roseta nada parecido a los cultivos iniciales y a los del control de este cultivar. Es importante destacar que para este cultivar solo hubo formación de brotes hiperhídricos cuando en los medios de cultivo se incluyó la citoquinina TDZ, aunque se formaron con una tasa muy baja. El análisis de los resultados mostró diferencias significativas en todos los tratamientos cuando TDZ se incluyó en los medios de cultivo ($F=48.185$; $P<0.001$).

En los tratamientos con BA, el desarrollo de brotes axilares alcanzó la media más alta, de 3.16 brotes por explanto, cuando se añadió 1 mgL^{-1} de BA al medio de cultivo. El aspecto morfológico de los brotes con esta citoquinina fue normal, con tallos cortos propios de los cultivares de peral y bien diferenciados, hojas ovales con bordes lisos y tamaño algo menor que las del control. El análisis estadístico de los datos obtenidos en cada uno de los tratamientos con BA mostró diferencias significativas ($F=105.328$; $P<0.001$).

El desarrollo de brotes laterales de este peral en los tratamientos con las distintas concentraciones de Zeatina y con 2iP, al igual que con cultivares de manzano, fue menor que en el resto de tratamientos con las citoquininas BA y TDZ. De hecho, la media en todos ellos alcanzó un valor cercano a 1, es decir, que apenas se desarrollaron brotes axilares. La media más alta, de tan solo 1.05 brotes por explanto inicial, se logró con una concentración de 1 mgL^{-1} de Zeatina combinada con 0.1 mgL^{-1} de la auxina AIB (**Tabla 4.13**).

Tabla 4.13 Resultados de las medias obtenidas por la acción de distintas concentraciones de BA, Zea, 2iP y TDZ, con o sin AIB, en número de brotes axilares después de 4 semanas de cultivo.

Cultivar 'Manteca Oscura'				
Citoquininas	Concentración (mgL ⁻¹)	AIB (mgL ⁻¹)	Media del número total de brotes ± DE	Media de brotes hiperhídricos ± DE
BA	0.25	0	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
		0.1	1.03 ± 0.19	0.00 ± 0.00
	0.5	0	1.16 ± 0.46	0.00 ± 0.00
		0.1	1.09 ± 0.29	0.00 ± 0.00
		0	3.16 ± 1.14	0.00 ± 0.00
1	0.1	2.23 ± 0.92	0.00 ± 0.00	
Zea	0.25	0	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
		0.1	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	0.5	0	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
		0.1	1.03 ± 0.19	0.00 ± 0.00
		0	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
1	0.1	1.05 ± 0.23	0.00 ± 0.00	
2iP	0.25	0	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
		0.1	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	0.5	0	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
		0.1	1.05 ± 0.23	0.00 ± 0.00
		0	1.01 ± 0.13	0.00 ± 0.00
1	0.1	1.12 ± 0.33	0.00 ± 0.00	
TDZ	0.25	0	3.29 ± 0.94	0.00 ± 0.00
		0.1	3.38 ± 1.53	0.00 ± 0.00
	0.5	0	4.35 ± 0.99	0.00 ± 0.00
		0.1	5.79 ± 2.31	0.35 ± 0.87
		0	6.44 ± 1.64	0.00 ± 0.00
1	0.1	7.16 ± 2.36	0.38 ± 1.03	

Con 2iP se logró una media de 1.12 brotes por explanto inicial con la misma combinación de 1 mgL^{-1} de citoquinina combinada con 0.1 mgL^{-1} de AIB, brotes que presentaban un aspecto de hojas normales, con color verde oscuro y longitud de tallo regular. En ambos casos desarrollaron pocos brotes, de tamaño pequeño en comparación con BA, presentando un aspecto normal tanto en sus tallos como en la forma y borde de sus hojas, similares al control.

Según el análisis multivariante, el recuento del número de brotes, después de cuatro semanas de cultivo tuvo diferencias significativas (**Fig. 4.21**) entre las distintas citoquininas ($F=1422.675$; $P<0.001$), el factor concentración también mostró diferencias significativas en todos los tratamientos para este cultivar ($F=224.974$; $P<0.001$) así como la presencia de la auxina AIB ($F=6.936$; $P<0.001$).

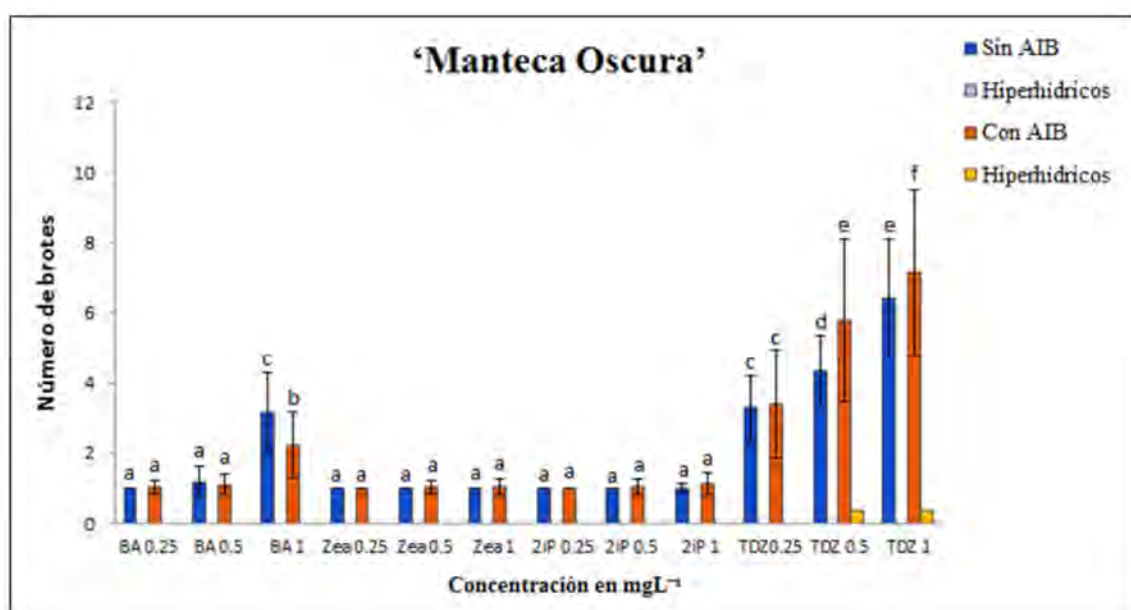


Figura 4.21 Representación gráfica de las medias del número de brotes obtenidos con las cuatro citoquininas a las tres concentraciones combinadas o no con AIB. Letras diferentes sobre los histogramas indican diferencias significativas entre tratamientos.

Después de cuatro semanas en in vitro, el aspecto morfológico de los brotes desarrollados en cada uno de los tratamientos probados fue diferente y sirvió para la elección del mejor medio de multiplicación para este cultivar (**Fig. 4.22**).

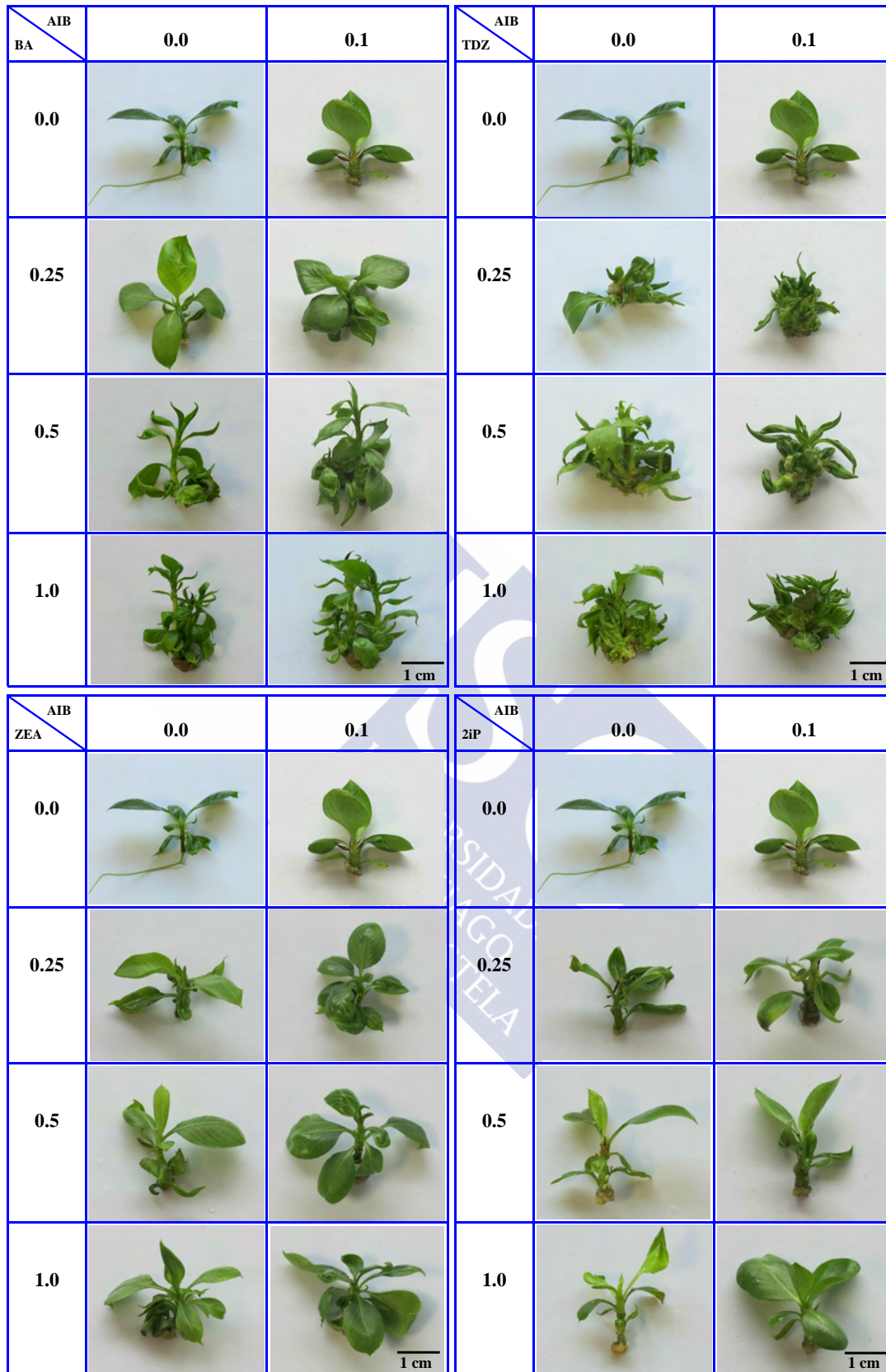


Figura 4.22 Aspecto morfológico de los brotes desarrollados con las diferentes concentraciones de las cuatro citoquininas (BA, Zea, 2iP y TDZ) con o sin AIB en la etapa de multiplicación.

Para los distintos cultivares de manzano y de peral estudiados, los medios de multiplicación seleccionados a fin de conseguir material suficiente para los ensayos de enraizamiento y termoterapia, fueron diferentes en cuanto a concentraciones de citoquinina, BA, y presencia o no de AIB.

Los medios de multiplicación seleccionados por la tasa y calidad de los brotes que en ellos crecían han sido tres:

MS BA 0.25 mgL⁻¹ AIB 0.1 mgL⁻¹

MS BA 0.5 mgL⁻¹ AIB 0.1 mgL⁻¹

MS BA 1 mgL⁻¹

Escogiendo el medio MS BA 0.25 mgL⁻¹ AIB 0.1 mgL⁻¹ para los cultivares ‘Cacharela’, ‘Camoesa’, ‘Gravillán’ y ‘Ollo Mouro’. Para los cultivares de manzano ‘José Antonio’, ‘Príncipe Grande’, ‘Repinaldo’ y ‘Tres en Cunca’ se prefirió el medio MS BA 0.5 mgL⁻¹ AIB 0.1 mgL⁻¹ y para los dos cultivares de peral, ‘Barburiña’ y ‘Manteca Oscura’, se optó por el medio MS BA 1 mgL⁻¹ como los más aptos para la multiplicación de los cultivos.

4.1.3 Enraizamiento de cultivares de manzano y peral

Para el estudio de enraizamiento de manzano y peral in vitro, se utilizaron los brotes conseguidos en la etapa de multiplicación procedentes de diferentes medios de cultivo conteniendo siempre la citoquinina BA. Debido a los requerimientos específicos de cada cultivar y teniendo en cuenta la tasa de multiplicación de brotes laterales junto al aspecto morfológico más normal de los brotes desarrollados en esta etapa, se descartaron para enraizar los brotes obtenidos sobre cualquiera de los medios que contenían TDZ por su morfología, porte y pequeño tamaño, aunque fuera mayor la tasa de multiplicación. Para los distintos cultivares de manzano y de peral estudiados, los medios de multiplicación fueron diferentes en cuanto a concentraciones de citoquinina, BA, y presencia o no de AIB.

4.1.3.1 Enraizamiento de cultivares no libres de virus

Como primer método para el proceso de enraizamiento se pasaron los brotes de los medios de multiplicación a medio MS0 o bien a medio con concentración muy baja de AIB (0.1 mgL^{-1}). Con anterioridad se había observado que muchos de los brotes en la etapa de multiplicación, que procedían de un medio de multiplicación con citoquinina y auxina, cuando eran pasados a MS0, sin reguladores de crecimiento, o bien a MS sin citoquinina, pero con 0.1 mgL^{-1} de AIB, formaban raíces en su base en la mayoría de los cultivares estudiados.

Para este primer método de enraizamiento, tanto para manzano como peral, el diseño experimental consistió en 9 jarras de cultivo con seis explantos cada una ($n=54$). Después de permanecer cuatro semanas en medio de multiplicación con citoquinina y auxina, los explantos fueron transferidos a medio MS con 0.1 mgL^{-1} de AIB o bien a medio basal MS0. A las dos semanas de su puesta en cultivo en estos medios, se observó la emergencia de los primordios de raíz de unos milímetros de longitud en la parte basal de los brotes. Transcurridas cuatro semanas de cultivo y en los diferentes medios en las condiciones ya establecidas de luz y temperatura (24°C día y 18°C noche, $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 16h fotoperiodo), se tomaron datos del porcentaje de enraizamiento en cada cultivar, del número de raíces desarrolladas por explanto enraizado, así como la longitud de la raíz más larga (**Fig.4.23**).



Figura 4.23 a) Brotes del cultivar ‘Camoesa’ provenientes del medio de multiplicación y enraizados en medio MS AIB 0.1 gL^{-1} b) Raíces con desarrollo normal en la base del tallo en el cultivar ‘Camoesa’, después de 4 semanas in vitro.

De acuerdo con los datos obtenidos, los mejores resultados de enraizamiento se consiguieron con los cultivares ‘Camoesa’ y ‘Repinaldo’ una vez que los brotes fueron pasados a medio MS con 0.1 mgL^{-1} de la auxina AIB, pero sin citoquinina, utilizando brotes procedentes del medio MS con citoquinina BA 0.25 mgL^{-1} y AIB 0.1 mgL^{-1} . Con el cultivar ‘Camoesa’ se obtuvo un porcentaje de enraizamiento del 91% con la media más alta de 5.67 raíces por brote. Por otro lado, en el cultivar ‘Repinaldo’ se obtuvo un 91% de enraizamiento con una media de 4.12 raíces por brote. Sin embargo, cuando los brotes de estos dos cultivares de la misma procedencia fueron pasados a medio MS0 sin reguladores de crecimiento, el porcentaje de enraizamiento fue menor en ambos casos, logrando un valor de solo el 59% para el cultivar ‘Camoesa’ y un 80% de enraizamiento para ‘Repinaldo’.

Con brotes del cultivar ‘Gravillán’ procedentes de medio MS con 0.25 mgL^{-1} de BA y 0.1 mgL^{-1} de AIB, pasados a medio sin citoquinina, pero con AIB, se obtuvo un 65% de enraizamiento, con una media de 2.97 raíces por brote. Sin embargo, el porcentaje de enraizamiento para este cultivar disminuyó considerablemente cuando los brotes fueron pasados a medio MS0 sin reguladores de crecimiento, alcanzado solo un 11% de enraizamiento.

Con brotes del cultivar ‘José Antonio’, procedentes de un medio MS con la misma composición de 0.25 mgL^{-1} de BA y 0.1 mgL^{-1} de AIB, pasados a medio MS con la presencia de 0.1 mgL^{-1} de AIB, se obtuvo un 59% de enraizamiento alcanzando una media de 3.53 raíces por brote. Al igual que con los otros cultivares, cuando los brotes de la misma procedencia fueron pasados a MS0, el porcentaje de enraizamiento disminuyó considerablemente hasta un 39% con una media de 2.76 raíces por brote.

Para los cultivares ‘Cacharela’, ‘Olló Mouro’ y ‘Príncipe Grande’, los brotes procedentes siempre de medio MS con 0.25 mgL^{-1} de BA y 0.1 mgL^{-1} de AIB, fueron pasados a medio MS0 o bien a medio MS con 0.1 mgL^{-1} de la auxina AIB. El porcentaje de enraizamiento para estos tres cultivares fue muy escaso en ambos casos, debido a que no se alcanzó ni el 30% de enraizamiento en ninguno de los tratamientos (**Tabla 4.14**).

Tabla 4.14 Resultado del porcentaje de enraizamiento de los ocho cultivares de manzano y dos de peral, después de 4 semanas en condiciones in vitro. En la última columna aparece recogido el porcentaje de aclimatación después de 6 semanas bajo condiciones de invernadero.

Medio de Origen (mgL⁻¹) MS BA 0.25 AIB 0.1					
Cultivares	Concentración AIB (mgL⁻¹)	Enraizamiento (%)	Nº Raíces (mm)	Longitud Raíz (mm)	Aclimatación (%)
‘Cacharela’	0	0	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	-
	0.1	13	1.14 ± 0.38	33.00 ± 0.63	71
‘Camoesa’	0	59	3.78 ± 2.26	38.31 ± 11.29	97
	0.1	91	5.67 ± 2.46	33.59 ± 8.06	69
‘Gravillán’	0	11	2.00 ± 1.26	63.50 ± 10.85	83
	0.1	65	2.97 ± 1.75	47.31 ± 11.78	57
‘José Antonio’	0	39	2.76 ± 2.23	82.43 ± 34.61	52
	0.1	59	3.53 ± 2.42	59.00 ± 25.21	81
‘Ollo Mouro’	0	4	1.00 ± 0.00	85.66 ± 7.07	50
	0.1	0	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	-
‘Príncipe Grande’	0	0	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	-
	0.1	4	1.00 ± 0.00	61.50 ± 13.43	100
‘Repinaldo’	0	80	3.40 ± 1.56	48.86 ± 26.09	-
	0.1	91	4.12 ± 1.92	73.49 ± 33.55	77
‘Tres en Cunca’	0	0	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	88
	0.1	0	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	-
Medio de Origen (mgL⁻¹) MS BA 0.5 AIB 0.1					
‘José Antonio’	0	17	1.78 ± 1.30	98.00 ± 19.31	-
	0.1	0	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	-
‘Príncipe Grande’	0	0	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	-
	0.1	2	1.00 ± 0.00	21.00 ± 0.00	-
‘Repinaldo’	0	63	3.59 ± 1.40	47.79 ± 16.42	-
	0.1	85	3.93 ± 1.65	62.65 ± 21.88	-
‘Tres en Cunca’	0	0	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	-
	0.1	0	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	-
Medio de Origen (mgL⁻¹) MS BA1 AIB 0.1					
‘Barburiña’	0	2	1.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	0
	0.1	7	2.00 ± 0.82	90.25 ± 27.72	75
‘Manteca Oscura’	0	6	1.00 ± 0.00	57.33 ± 6.81	33
	0.1	0	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	-

En el caso de los cultivares de manzano ‘José Antonio’, ‘Príncipe Grande’, ‘Repinaldo’ y ‘Tres en Cunca’ en los que el medio de procedencia de los brotes fue MS con una concentración mayor de citoquinina de 0.5 mgL^{-1} de BA y 0.1 mgL^{-1} de AIB, el enraizamiento de los brotes, una vez pasados a MS0 o bien a MS con 0.1 mgL^{-1} de AIB, fue menor que cuando procedían de MS 0.25 mgL^{-1} de BA y 0.1 mgL^{-1} de AIB, alcanzando un 63% de enraizamiento para el cultivar ‘Repinaldo’ con una media de 3.59 raíces por brote cuando los brotes fueron pasados a MS0 y de un 85% de enraizamiento, con una media de 3.93 raíces por brote, cuando los brotes fueron pasados a MS con 0.1 mgL^{-1} de la auxina AIB (**Tabla 4.14**).

Para el cultivar ‘Tres en Cunca’, ni el medio de procedencia ni el tratamiento aplicado fue apropiado para formar raíces y en ninguno de los tratamientos se produjo el enraizamiento en este cultivar. Este cultivar ha mostrado tener el genotipo más diferente en relación a su capacidad de multiplicación y de enraizamiento.

En el caso de los dos cultivares de peral se utilizaron para enraizar brotes procedentes de un medio de multiplicación y mantenimiento MS con 1 mgL^{-1} de BA y 0.1 mgL^{-1} de AIB que fueron pasados a medio MS0 sin reguladores de crecimiento o bien a un medio MS con 0.1 mgL^{-1} de la auxina AIB, pero sin citoquinina. Después de cuatro semanas en cultivo en las condiciones establecidas se calculó el porcentaje de enraizamiento en ambos tratamientos para ambos cultivares, mediante el recuento del número de brotes que presentaban raíces haciendo igualmente el recuento del número de raíces formadas por brote y obteniendo la medida de la longitud de la raíz más larga.

Según los resultados obtenidos con los dos tratamientos con y sin auxina en el medio, el porcentaje de enraizamiento fue muy escaso en ambos perales, así como el número de raíces por brote. En el cultivar ‘Barburiña’ sólo se obtuvo un 7% de enraizamiento en medio MS con AIB 0.1 mgL^{-1} con una media de tan solo 2.00 raíces por brote.

Para el cultivar ‘Manteca Oscura’ solo se produjo el enraizamiento de los brotes en medio MS0 sin auxina, alcanzando un porcentaje de enraizamiento de tan solo un 6% con una media de 1.0 raíz por brote (**Tabla 4.14**).

4.1.3.2 Enraizamiento de cultivares libres de virus

Un segundo método utilizado para la inducción de raíces en los cultivares de manzano y peral en estudio, fue la inmersión (*dipping*) de la zona basal de los brotes en una solución acuosa estéril de auxina, AIB o bien ANA, a elevada concentración (1 y 2 gL^{-1}), durante un periodo de tiempo muy corto de tan solo 45 segundos e inmediatamente fueron pasados a medio de expresión MS0 sin reguladores de crecimiento.

En estudios preliminares, en brotes obtenidos *in vitro* del cultivar ‘Gravillán’ se había probado la inmersión basal con la auxina ANA (1 y 2 gL^{-1}), durante 45 segundos pasándolas seguidamente a medio MS0 sin reguladores de crecimiento. Después de cuatro semanas, se observó la formación de las raíces cortas y engrosadas muchas veces fusionadas, que presentaban apariencia poco normal, debido a que todas tenían un aspecto acorchado (**Fig. 4.24**), resultando ser al final poco o nada funcionales por su fracaso en el paso a tierra y en la aclimatación a condiciones ambientales. Por ese motivo junto con los resultados conseguidos con otras variedades, reflejados en la bibliografía consultada, la auxina ANA fue descartada para el resto de los cultivares libres de virus, ya que con ‘Gravillán’, además de mal enraizamiento, los resultados de aclimatación en condiciones de invernadero tampoco fueron positivos.



Figura 4.24 Enraizamiento mediante inmersión basal de brotes de ‘Gravillán’ libre de virus en una solución concentrada de auxina (a) ANA 1 gL^{-1} y (b) con ANA 2 gL^{-1} , después de 4 semanas *in vitro*, en MS0, mostrando un desarrollo anormal de las raíces.

Sin embargo, cuando la inmersión basal de los brotes de ‘Gravillán’ se hizo en una solución con la auxina AIB a las mismas concentraciones de 1 y 2 gL^{-1} durante 45 segundos dio como resultado la formación de un alto número de raíces largas y bien desarrolladas sobre todo cuando se utilizó una solución de AIB 1 gL^{-1} (Fig. 4.25). Cuando se sumergieron los brotes en una solución de AIB 2 gL^{-1} se produjeron raíces más engrosadas y fusionadas. Considerando la gran diferencia existente en los porcentajes de enraizamiento obtenidos con ANA y AIB, este segundo método de inmersión basal solo se realizó con la auxina AIB probando en todos los cultivares de manzano y peral una concentración de 1 y 2 gL^{-1} aplicando este segundo método únicamente para el enraizamiento de todos los cultivares libres de virus.

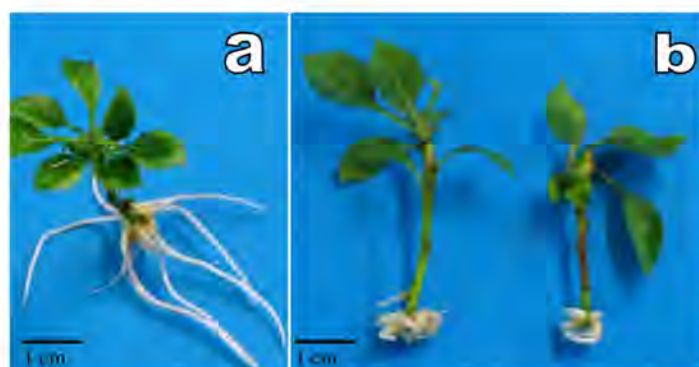


Figura 4.25 Brotes del cultivar ‘Gravillán’ a) con desarrollo normal de raíces por inmersión basal en una solución de la auxina AIB 1 gL^{-1} y b) con desarrollo de raíces engrosadas con AIB 2 gL^{-1} , ambos casos después de permanecer 4 semanas en MS0 en condiciones in vitro.

Por otro lado, hay que señalar que, para inducir la formación de raíces en brotes libres de virus, el primer método de enraizamiento descrito, con el paso de los brotes a medio MS0 o bien paso a medio MS AIB 0.1 mgL^{-1} , no dio buenos resultados con varios de los cultivares probados, como ‘Cacharela’, ‘Camoesa’ y ‘Gravillán’. Por ese motivo se optó por utilizar con los brotes libres de virus de todos los cultivares, tanto de manzano como de peral, únicamente el método de la inmersión basal de brotes en una auxina rizogénica. La inmersión basal de los brotes, se hizo siempre en una solución acuosa estéril, altamente concentrada utilizando 1 o 2 gL^{-1} de la auxina AIB, durante 45 segundos. Inmediatamente los brotes fueron transferidos a medio MS0 sin reguladores

de crecimiento. Después de dos semanas de permanecer en este medio, en las condiciones establecidas en la cámara de crecimiento, se observó en la parte basal de los brotes tanto la emergencia de primordios de raíz de unos milímetros como de raíces largas y bien desarrolladas. Los datos del porcentaje de enraizamiento, número de raíces desarrolladas por explanto y longitud de la raíz más larga fueron tomados a las cuatro semanas de su inmersión y puesta en MS0. El diseño experimental de enraizamiento para este segundo método de inmersión basal, en todos los cultivares libres de virus, consistió en 9 jarras de cultivo con seis explantos cada una (n=54).

Los mejores resultados de enraizamiento se consiguieron con brotes libres de virus del cultivar ‘Gravillán’ procedentes de medio MS con citoquinina BA 0.25 mgL^{-1} y AIB 0.1 mgL^{-1} , cuando la inmersión basal de estos se hizo en una solución concentrada de 1 gL^{-1} de AIB, con la que se obtuvo un porcentaje de enraizamiento del 93% junto con la media más alta de 5.06 raíces por brote. Sin embargo, cuando la concentración utilizada de AIB fue de 2 gL^{-1} , el porcentaje de enraizamiento para este cultivar fue menor, con un valor del 76%, y con una media también menor de 4.98 raíces por brote. Por otro lado, con los cultivares ‘Camoesa’ y ‘Repinaldo’, se obtuvo un 91% de enraizamiento, en ambos casos, cuando se utilizó una solución concentrada de AIB 2 gL^{-1} , consiguiendo una media de 2.63 y 2.53 raíces por brote respectivamente. No obstante, cuando en los brotes de ambos cultivares se probó la inmersión basal en AIB 1 gL^{-1} , los porcentajes de enraizamiento fueron algo menores en los dos casos, con un 83% de enraizamiento y una media de 2.11 raíces por brote para ‘Camoesa’ y algo más, un 89% de enraizamiento, con media de 3.14 raíces por brote para el cultivar ‘Repinaldo’ (Tabla 4.15).

Los cultivares procedentes de medio MS 0.5 mgL^{-1} de BA y 0.1 mgL^{-1} de AIB, fueron ‘José Antonio’, ‘Príncipe Grande’, ‘Repinaldo’ y ‘Tres en Cunca’.

Con los brotes del cultivar ‘Príncipe Grande’ se consiguió un 78% de enraizamiento en ambos tratamientos (AIB 1 y 2 gL^{-1}). Sin embargo, en cuanto a la media del número de raíces, sí hubo diferencia entre tratamientos, con una media de 1.83 raíces por brote con AIB 1 gL^{-1} y media de 2.07 raíces por brote con AIB 2 gL^{-1} .

Tabla 4.15 Resultado de porcentaje de enraizamiento de los ocho cultivares de manzano y dos de peral libres de los virus ApMV y ACLSV, después de 4 semanas en condiciones in vitro. En la última columna aparece recogido el porcentaje de aclimatación después de 6 semanas en condiciones de invernadero.

Medio de Origen (mgL⁻¹) MS BA 0.25 AIB 0.1						
Cultivares libres de virus	Auxina (L ⁻¹)		Nº Raíces (mm)	Longitud Raíz (mm)	Enraizamiento (%)	Aclimatación (%)
	AIB	ANA				
‘Cacharela’	1	0	1.74 ± 1.76	2.58 ± 2.08	57	81
	2	0	1.38 ± 0.60	2.31 ± 1.65	59	34
‘Camoesa’	1	0	2.11 ± 0.93	5.87 ± 3.16	83	76
	2	0	2.63 ± 1.79	4.65 ± 2.80	91	27
‘Gravillán’	1	0	5.06 ± 2.76	14.42 ± 8.11	93	50
	2	0	4.98 ± 2.46	17.39±10.45	76	51
	0	1	2.24 ± 1.37	4.21 ± 1.10	61	0
	0	2	2.15 ± 0.97	3.92 ± 2.74	48	0
‘Olo Mouro’	1	0	1.63 ± 1.02	15.09 ± 7.26	61	15
	2	0	3.31 ± 2.84	14.45 ± 5.93	65	20
Medio de Origen (mgL⁻¹) MS BA 0.5 AIB 0.1						
‘José Antonio’	1	0	3.36 ± 2.26	10.67 ± 8.06	78	14
	2	0	2.94 ± 2.70	3.79 ± 4.01	63	0
‘Príncipe Grande’	1	0	1.83 ± 1.14	9.76 ± 9.42	78	55
	2	0	2.07 ± 1.70	5.98 ± 6.00	78	21
‘Repinaldo’	1	0	3.14 ± 2.09	24.16±14.54	89	4
	2	0	2.53 ± 1.83	12.77 ± 9.38	91	2
‘Tres en Cunca’	1	0	2.00 ± 1.41	27.50 ± 3.54	4	-
	2	0	1.00 ± 0.00	12.50 ± 3.54	4	-
Medio de Origen (mgL⁻¹) MS BA1						
‘Barburiña’	1	0	1.27 ± 0.70	6.62±10.20	54	3
	2	0	1.42 ± 0.74	4.53 ± 3.86	52	4
‘Manteca Oscura’	1	0	1.00 ± 0.00	15.00±12.81	19	60
	2	0	1.56 ± 0.88	23.22±10.52	17	0

La inmersión basal en solución de AIB 1 gL^{-1} , para el cultivar ‘José Antonio’, produjo un 78% de enraizamiento con una media de 3.36 raíces por brote. Sin embargo, cuando se empleó solución de AIB 2 gL^{-1} , el porcentaje de enraizamiento fue más bajo, del 63%, con una media de 2.94 raíces por brote.

Con brotes del cultivar ‘Tres en Cunca’ procedentes de MS con 0.5 mgL^{-1} de BA y 0.1 mgL^{-1} de AIB, el enraizamiento fue muy escaso. Con la inmersión basal de los brotes en concentraciones de AIB (1 y 2 gL^{-1}), solo se alcanzó el 4% de brotes enraizados en ambos tratamientos, siendo entre todos el cultivar con la tasa más baja en cuanto a porcentaje de enraizamiento.

Utilizando brotes del cultivar ‘Cacharela’ procedentes de un medio MS BA 0.25 mgL^{-1} y AIB 0.1 mgL^{-1} , se obtuvo un 59% de enraizamiento cuando se empleó en la inmersión basal de los brotes la concentración de 2 gL^{-1} de la auxina AIB, consiguiendo una media de 1.38 raíces por brote. Sin embargo, cuando se utilizó una solución concentrada de AIB 1 gL^{-1} , el porcentaje de enraizamiento para este cultivar fue un 57%, con una media de 1.74 raíces por brote.

Con brotes del cultivar ‘Ollo Mouro’ sumergidos en solución concentrada de AIB 1 gL^{-1} y 2 gL^{-1} , se obtuvo un 61 y 65% de enraizamiento, con una media de 1.63 y 3.31 raíces por brote, respectivamente, para cada tratamiento.

En el caso de los dos cultivares de peral ‘Barburiña’ y ‘Manteca Oscura’, se utilizaron para enraizar los brotes procedentes de medio MS con 1 mgL^{-1} de BA. Según los resultados obtenidos, el mejor porcentaje de enraizamiento se consiguió con el peral ‘Barburiña’ (**Fig. 4.26**), cuando la inmersión basal de los brotes fue en solución concentrada de AIB 1 gL^{-1} , alcanzando un 54% de enraizamiento, con una media de 1.27 raíces por brote. Cuando la concentración de la auxina AIB fue de 2 gL^{-1} , el porcentaje de enraizamiento disminuyó, alcanzando un 52% con una media de 1.42 raíces por brote. En el cultivar ‘Manteca Oscura’ se produjo el 19% de enraizamiento cuando la parte basal de los brotes fueron sumergidos en solución concentrada de AIB 1 gL^{-1} , con tan solo una media de 1.0 raíces por brote. En este cultivar la solución concentrada de la auxina AIB 2 gL^{-1} , tampoco mejoró el porcentaje de enraizamiento, alcanzando solo un 17%, pero con la media más alta de 1.56 raíces por brote.



Figura 4.26 Desarrollo de raíces en brotes del peral ‘Barburiña’ con inmersión basal en una solución de la auxina AIB (a) 1 gL^{-1} y (b) 2 gL^{-1} , después de 4 semanas.

4.1.4 Paso a tierra y Aclimatación

4.1.4.1 Aclimatación y supervivencia de plantas enraizadas no libres de virus.

De todos los cultivares se aclimataron las plantas obtenidas a partir de brotes enraizados y se tomó nota de las diferencias observadas. Los brotes de los cultivares de manzano y peral enraizados *in vitro*, una vez establecidos sus porcentajes de enraizamiento según el método empleado y su procedencia, fueron pasados a tierra para su aclimatación a condiciones ambiente. Las plantas con raíces bien desarrolladas de los distintos cultivares, fueron retiradas de las jarras de cultivo, lavadas con agua para quitar restos de agar y transferidas a alveolos con una mezcla de sustrato de composición: turba rubia (60%), corteza (20%), fibra de coco (10%) y turba negra (10%). La aclimatación de las plantas de los cultivares estudiados, procedentes de cultivo *in vitro*, se realizó manteniéndolas primero en cámara de enraizamiento con control de luz, temperatura y humedad y luego fueron pasadas a condiciones de invernadero, pertenecientes ambas instalaciones al Centro de Biotecnología Vegetal, Cultigar (capítulo 3. Material y métodos). Después de 6 semanas en invernadero se tomaron los datos de supervivencia *ex vitro*, de cada tratamiento y para cada cultivar (**Fig. 4.27**).

Según los datos obtenidos, el mejor porcentaje de aclimatación se obtuvo con el cultivar ‘Príncipe Grande’ con brotes no libres de virus, enraizados en medio MS con

AIB 0.1 mgL^{-1} alcanzando un 100% de plantas aclimatadas. Con el cultivar ‘Camoesa’ se obtuvo un 97% de plantas aclimatadas con brotes enraizados en medio MS0 y solo un 69% con plantas aclimatadas de brotes enraizados en MS con AIB 0.1 mgL^{-1} . Para el resto de cultivares de manzano el porcentaje de aclimatación fluctuó entre el 50 y 88% (Tabla 4.14).

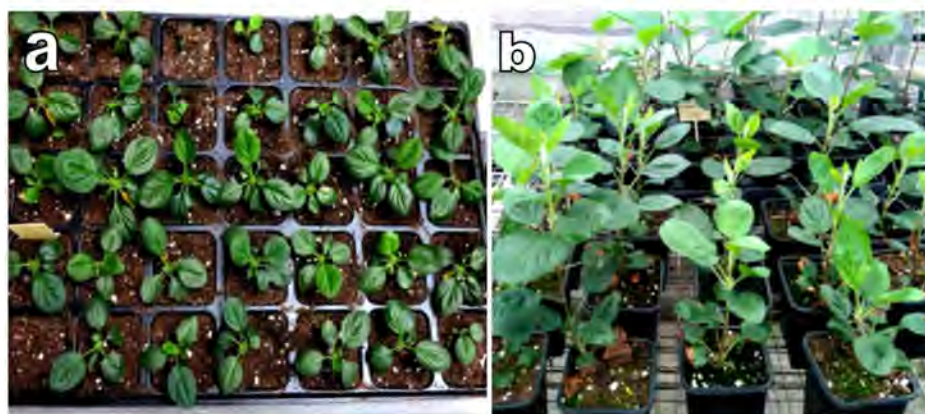


Figura 4.27 Aclimatación de plántulas del cultivar ‘Camoesa’ a) después de 6 semanas en cámara de enraizamiento b) después de 6 meses pasados a tiestos individuales en condiciones de invernadero.

En el caso de los cultivares de peral, el mejor resultado con plantas virosadas se obtuvo con el cultivar ‘Barburiña’, con un 75% de plantas aclimatadas procedentes de brotes enraizados en medio MS con AIB 0.1 mgL^{-1} . Sin embargo, con brotes enraizados en MS0, en este cultivar, el porcentaje de aclimatación fue cero. En el peral ‘Manteca Oscura’, solo se obtuvo el 33% de plantas aclimatadas partiendo de los brotes enraizados en medio MS sin reguladores de crecimiento (Tabla 4.14).

4.1.4.2 Aclimatación y supervivencia de plantas enraizadas libres de virus

Según los datos obtenidos de porcentajes de aclimatación a condiciones de invernadero en plantas libres de virus, el mejor resultado se obtuvo con brotes enraizados en inmersión basal con la auxina AIB 1 gL^{-1} del cultivar ‘Cacharela’, consiguiendo un 81% de aclimatación. Sin embargo, con este mismo cultivar el

porcentaje de aclimatación alcanzó un valor de solo un 34% en brotes enraizados con AIB 2 gL⁻¹. En plantas del cultivar ‘Camoesa’ libres de virus, se obtuvo un 76% de éxito en la aclimatación cuando los brotes enraizados provenían de la inmersión con AIB 1 gL⁻¹. No obstante, la tasa de aclimatación con plantas libres de virus en este cultivar fue considerablemente más baja cuando los brotes fueron enraizados en solución de AIB 2 gL⁻¹, logrando sobrevivir a la aclimatación solo un 27% después de 6 semanas. Para el cultivar ‘Gravillán’, los datos obtenidos de porcentaje de aclimatación en plantas libres de virus fueron similares en ambos tratamientos consiguiendo un 50% de supervivencia de las plantas que provenían de AIB 1 gL⁻¹ y un 51% si provenían de la inmersión basal con AIB 2 gL⁻¹. Con el cultivar ‘Ollo Mouro’ tampoco hubo gran diferencia entre la supervivencia de las plantas provenientes de los dos tratamientos, alcanzando un 15% y 20% de aclimatación con brotes enraizados en solución de AIB 1 gL⁻¹ y 2 gL⁻¹ respectivamente. Sin embargo, en el cultivar ‘José Antonio’ solo se consiguió la aclimatación del 14% de plantas libres de virus, cuando estas, fueron enraizadas con AIB 1 gL⁻¹. Con el cultivar ‘Príncipe Grande’, se obtuvo un 55% de plantas aclimatadas libres de virus con el tratamiento AIB 1 gL⁻¹ y solo un 21% con el tratamiento AIB 2 gL⁻¹. El porcentaje de aclimatación, con el cultivar ‘Repinaldo’, fue muy escaso, logrando solo el 4 y 2% de aclimatación en plantas libres de virus con brotes enraizados en los tratamientos de inmersión basal de AIB (1 y 2 gL⁻¹) respectivamente (**Tabla 4.15**).

Por último, hay que decir que con el cultivar ‘Tres en Cunca’ no se pudo realizar la aclimatación de los brotes, debido a que el porcentaje de enraizamiento fue muy escaso, y además con la aplicación de termoterapia y el aislamiento de los meristemas en este cultivar solo se logró multiplicar un clon derivado de un único meristemo y partiendo de esa muestra tan pequeña solo se consiguió erradicar uno de los virus.

En el caso de los perales, el mayor porcentaje de aclimatación de plantas libres de virus se obtuvo con el cultivar ‘Manteca Oscura’, logrando un 60% de aclimatación de las plantas derivadas de los brotes enraizados con el tratamiento AIB 1 gL⁻¹. Sin embargo, no se consiguió la supervivencia de aquellas que provenían del tratamiento con AIB 2 gL⁻¹. En el caso del cultivar de peral ‘Barburiña’ la aclimatación de plantas libres de virus fue muy escasa, alcanzado solo el 3 y 4% de supervivencia en las plantas

que provenían del enraizamiento de brotes con AIB 1 y 2 gL⁻¹ respectivamente (Fig. 4.28).



Figura 4.28 a) Plántula libre de virus del cultivar ‘Gravillán’ enraizada por *dipping* con la auxina AIB 1 gL⁻¹ después de 4 semanas en cultivo in vitro b) Aclimatación de plántulas de ‘Gravillán’ libre de virus después de 6 semanas en cámara de enraizamiento c) Plantas libres de virus del cultivar ‘Gravillán’ pasados a tiestos individuales en condiciones de invernadero cubierto con malla anti-trips y sobre bandejas aislantes después de 3 meses d) Planta libre de virus del cultivar ‘Gravillán’ aclimatada después de 4 meses creciendo en invernadero.

4.1.5 Observaciones Finales

Es importante destacar que, después de un seguimiento de varios meses en condiciones de invernadero, comprobamos que las plantas enraizadas libres de virus son más susceptibles al ataque de hongos, como el oídio (*Podosphaera sp.*), que los mismos cultivares, pero de plantas con virus. El oídio es una de las principales enfermedades fúngicas que afectan al manzano y al peral y tienen una mayor incidencia en cultivares sensibles. Esta enfermedad afecta a diferentes órganos de la planta como hojas, yemas, brotes y flores del manzano. Se muestra externamente como un polvillo blanco muy visible que cubre diferentes partes de la planta y como medida de control para esta enfermedad se utiliza tratamientos con fungicidas.

De las plantas aclimatadas, las del cultivar ‘Gravillán’ libre de virus, después de 12 meses en invernadero, han sido las más afectadas por el oídio. Sin embargo, a pesar de ello, no hubo mortalidad entre las 62 plantas debido quizás a que después de ese largo periodo de 12 meses que permanecieron en condiciones de invernadero, estas plantas aclimatadas estaban mejor adaptadas a condiciones ambiente y superaron el ataque de los hongos. En algunos de los otros cultivares libres de virus como ‘Cacharela’, ‘Camoesa’, y ‘Príncipe Grande’ sí se observó mortalidad de casi la mitad de las plantas aclimatadas a causa del ataque del oídio, ya sea porque son cultivares más susceptibles o quizás debido al menor tiempo de permanencia (8-10 meses) en aclimatación a condiciones de invernadero.

En todos los cultivares libres de virus obtenidos a partir de la termoterapia seguido del cultivo de los ápices meristemáticos y aclimatados a condiciones ambiente, otro aspecto importante a señalar es la hipótesis de que se podría haber eliminado además, con estas dos técnicas, parte del microbioma que cohabita en cada cultivar estudiado, como pueden ser las bacterias endófitas, propias de cada cultivar, o al menos disminuir parte de su población lo que podría llevar a que estas plantas libres de virus y con menos bacterias endófitas que las protejan, sean más susceptibles a agresiones externas y al ataque de enfermedades fúngicas frente a los mismos cultivares con virus y bajo las mismas condiciones ambientales (Fig. 4.29).

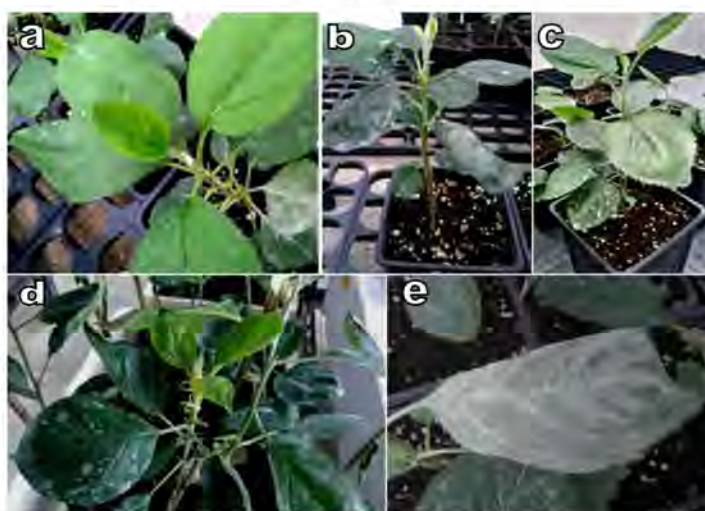


Figura 4.29 Cultivares libres de virus (a) ‘Cacharela’ y (b) ‘Camoesa’ infectados por la enfermedad oídio, después de 10 meses en condiciones de invernadero (c) ‘Príncipe Grande’ sin síntomas de oídio, después de 8 meses en condiciones de invernadero y (d) ‘Gravillán’ después de 12 meses en invernadero. e) Hoja con síntomas de oídio.

4.2 Termoterapia y Cultivo de Meristemos

El material vegetal de partida fueron brotes de los ocho cultivares de manzano y dos de peral establecidos in vitro procedentes del banco de germoplasma del CIAM que, como se dijo anteriormente, estaban caracterizados genéticamente. Antes de la recogida de estaquillas para su establecimiento in vitro en condiciones de asepsia, se comprobó la presencia de virus que son de obligada eliminación según normativa de la EPPO (1999) para erradicarlos. En todos los cultivares de manzano y peral seleccionados para este estudio únicamente se detectó la infección por los virus ApMV y ACLSV, confirmando la presencia de los dos tipos de virus en todos los cultivares tanto por sus síntomas externos, en condiciones de campo, como con la técnica de inmunoensayo DAS-ELISA.

a) Método de las estaquillas en baño termostático a 51 y 56°C

El primer método probado para la erradicación de los virus ApMV y ACLSV, se hizo sometiendo las estaquillas provenientes de campo en baño termostático con agua a temperatura de 51°C y 56°C, durante una hora. Los resultados con este primer método no fueron favorables debido a que la mayoría de las estaquillas tanto de manzano como de peral se contaminaron por hongos, después de permanecer 7 días en cámara de crecimiento. Las pocas estaquillas que permanecieron libres de contaminación tampoco desarrollaron yemas vegetativas, debido a la desecación que sufrieron por las altas temperaturas (**Fig. 4.30**).

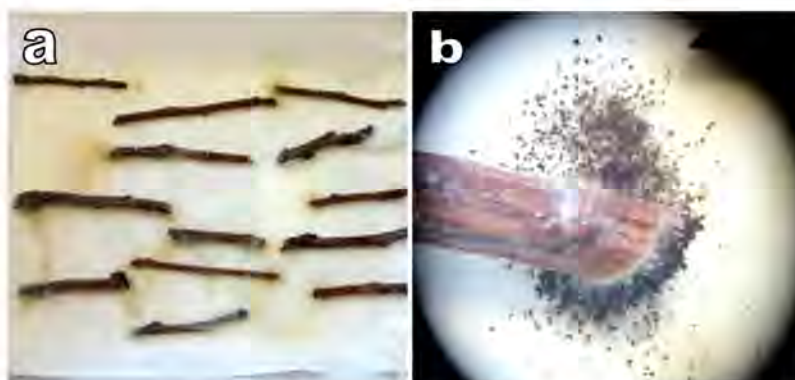


Figura 4.30 a) Estaquillas de manzano después de termoterapia a 51°C a los 7 días de su puesta en cámara de crecimiento, contaminadas por hongos b) Hifas y esporas de hongos en la base de las estaquillas vistas con estereoscopio.

b) Método de brotación de las estaquillas con termoterapia gradual

El segundo método probado en nuestro laboratorio, con las estaquillas provenientes de campo, utilizando termoterapia, con un aumento gradual de la temperatura (25°C-40°C), tampoco dio buenos resultados, debido a que los escasos brotes que emergieron durante la termoterapia resultaron quemados en su mayoría, no pudiendo aislarse el meristemo de ningún cultivar tanto de manzano como de peral. De los pocos brotes que no resultaron quemados en su totalidad, se aislaron y cultivaron los meristemos apicales, pero en ninguno de los cultivares de manzano y peral se consiguió la supervivencia *in vitro* (**Fig. 4.31**).

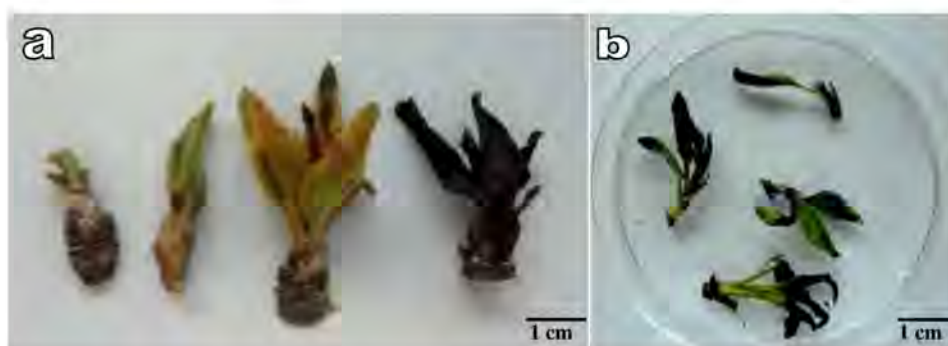


Figura 4.31 Brotes de (a) manzano y (b) peral después de permanecer las estaquillas 18 días en termoterapia desde los 25°C a 40°C.

c) Termoterapia gradual *in vitro*

Para este tercer método, las pruebas de terapia gradual *in vitro* con calor se realizaron en todos los cultivares de manzano y peral estudiados. De los tres métodos de termoterapia probados, ya comentados y descritos en el capítulo 3. Material y métodos (pág. 39), únicamente se obtuvieron buenos resultados con la termoterapia aplicada a los brotes cultivados *in vitro*. La termoterapia siempre se aplicó en brotes desarrollados en medios de multiplicación específicos para cada cultivar, después de seis o siete subcultivos antes del aislamiento y cultivo de sus ápices meristemáticos a partir de las yemas terminales. Esta técnica combinada, termoterapia seguida del aislamiento de meristemos, fue la que nos dio excelentes resultados en la erradicación de los virus (**Fig. 4.32**).

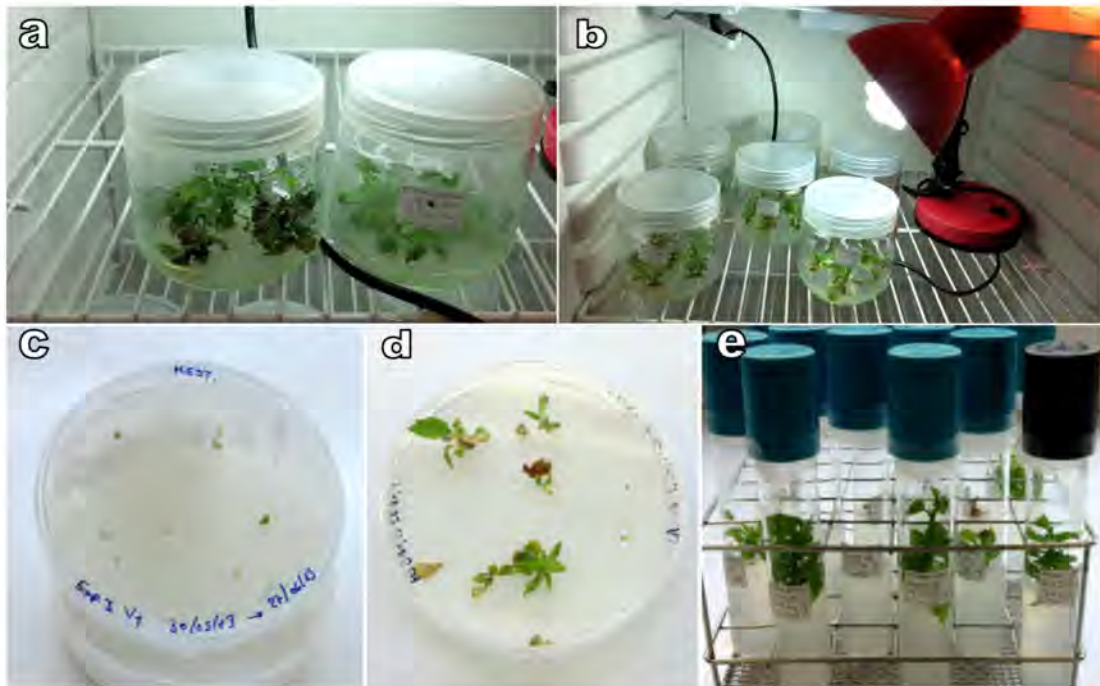


Figura 4.32 a) Brotes de peral ‘Barburiña’ en incubadora aplicando termoterapia gradual b) Brotes de manzano ‘Camoesa’ in vitro sometidos a termoterapia c) Cultivos de ápices meristemáticos aislados del cultivar ‘Camoesa’ después de permanecer 18 días con termoterapia d) Brotes del cultivar ‘Camoesa’ después de 4 semanas en medio de establecimiento e) Brotes del cultivar ‘Príncipe Grande’ provenientes de meristemas después de la termoterapia y después de 3 subcultivos.

El diseño experimental para su aplicación consistió en 5 jarras de cultivo por cada cultivar conteniendo, cada una de ellas, 6 brotes ($n=30$) que, en todos los casos, habían sido subcultivados en medio fresco siempre dos semanas antes de iniciar la termoterapia. La aplicación del calor se realizó de manera gradual ascendente, desde la temperatura existente en la cámara de crecimiento (24°C) incrementando 1°C por día la temperatura, comenzando por 25°C el primer día hasta 40°C , permaneciendo durante tres días más a esta última temperatura. Después de permanecer un total de 18 días en este periodo de termoterapia con incremento gradual de calor, se hizo el aislamiento de los ápices meristemáticos de los brotes que sobrevivieron e inmediatamente fueron puestos en medio de multiplicación específico para cada cultivar (**Fig.4.33**).

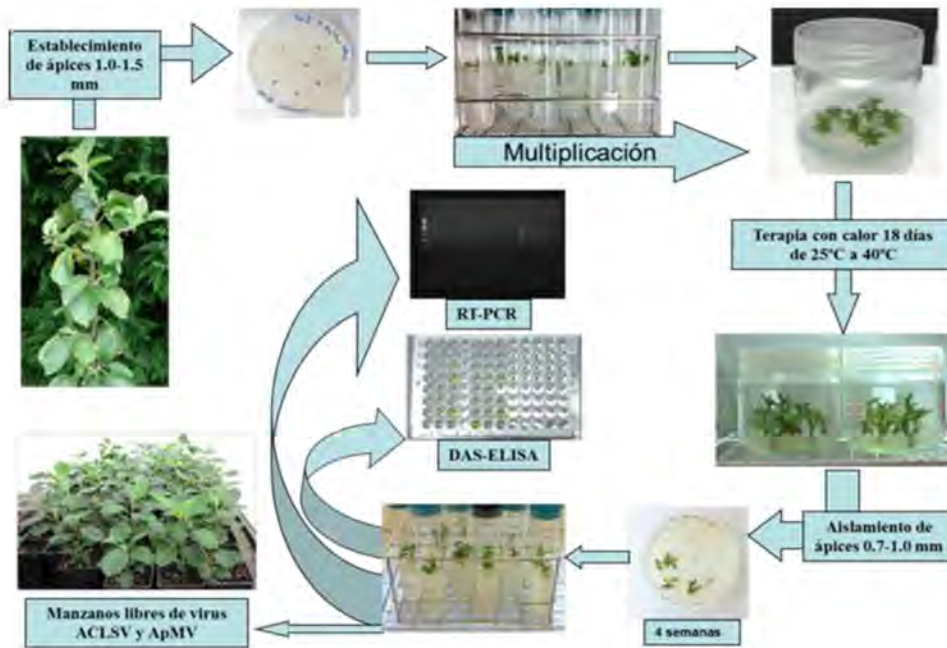


Figura 4.33 Procedimiento de termoterapia gradual in vitro combinada con cultivo de ápices meristemáticos aplicado para la obtención de cultivares de manzano y peral libres de virus.

La tasa de supervivencia fue diferente para los distintos cultivares siendo el cultivar de manzano ‘Gravillán’ el que mejor resistió las condiciones de altas temperaturas con un 100% de supervivencia mientras que el manzano ‘Repinaldo’ con solo un 6% de brotes supervivientes y ‘Tres en Cunca’ con un 13%, fueron los que peor soportaron la termoterapia. Los brotes desarrollados a partir de los ápices meristemáticos tratados, fueron multiplicados sobre medio de multiplicación específico para cada cultivar y se subcultivaron cada 4 semanas en medio fresco (**Fig. 4.34**).



Figura 4.34 a, b) Aspecto de los Brotes del cultivar ‘Repinaldo’ después de permanecer 18 días en termoterapia gradual alcanzando los 40°C.

Después de 4 subcultivos in vitro (4 meses), los brotes obtenidos de cada cultivar fue el material que se empleó para extraer su ARN y para ser analizado primero mediante el test de inmunoensayo DAS-ELISA y posteriormente se analizaron con la técnica RT-PCR, confirmando así la presencia o ausencia de virus (**Tabla 4.16**).

Tabla 4.16 Porcentajes de supervivencia de los ocho cultivares de manzano y dos de peral sometidos a la termoterapia (25°C-40°C) después de 18 días. Resultados en porcentajes de brotes obtenidos libres para los virus ApMV y ACLSV en todos los cultivares.

Cultivares	Termoterapia supervivencia (%)	Número Brotes analizados	Plantas libres de ApMV (%)	Plantas libres de ACLSV (%)
‘Cacharela’	63	7	100	57
‘Camoesa’	50	3	100	100
‘Gravillán’	100	27	100	96
‘José Antonio’	46	10	100	100
‘Ollo Mouro’	86	6	100	100
‘Príncipe Grande’	46	7	100	100
‘Repinaldo’	6	1	100	100
‘Tres en Cunca’	13	1	100	0
*‘Barburiña’	46	6	100	100
*‘Manteca Oscura’	56	13	100	100

Cultivares con * pertenecen a los dos perales

El número total de muestras analizadas para determinar la presencia de los virus ACLSV y ApMV, tanto con la técnica DAS-ELISA como con la RT-PCR, fue de 81, de las que el número final de muestras para analizar en cada cultivar varió en todos los cultivares según el número de brotes supervivientes tanto a la etapa de termoterapia como al aislamiento y cultivo de meristemos, dependiendo esta diferencia principalmente del genotipo de cada cultivar.

De acuerdo con los resultados obtenidos mediante el análisis con DAS-ELISA y RT-PCR, el porcentaje de plantas libres de virus para ApMV, fue del 100% para todos los cultivares (**Fig. 4.35**) tanto de manzano como de peral siendo un éxito el resultado con el método empleado.



Figura 4.35 Placa de microtitulación del DAS-ELISA, resultante de una lectura después de 12 horas de incubación. Los cultivares 'Príncipe Grande', y 'José Antonio' libres para ambos virus. Cultivar 'Tres en Cunca' libre de virus para ApMV, pero positivo para el virus ACLSV.

De los análisis realizados para determinar el porcentaje de plantas libres del virus ACLSV, se comprobó que en la mayoría de los cultivares también se obtuvo el 100% de plantas libres de este virus salvo en el cultivar 'Gravillán' que se obtuvo el 96% y en el cultivar 'Cacharela' en el que solo se consiguió el 57% de plantas libres de virus. Caso especial a tener en cuenta por el tamaño tan pequeño de muestra analizada (1 único brote en cada cultivar) se dio tanto con 'Tres en Cunca', en el que no se obtuvo plantas libres de ACLSV como con el cultivar 'Repinaldo' en el que se obtuvo el

resultado de un 100% libre del virus ACLSV, es decir que si se consiguió erradicar los dos tipos de virus también en este cultivar (Fig. 4.36, 4.37, 4.38 y 4.39).

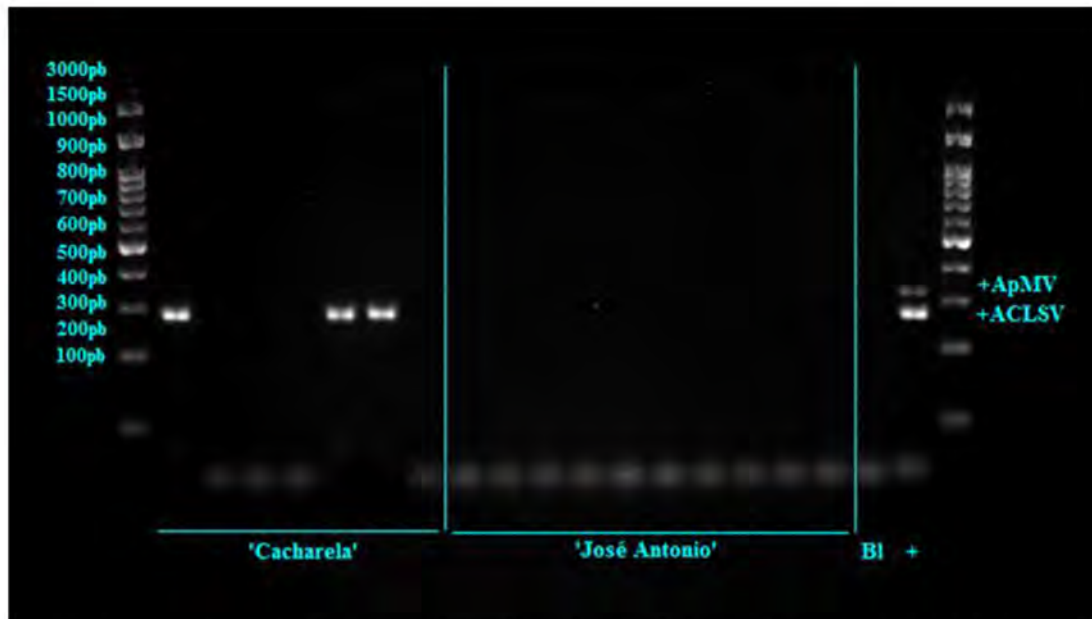


Figura 4.36 Resultado de la electroforesis del producto de la amplificación de la RT-PCR de todas las muestras analizadas de los cultivares 'Cacharela' y 'José Antonio', para ambos virus.

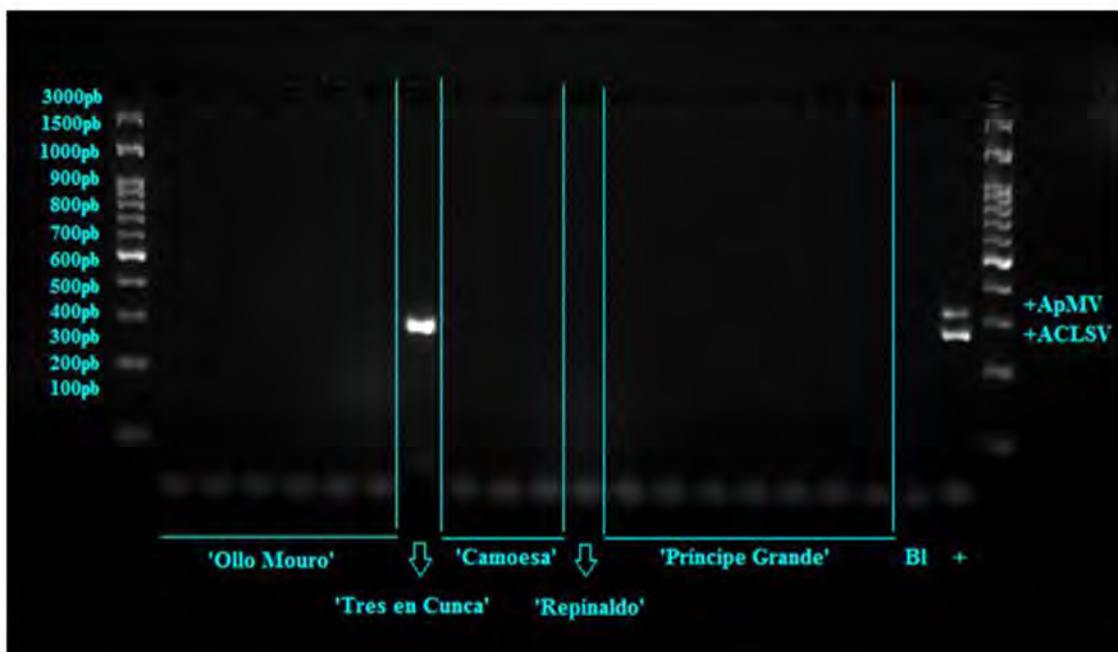


Figura 4.37 Resultado de la electroforesis del producto de amplificación de la RT-PCR de los cultivares 'Ollo Mouro', 'Tres en Cunca', 'Camoesa', 'Repinaldo' y 'Príncipe Grande' para ambos virus. Solo dio positivo la muestra de 'Tres en Cunca' para ACLSV.

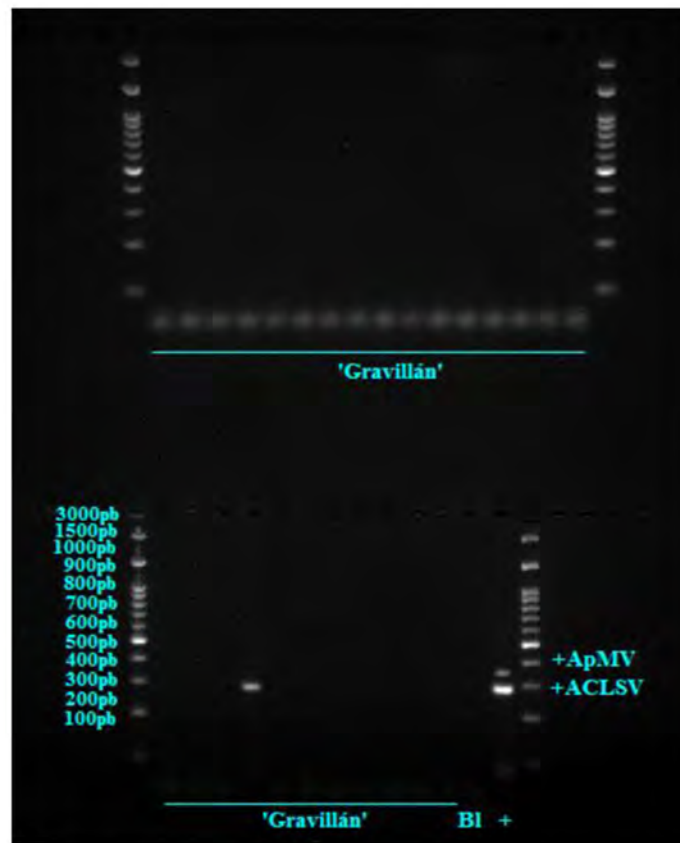


Figura 4.38 Resultado de la electroforesis del producto de amplificación de la RT-PCR del cultivar 'Gravillán' para ambos virus.

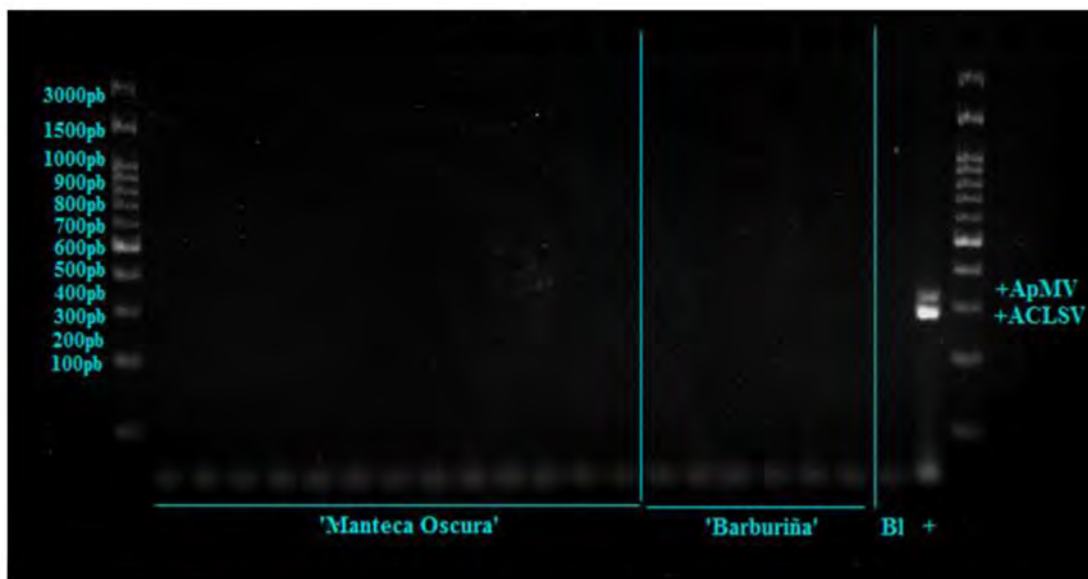


Figura 4.39 Resultado de la electroforesis del producto de amplificación de la RT-PCR de los dos perales que resultaron negativos para ambos virus.

4.3 Bacterias Endófitas Asociadas a Manzano y Peral

Durante la etapa de establecimiento y multiplicación *in vitro* de los ocho cultivares de manzano y los dos de peral se observó crecimiento bacteriano en el medio de cultivo, generalmente en la zona de contacto con el explanto, en todos ellos. La presencia, localización y tipo de crecimiento hizo pensar que se trataba de bacterias endófitas que forman parte del microbioma propio de un ser vivo, y no se trataba de una contaminación externa. De hecho, los explantos tenían buen aspecto externo sin mostrar contaminación externa alguna. Para poder determinar de qué género y/o especie de bacteria se trataba en cada caso, se aislaron y cultivaron las colonias desarrolladas en la zona basal de los explantos y se purificaron en cultivos sucesivos obteniendo colonias puras de cepas bacterianas encontradas en cada cultivar establecido *in vitro*. De cada una de ellas se hizo la extracción de ADN y, posteriormente, se realizó la amplificación del mismo mediante PCR, siguiendo el método ya descrito en el capítulo 3. Material y Métodos (pág. 45) en la metodología correspondiente a este apartado.

Se realizó la identificación de cada una de las diferentes bacterias endófitas, que forman parte de su microbioma, encontradas en los cultivos procedentes del material vegetal *in vitro*, correspondiente a cada una de las variedades de manzano y de peral estudiado y así poder determinar, a continuación, la sensibilidad o resistencia de dichas bacterias endófitas a distintos grupos seleccionados de antibióticos, teniendo presente la posibilidad de controlar su crecimiento.

Siempre se observó que la presencia de bacterias, que se supone endófitas, en el medio de cultivo se producía en la zona en contacto del medio con la base del tallo de los brotes de los distintos cultivares, visibles tanto en la fase de establecimiento como en la de multiplicación, y además en todos los subcultivos aunque no siempre en la misma cantidad. Es importante destacar que no todas las cepas bacterianas encontradas en el material vegetal de manzano y de peral, fueron susceptibles de poder cultivarse en el medio bacteriológico TSC utilizado para su aislamiento y cultivo, ni tampoco lo hacían en medio mineral basal MS, adicionado con citoquinina BA y auxina AIB, en concentraciones específicas para cada cultivar, que es el medio utilizado en el cultivo de los explantos y en el que dichas bacterias se hicieron visibles. Hay que señalar que de los exudados obtenidos de la base de los brotes cultivados de los dos cultivares de peral

‘Barburiña’ y ‘Manteca Oscura’, no se consiguió obtener cultivos bacterianos. Por tanto, y dada la posibilidad de cultivar algunas de las bacterias presentes, en principio sólo se hizo la identificación de aquellas cepas bacterianas que pudieron cultivarse en medio bacteriológico TSC. Fueron destacables los cultivos del grupo de las bacterias-rosa pigmentada facultativamente metilotróficas, tales como *Methylobacterium sp.* que se obtuvieron del cultivar de manzana ‘Príncipe Grande’ (Fig. 4.40).

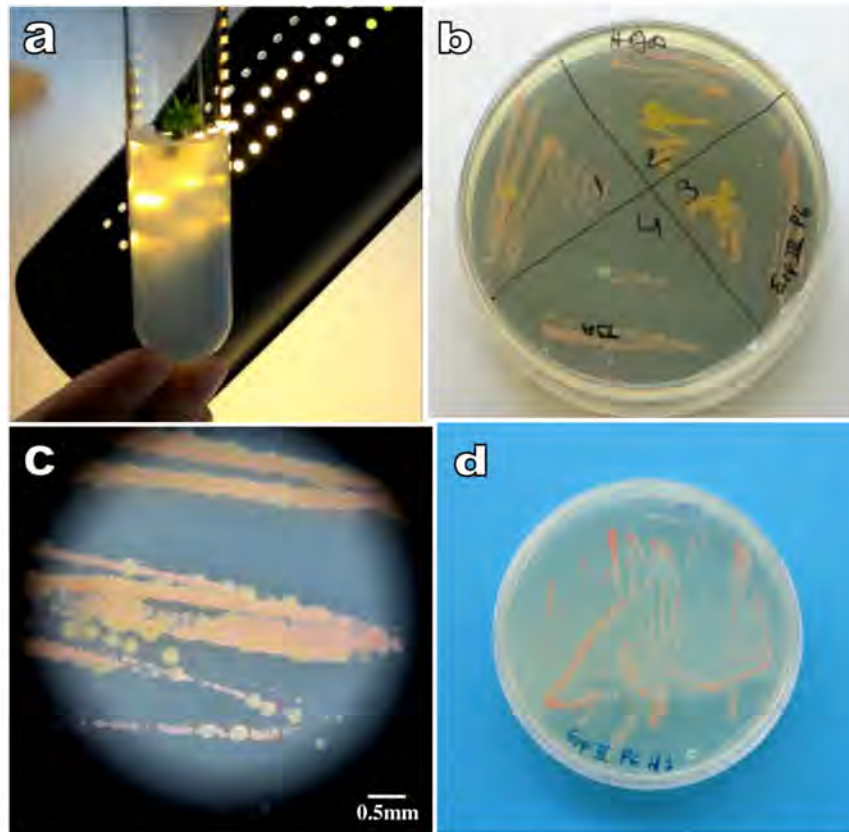


Figura 4.40 a) Halo de turbidez blanquecino presente en la base de un brote de manzano in vitro b) Placa de aislamiento de las distintas cepas bacterianas encontradas en el manzano ‘Príncipe Grande’ c) Visión al estereomicroscopio de las cepas bacterianas de dicho cultivar d) Cultivo puro de una de las cepas bacterianas encontrada en el manzano ‘Príncipe Grande’.

La identificación genética de las distintas cepas bacterianas, se hizo mediante análisis de secuenciación del gen ARNr 16S (Stab Vida) y se utilizó como base de datos el programa EzTaxon-EZbioCloud (Tabla 4.17). Como resultado de la identificación de las secuencias de nucleótidos obtenidas a partir de su ADN se obtuvo un listado de

las especies y cepas bacterianas más próximas, que pueden asociarse a los cultivares in vitro de manzano analizados.

Tabla 4.17 Resultado de la identificación genética de las cepas bacterianas encontrados en cuatro cultivares de manzano in vitro.

Cultivar	Especie más próxima encontrada	%ID
Camoesa (B1)	<i>Dermaococcus nishinomiyaensis</i>	98.40
Camoesa (B2)	<i>Dermaococcus nishinomiyaensis</i>	96.63
Camoesa (B3)	<i>Dermaococcus nishinomiyaensis</i>	94.83
Cacharela (B1)	<i>Luteibacter arthropi</i>	97.17
Príncipe Grande (H1)	<i>Methylobacterium pseudoasicola</i>	98.50
Príncipe Grande (H2)	<i>Luteibacter arthropi</i>	98.73
Príncipe Grande (T1)	<i>Methylobacterium pseudoasicola</i>	99.32
Príncipe Grande (T2)	<i>Methylobacterium pseudoasicola</i>	99.32
Tres en Cunca (T1)	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	99.71
Tres en Cunca (T2)	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	99.71
Repinaldo (H)	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	99.50
Repinaldo (T)	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	99.50

Las cepas de bacterias aisladas e identificadas a partir de las secuencias del ARNr 16S son las que se reflejan en la tabla 4.17 donde aparecen las distintas variedades de manzano a las que están asociadas (**Fig. 4.41**) Para los dos cultivares de peral y el resto de cultivares de manzano que no aparecen en la Tabla (4.17), no se consiguió aislar ni cultivar ningún tipo de bacterias, debido a que no fueron capaces de crecer en el medio bacteriológico TSC, a pesar de que siempre se observó la presencia de un exudado blanquecino turbio que dejaban los explantos en el medio de cultivo en la zona de contacto con la base de corte de los brotes in vitro. Este hecho fue debido probablemente a la existencia de colonias bacterianas no cultivables y tal vez fitoplasmas siendo de ese exudado externo de donde se tomaron las muestras para su cultivo.

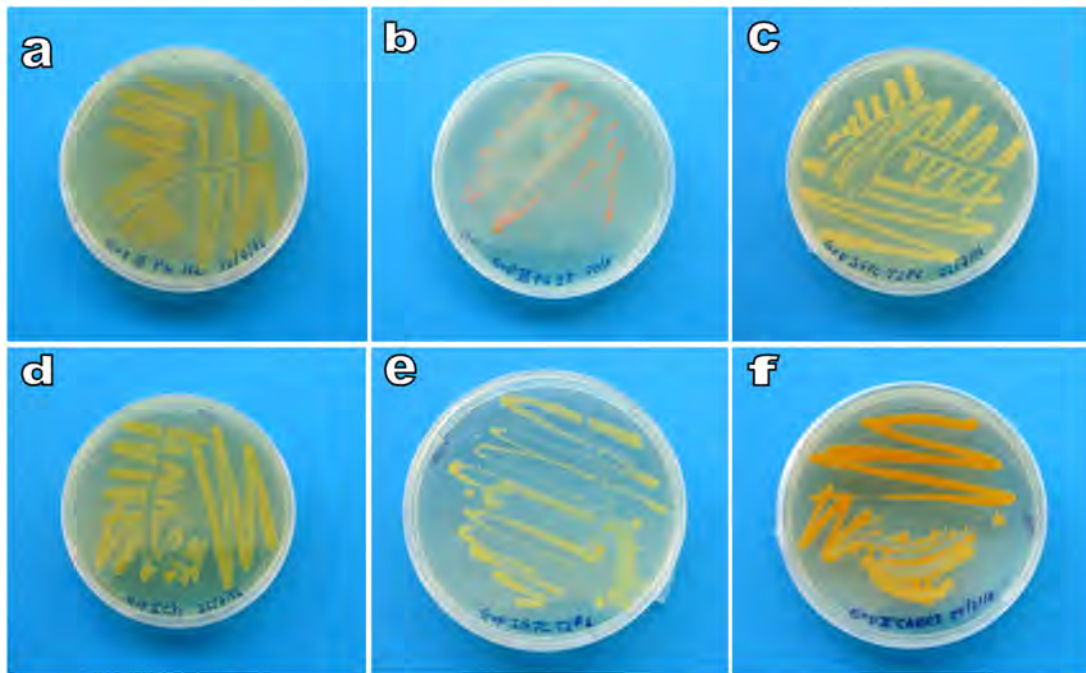


Figura 4.41 Bacterias aisladas del cultivar (a y b) ‘Príncipe Grande’ (c y e) ‘Tres en Cunca’ d) ‘Cacharela’ y f) del cultivar ‘Camoesa’.

4.3.1 Antibiograma

Una vez identificadas las cepas bacterianas cultivables, presentes en el material vegetal in vitro de manzano, se realizó el antibiograma como prueba microbiológica para determinar la sensibilidad o resistencia a los distintos antibióticos, de las bacterias endófitas asociadas al manzano.

La prueba de los antibiogramas se realizó para cada cepa bacteriana identificada, provenientes de los distintos cultivares, utilizando diez antibióticos comunes, pertenecientes a tres grupos diferentes, aminoglucósidos, betalactámicos y tetraciclina, activos frente a los microorganismos, que poseen distinto espectro de acción sobre bacterias tanto para Gram-positivas como para Gram-negativas, evaluando los resultados de inhibición para dos volúmenes diferentes de 5 y 10 μL de antibiótico a concentración de 1mg/mL. Por cada cepa bacteriana identificada se sembraron dos placas Petri de 9 cm de diámetro con medio bacteriológico TSC. En cada placa sembrada se colocaron 5 discos de papel impregnados con el mismo volumen de cinco

diferentes antibióticos, equidistantes entre sí y cada placa con un volumen distinto de antibiótico. Las placas cultivadas se mantuvieron en cámara de crecimiento a 24°C, con una intensidad luminosa de 40 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Después de 48 horas de cultivo se midió el diámetro de los halos de inhibición del crecimiento de cada cepa bacteriana en cada placa para cada tipo de antibiótico (Tablas 4.18, 4.19 y 4.20).

Tabla 4.18 Resultados del antibiograma de las cepas bacterianas encontradas en manzanos in vitro.

cv/Parte de la planta	Cepa Bacteriana	μl	Penicilina halo(mm)	Meticilina halo(mm)	Amoxicilina halo(mm)	Ampicilina halo(mm)
CA-Brote	<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i>	5	-	-	16	12
CA-Brote	<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i>	5	-	-	15	12
CA-Brote	<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i>	5	-	-	14	12
CH-Brote	<i>Luteibacter arthropi</i>	5	-	-	-	-
TC-Tallo1	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	5	7	-	10	-
TC-Tallo2	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	5	12	-	15	-
PG-Hoja1	<i>Methylobacterium pseudoasícola</i>	5	-	-	10	16
PG-Hoja2	<i>Luteibacter arthropi</i>	5	-	-	10	13
PG-Tallo1	<i>Methylobacterium pseudoasícola</i>	5	-	-	15	14
PG-Tallo2	<i>Methylobacterium pseudoasícola</i>	5	-	-	10	14
RP-Hoja	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	5	-	-	12	10
RP-Tallo	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	5	8	-	15	-
CA-Brote	<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i>	10	-	-	17	8
CA-Brote	<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i>	10	-	-	21	8
CA-Brote	<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i>	10	-	-	15	7
CH-Brote	<i>Luteibacter arthropi</i>	10	-	-	7	-
TC-Tallo1	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	10	10	8	20	14
TC-Tallo2	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	10	13	15	20	25
PG-Hoja1	<i>Methylobacterium pseudoasícola</i>	10	10	10	14	17
PG-Hoja2	<i>Luteibacter arthropi</i>	10	-	-	13	7
PG-Tallo1	<i>Methylobacterium pseudoasícola</i>	10	10	-	20	16
PG-Tallo2	<i>Methylobacterium pseudoasícola</i>	10	8	10	15	16
RP-Hoja	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	10	8	-	20	19
RP-Tallo	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	10	10	8	20	19

Tabla 4.19 Resultados del antibiograma de las cepas bacterianas encontradas en manzanos in vitro.

cv/Parte de la planta	Cepa Bacteriana	μ l	Cefalotina halo(mm)	Cefaclor halo(mm)	Ceftriaxona halo(mm)
CA-Brote	<i>Dermaococcus nishinomiyaensis</i>	5	-	12	8
CA-Brote	<i>Dermaococcus nishinomiyaensis</i>	5	-	16	15
CA-Brote	<i>Dermaococcus nishinomiyaensis</i>	5	-	15	12
CH-Brote	<i>Luteibacter arthropi</i>	5	-	12	10
TC-Tallo1	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	5	28	22	12
TC-Tallo2	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	5	24	10	10
PG-Hoja1	<i>Methylobacterium pseudoasícola</i>	5	10	12	14
PG-Hoja2	<i>Luteibacter arthropi</i>	5	-	10	23
PG-Tallo1	<i>Methylobacterium pseudoasícola</i>	5	13	15	15
PG-Tallo2	<i>Methylobacterium pseudoasícola</i>	5	12	15	15
RP-Hoja	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	5	28	25	10
RP-Tallo	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	5	28	26	14
CA-Brote	<i>Dermaococcus nishinomiyaensis</i>	10	7	20	15
CA-Brote	<i>Dermaococcus nishinomiyaensis</i>	10	14	25	15
CA-Brote	<i>Dermaococcus nishinomiyaensis</i>	10	8	18	12
CH-Brote	<i>Luteibacter arthropi</i>	10	-	22	22
TC-Tallo1	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	10	35	27	26
TC-Tallo2	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	10	35	25	15
PG-Hoja1	<i>Methylobacterium pseudoasícola</i>	10	13	20	24
PG-Hoja2	<i>Luteibacter arthropi</i>	10	-	20	30
PG-Tallo1	<i>Methylobacterium pseudoasícola</i>	10	20	15	25
PG-Tallo2	<i>Methylobacterium pseudoasícola</i>	10	14	18	25
RP-Hoja	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	10	40	30	24
RP-Tallo	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	10	35	30	23

Tabla 4.20 Resultados del antibiograma de las cepas bacterianas encontradas en manzanos in vitro.

cv/Parte de la planta	Cepa Bacteriana	µl	Kanamicina halo(mm)	Espectinomicona halo(mm)	Tetraciclina halo(mm)
CA-Brote	<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i>	5	-	-	13
CA-Brote	<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i>	5	-	-	25
CA-Brote	<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i>	5	-	-	16
CH-Brote	<i>Luteibacter arthropi</i>	5	12	-	15
TC-Tallo1	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	5	-	-	26
TC-Tallo2	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	5	-	-	12
PG-Hoja1	<i>Methylobacterium pseudoasícola</i>	5	-	-	18
PG-Hoja2	<i>Luteibacter arthropi</i>	5	-	-	15
PG-Tallo1	<i>Methylobacterium pseudoasícola</i>	5	-	-	14
PG-Tallo2	<i>Methylobacterium pseudoasícola</i>	5	-	-	12
RP-Hoja	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	5	8	9	20
RP-Tallo	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	5	-	7	20
CA-Brote	<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i>	10	14	12	-
CA-Brote	<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i>	10	15	13	-
CA-Brote	<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i>	10	14	18	-
CH-Brote	<i>Luteibacter arthropi</i>	10	25	18	27
TC-Tallo1	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	10	8	14	30
TC-Tallo2	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	10	9	15	30
PG-Hoja1	<i>Methylobacterium pseudoasícola</i>	10	20	18	20
PG-Hoja2	<i>Luteibacter arthropi</i>	10	19	12	33
PG-Tallo1	<i>Methylobacterium pseudoasícola</i>	10	10	10	20
PG-Tallo2	<i>Methylobacterium pseudoasícola</i>	10	10	10	20
RP-Hoja	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	10	12	13	22
RP-Tallo	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	10	10	13	28

Según los resultados del antibiograma, en ambos volúmenes probados (5 y 10 µL), los antibióticos Penicilina y Meticilina, mostraron una menor actividad de inhibición del crecimiento en casi todas las cepas bacterianas identificadas siendo, en la mayoría de los casos, cepas resistentes a dichos antibióticos. Sin embargo, Amoxicilina y Ampicilina, pese a pertenecer al mismo grupo de antibióticos de las penicilinas,

parece que tienen una actividad de inhibición mucho más fuerte frente a la mayoría de las cepas bacterianas identificadas, pudiendo ser cepas intermedias a estos antibióticos. Por otro lado, un volumen mayor (10 μ L) de los antibióticos Kanamicina y Espectinomicina, produjo también una actividad mayor de inhibición frente a un volumen de 5 μ L de estos antibióticos en el crecimiento de todas las cepas bacterianas estudiadas (Fig. 4.42).

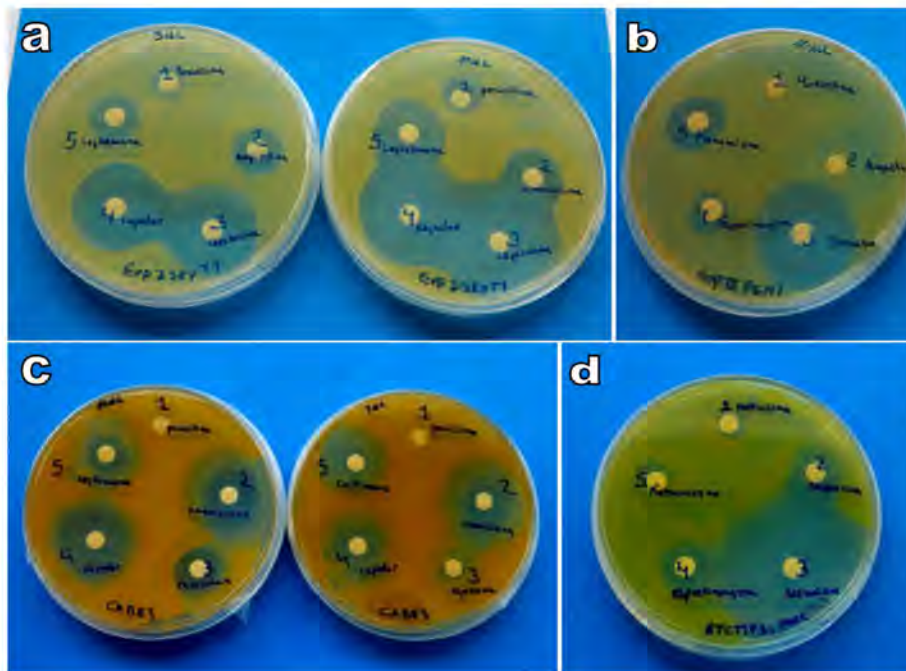


Figura 4.42 Resultados de los antibiogramas de las diferentes cepas bacterianas identificadas en el manzano a) ‘Repinaldo’ b) cultivar ‘Príncipe Grande’ c) cultivar ‘Camoesa’ y d) cultivar ‘Tres en Cunca’.

La actividad de Tetraciclina indica claramente que la mayoría de las cepas bacterianas fueron sensibles a este antibiótico para ambos volúmenes probados (5 y 10 μ L). Las bacterias endófitas asociadas a manzano, como *Curtobacterium flaccumfaciens*, fueron en su mayoría sensibles al grupo de antibióticos de las cefalosporinas (Cefalotina, Cefaclor y Ceftriaxona) para ambos volúmenes probados. La influencia de este grupo de antibióticos sobre la inhibición del crecimiento bacteriano, también reveló un mayor espectro de actividad antibacteriana que el grupo de las

penicilinas y del de los aminoglucósidos sobre las cepas identificadas asociadas a los cultivos in vitro de manzano.

4.3.2 Estudio histológico

Ya que en todos los cultivos de los diferentes cultivares de manzano y peral se observó la presencia de bacterias en el medio, se realizó un estudio histológico de los brotes de ambas especies para comprobar si las bacterias tienen una localización extra o intracelular, y saber si pueden distribuirse por toda la planta.

Para ello se hizo la inclusión en parafina de secciones de tallo, hojas y yemas apicales tiñendo posteriormente los cortes realizados, de 12 μm , con la doble tinción Tionina-Orange G, que pone de manifiesto, en color azul intenso, la presencia de bacterias y el lugar donde se encuentran.

Con esta tinción, en todos los cortes histológicos examinados al microscopio óptico, con un aumento con objetivo 100X planacromático y aceite de inmersión, se observa la presencia de bacterias algunas de las cuales parecen estar localizadas en la periferia de la membrana plasmática intracelularmente en células del floema y células de parénquima del xilema donde también se aprecia acumulación de almidón y cuerpos lipídicos. La compleja composición del microbioma de cualquiera de los cultivares estudiados nos informa de la presencia de múltiples clases de bacteria en cada uno de ellos, pertenecientes a diferente phylum y siendo unas Gram-positivas o Gram-negativas, lo que explicaría el porqué de la distinta localización de diferentes bacterias, teniendo en cuenta, como se ha demostrado, que algunas bacteria endófitas no cultivables también que son intracelulares (**Fig. 4.43**).

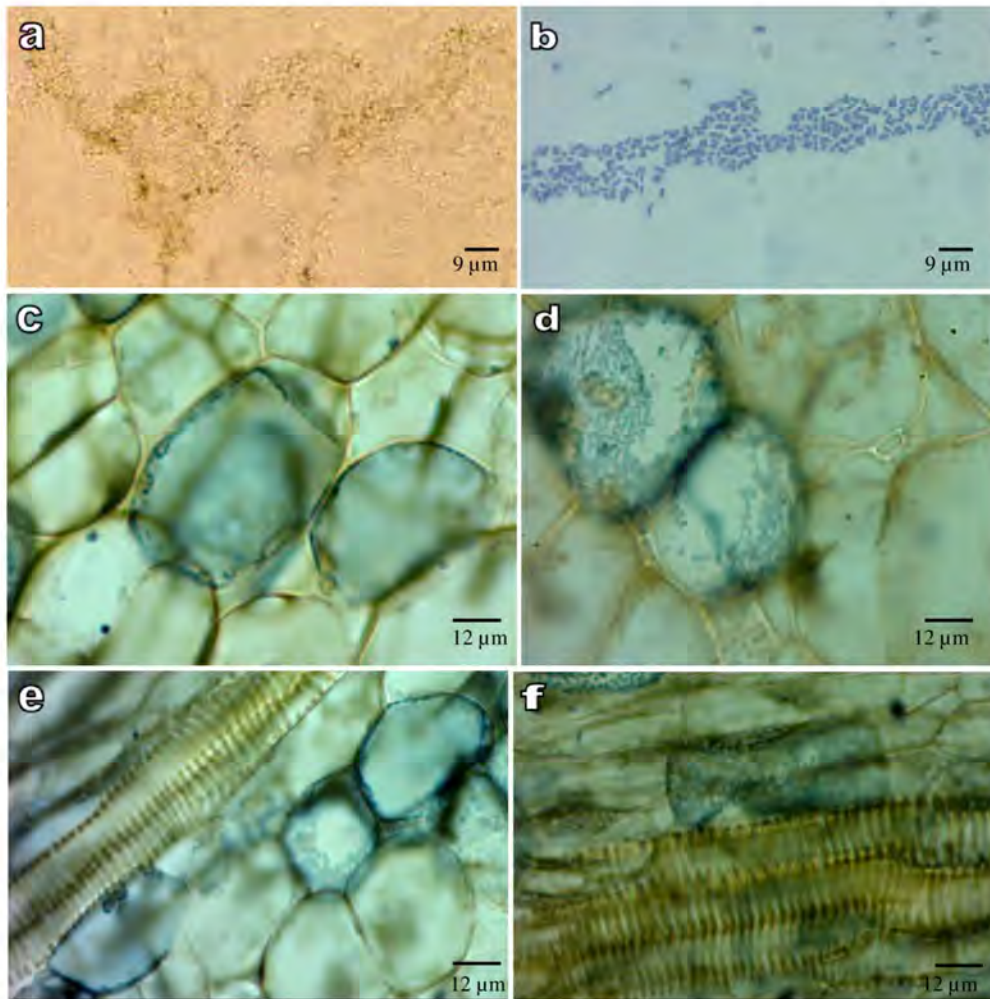


Figura 4.43 Microfotografías de bacterias endófitas del cultivar ‘Tres en Cunca’ cultivado in vitro a) Visualización de la extracción directa de un brote con múltiples bacterias b) Tinción de una cepa aislada de un cultivo puro de *Curtobacterium flaccumfaciens* en medio TSC, c y d) Sección longitudinal de tallo de un brote, mostrando células de parénquima con presencia intracelular de bacterias teñidas de azul mediante la doble coloración Tionina-Orange G. e y f) Sistema vascular del xilema de un brote in vitro como vía de transporte para la distribución de bacterias por la planta. (Todas fueron hechas con objetivo 100X con aceite de inmersión).

Al mismo tiempo se realizó la doble tinción safranina-verde rápido para estudiar los tejidos en donde están presentes las bacterias, comprobar en donde se establece la conexión de los haces vasculares con el meristemo apical y ver la estructura histológica y celular de los brotes. Se comprobó la presencia de elementos vasculares en la base del inicio de las hojas en los meristemos tanto apicales como de las yemas axilares. Este

resultado nos confirmó que efectivamente el meristemo apical de la yema terminal de los brotes y los dos primeros primordios de hojas carecen de conexión vascular con el tejido del cuerpo del tallo, pero las primeras hojas expandidas ya presentan elementos vasculares, tipo traqueidas, en su base y conexión vascular con el sistema vascular del tallo.

Para la erradicación de virus, aislamos los ápices meristemáticos de 0.7 a 1.0 mm, lo cual incluye el propio meristemo apical de 0.2 mm más las dos primeras hojitas con algunos elementos vasculares (**Fig. 4.44**). El hecho de haber iniciado los cultivos en el establecimiento con ápices de entre 1.0 y 1.5 mm, como material de partida de cada uno de los cultivares, nos proporcionó un material probablemente con menor título de virus que los brotes de las estaquillas, como material de campo, lo que favoreció que al aplicar la termoterapia gradual y aislar los ápices de un tamaño <1.0 mm, se consiguiera la erradicación de los virus ApMV y ACLSV en la práctica totalidad de los cultivares estudiados de manzano y peral.

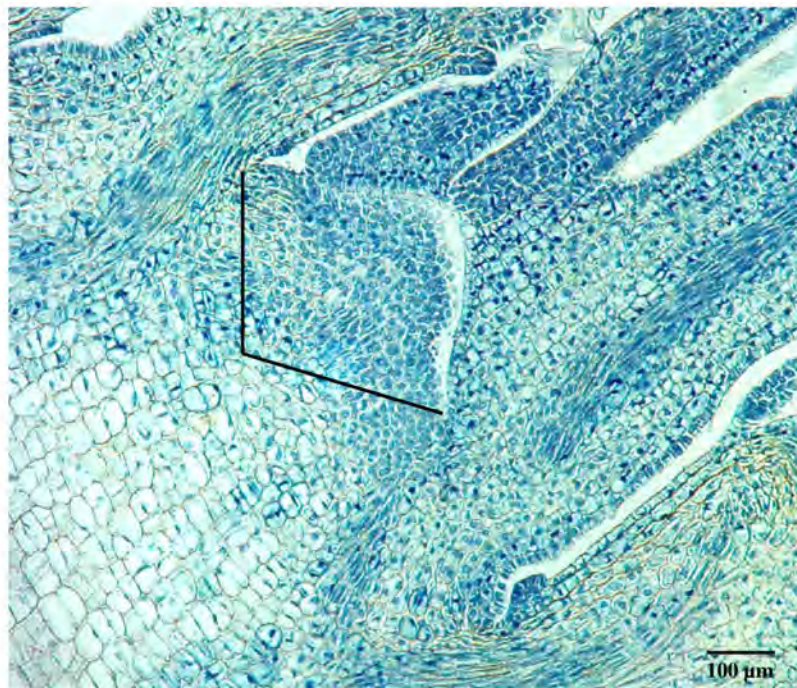


Figura 4.44 Microfotografía del meristemo apical de una yema de manzano cultivada in vitro mostrando la falta de conexión vascular con el resto del tallo.

4.3.3 Metagenómica

Para evitar la contaminación externa por microorganismos y partir de material en condiciones asépticas, se utilizó para el estudio de metagenómica brotes cultivados in vitro de los distintos cultivares de manzano y peral. En un primer análisis de secuenciación de todo el genoma de estas plantas, se detectó la interferencia de las secuencias por cloroplastos, un problema común al muestrear comunidades microbianas en plantas, debido a la homología entre el 16S bacteriano, y el 16S del cloroplasto presente en las plantas. Los cloroplastos son descendientes evolutivamente de bacterias, por lo que no es sorprendente que los genes 16S sean casi homólogos entre los dos (Hanshew et al. 2013). En una segunda secuenciación, se encontraron en los resultados una población muy diversa que colonizan estos cultivares de manzano y peral algunos de carácter patógeno y otras simbioses e incluso beneficiosas para estas plantas.

La secuenciación del ADN proveniente de los brotes de manzano y peral in vitro analizados, dio como resultado la existencia de numerosas bacterias en las que el phylum de mayor presencia lo constituían las Proteobacterias con un 72.71%, seguido de Firmicutes con un 12.48% y Actinobacterias con un 7.42% y en menor porcentajes los phyla Verrucomicrobia (0.24%), Bacteroidetes (0.05%) y Tenericutes (0.02%), y un 7.08% no clasificado en el que se incluye virus bacteriófagos.

Para realizar las tablas de taxonomía relativas a cada cultivar, se realizó un cribado de los géneros eliminando aquellos porcentajes que fueron <0.01 % y se siguió con un ajuste de porcentaje en los resultados con datos brutos. Así, la mayor diversidad taxonómica del microbioma en los cultivares de manzano, a nivel de género, lo mostró el cultivar ‘Gravillán’ con 26 géneros diferentes encontrados, seguido de ‘Camoesa’ con 24 géneros, ‘Cacharela’ con 13 géneros, ‘Repinaldo’ (12), ‘Príncipe Grande’ (11) y los cultivares ‘Tres en Cuna’, ‘Ollo Mouro’ y ‘José Antonio’ con 9 géneros identificados (**Tablas 4.21, 4.22, 4.23 y 4.24**). En los cultivares de peral se identificó menor diversidad bacteriana siendo de 11 géneros para el cultivar ‘Barburiña’ y de tan solo 9 géneros mayores 0.01 % para el cultivar ‘Manteca Oscura’ (**Tabla 4.25**).

Tabla 4.21 Relación de géneros, y algunos a nivel de especie, identificados en los cultivares de manzano ‘Gravillán y ‘Camoesa’, con un porcentaje de presencia $\geq 0.01\%$. La relación completa del microbioma de ambos cultivares figura en los Anexos Tabla 9.

Microbioma (%)	‘Gravillán’	Microbioma (%)	‘Camoesa’
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	59.87	<i>Sphingomonas echinoides</i>	39.90
<i>Sphingomonas echinoides</i>	20.76	<i>Burkholderia andropoginis</i>	27.98
<i>Burkholderia andropoginis</i>	9.40	<i>Luteibacter rhizovicinus</i>	25.02
<i>Fronidhabitans sp.</i>	4.14	<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	1.52
<i>Luteibacter rhizovicinus</i>	1.89	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	1.48
<i>Methylobacterium pseudoasícola</i>	0.72	<i>Methylobacterium pseudoasícola</i>	1.43
<i>Rudaeicoccus suwonensis</i>	0.68	<i>Cyanobacterium spp.</i>	0.89
<i>Cyanobacterium spp.</i>	0.49	<i>Acidovorax sp.</i>	0.65
<i>Paenibacillus validus</i>	0.43	<i>Curvibacter spp.</i>	0.20
<i>Spirosoma sp.</i>	0.32	<i>Rudaeicoccus suwonensis</i>	0.19
<i>Delftia spp.</i>	0.23	<i>Kribbia sp.</i>	0.15
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0.16	<i>Fronidhabitans sp.</i>	0.15
<i>Pelomonas aquatica</i>	0.16	<i>Pseudomonas sp.</i>	0.14
<i>Pseudomonas spp.</i>	0.14	<i>Rhodanobacter terrae</i>	0.07
<i>Cellulomonas sp.</i>	0.12	<i>Syntrophus spp.</i>	0.05
<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	0.11	<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i>	0.03
<i>Propionibacterium acnes</i>	0.09	<i>Propionibacterium acnes</i>	0.04
<i>Corynebacterium sp.</i>	0.06	<i>Corynebacterium sp.</i>	0.02
<i>Streptomyces sp.</i>	0.08	<i>Bacteroides sp.</i>	0.02
<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i>	0.05	<i>Cloacibacterium normanense</i>	0.01
<i>Hyphomicrobium spp.</i>	0.03	<i>Delftia spp.</i>	0.01
<i>Hermiimonas spp.</i>	0.03	<i>Spirosoma sp.</i>	0.01
<i>Sorangium spp.</i>	0.02	<i>Shigella sonnei</i>	0.01
<i>Acidovorax sp.</i>	0.01	<i>Cellulomonas sp.</i>	0.01
<i>Arsenicococcus sp.</i>	0.01		
<i>Xanthobacter sp.</i>	0.01		

Tabla 4.22 Relación de géneros, y algunos a nivel de especie, identificados en los manzanos ‘Cacharela’ y ‘Repinaldo’ con un porcentaje de presencia $\geq 0.01\%$. La relación completa del microbioma de ambos cultivares figura en los Anexos Tabla 9 y Tabla 10 respectivamente.

Microbioma (%)	‘Cacharela’	Microbioma (%)	‘Repinaldo’
<i>Luteibacter rhizovicinus</i>	96.83	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	64.21
<i>Burkholderia andropoginis</i>	1.57	<i>Burkholderia andropoginis</i>	23.67
<i>Sphingomonas echinoides</i>	0.72	<i>Luteibacter rhizovicinus</i>	5.02
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	0.34	<i>Fronidhabitans sp.</i>	2.67
<i>Rhodanobacter terrae</i>	0.17	<i>Methylobacterium pseudoasícola</i>	2.37
<i>Rudaeicoccus suwonensis</i>	0.15	<i>Sphingomonas echinoides</i>	1.55
<i>Methylobacterium pseudoasícola</i>	0.12	<i>Rudaeicoccus suwonensis</i>	0.42
<i>Lysobacter sp.</i>	0.04	<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	0.04
<i>Cyanobacterium spp.</i>	0.02	<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i>	0.02
<i>Fronidhabitans sp.</i>	0.02	<i>Rhodanobacter terrae</i>	0.02
<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i>	0.02	<i>Cyanobacterium spp.</i>	0.01
<i>Chloroflexus spp.</i>	0.01	<i>Massilia timonae</i>	0.01
<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	0.01		

Tabla 4.23 Relación de géneros, y algunos a nivel de especie, identificados en manzanos ‘José Antonio’ y ‘Príncipe Grande’ con un porcentaje de presencia $\geq 0.01\%$. La relación completa del microbioma de ambos cultivares figura en los Anexos Tabla 9 y Tabla 10 respectivamente.

Microbioma (%)	‘Príncipe Grande’	Microbioma (%)	‘José Antonio’
<i>Luteibacter rhizovicinus</i>	68.74	<i>Burkholderia andropoginis</i>	98.19
<i>Methylobacterium pseudoasícola</i>	26.85	<i>Luteibacter rhizovicinus</i>	0.72
<i>Burkholderia andropoginis</i>	2.85	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	0.71
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	0.67	<i>Sphingomonas echinoides</i>	0.13
<i>Sphingomonas echinoides</i>	0.42	<i>Rudaeicoccus suwonensis</i>	0.11
<i>Rhodanobacter terrae</i>	0.23	<i>Methylobacterium pseudoasícola.</i>	0.09
<i>Rudaeicoccus suwonensis</i>	0.16	<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i>	0.02
<i>Cyanobacterium spp.</i>	0.02	<i>Fronidhabitans sp.</i>	0.01
<i>Fronidhabitans sp.</i>	0.02	<i>Pseudomonas sp.</i>	0.01
<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i>	0.02		
<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	0.01		

Tabla 4.24 Relación de géneros, y algunos a nivel de especie, identificados en los cultivares de manzano ‘Tres en Cuna’ y ‘Ollo Mouro’, con un porcentaje de presencia $\geq 0.01\%$. La relación completa del microbioma de ambos cultivares figura en los Anexos Tabla 10.

Microbioma (%)	‘Tres en Cuna’	Microbioma (%)	‘Ollo Mouro’
<i>Burkholderia andropoginis</i>	69.67	<i>Rudaeicoccus suwonensis</i>	94.70
<i>Luteibacter rhizovicius</i>	20.80	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	1.78
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	8.71	<i>Sphingomonas echinoides</i>	1.42
<i>Sphingomonas echinoides</i>	0.26	<i>Luteibacter rhizovicius</i>	0.78
<i>Rudaeicoccus suwonensis</i>	0.22	<i>Burkholderia andropoginis</i>	0.65
<i>Methylobacterium pseudoasicola</i>	0.15	<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i>	0.54
<i>Rhodanobacter terrae</i>	0.08	<i>Fronidhabitans sp.</i>	0.06
<i>Fronidhabitans sp.</i>	0.07	<i>Methylobacterium pseudoasicola</i>	0.05
<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i>	0.04	<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	0.02

Tabla 4.25 Relación de géneros, y algunos a nivel de especie, identificados en los cultivares de peral ‘Barburiña’ y ‘Manteca Oscura’, con un porcentaje de presencia $\geq 0.01\%$. La relación completa del microbioma de ambos cultivares figura en los Anexos Tabla 11.

Microbioma (%)	‘Barburiña’	Microbioma (%)	‘Manteca Oscura’
<i>Burkholderia andropoginis</i>	97.85	<i>Burkholderia andropoginis</i>	98.92
<i>Luteibacter rhizovicius</i>	0.83	<i>Luteibacter rhizovicius</i>	0.57
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	0.50	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	0.23
<i>Sphingomonas echinoides</i>	0.37	<i>Rudaeicoccus suwonensis</i>	0.09
<i>Methylobacterium pseudoasicola</i>	0.23	<i>Sphingomonas echinoides</i>	0.08
<i>Rudaeicoccus suwonensis</i>	0.14	<i>Methylobacterium pseudoasicola</i>	0.06
<i>Cloacibacterium normanense</i>	0.02	<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i>	0.02
<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i>	0.02	<i>Pseudomonas sp.</i>	0.02
<i>Corynebacterium sp.</i>	0.01	<i>Fronidhabitans sp.</i>	0.01
<i>Cyanobacterium spp.</i>	0.01		
<i>Rhodanobacter terrae</i>	0.01		

Dentro de la diversidad bacteriana identificada en cada uno de los cultivares estudiados, se observó que existe una especie predominante en mayor presencia dependiendo del genotipo del cultivar como es el caso de la bacteria *Burkholderia andropoginis*, especie con mayor porcentaje en los cultivares de manzano ‘José Antonio’ y ‘Tres en Cunca’ y en los dos de peral ‘Barburiña’ y ‘Manteca Oscura’ (Fig.4.45); *Luteibacter rhizovicius* para los cultivares de manzano ‘Cacharela’ y ‘Príncipe Grande’; *Curtobacterium flaccumfaciens* es especie predominante para los cultivares ‘Gravillán’ y ‘Repinaldo’, *Rudaeicoccus suwonensis* para el cultivar de manzano ‘Ollo Mouro’. Sin embargo, el cultivar ‘Camoesa’ mostró una diversidad distribuida más uniformemente entre tres especies mayoritarias, aunque *Sphingomonas echinoides* representa el mayor porcentaje (Fig. 4.46).

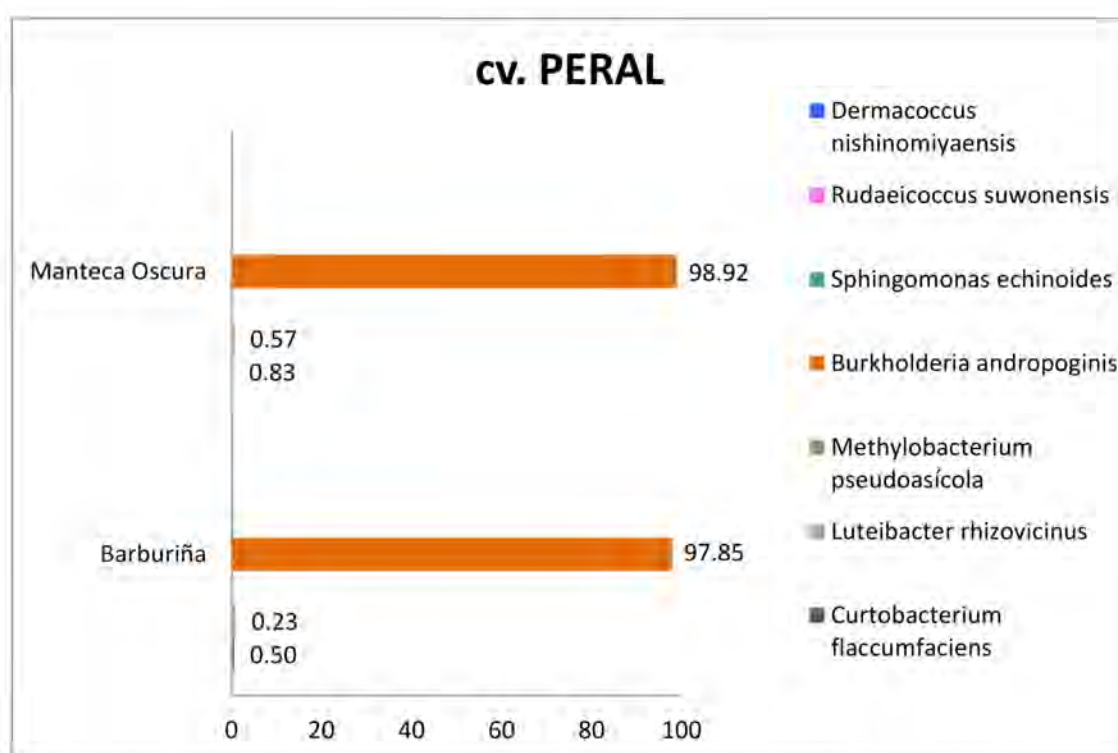


Figura 4.45 Histograma representativo de la especie común de la bacteria predominante, presente en los dos cultivares de peral.

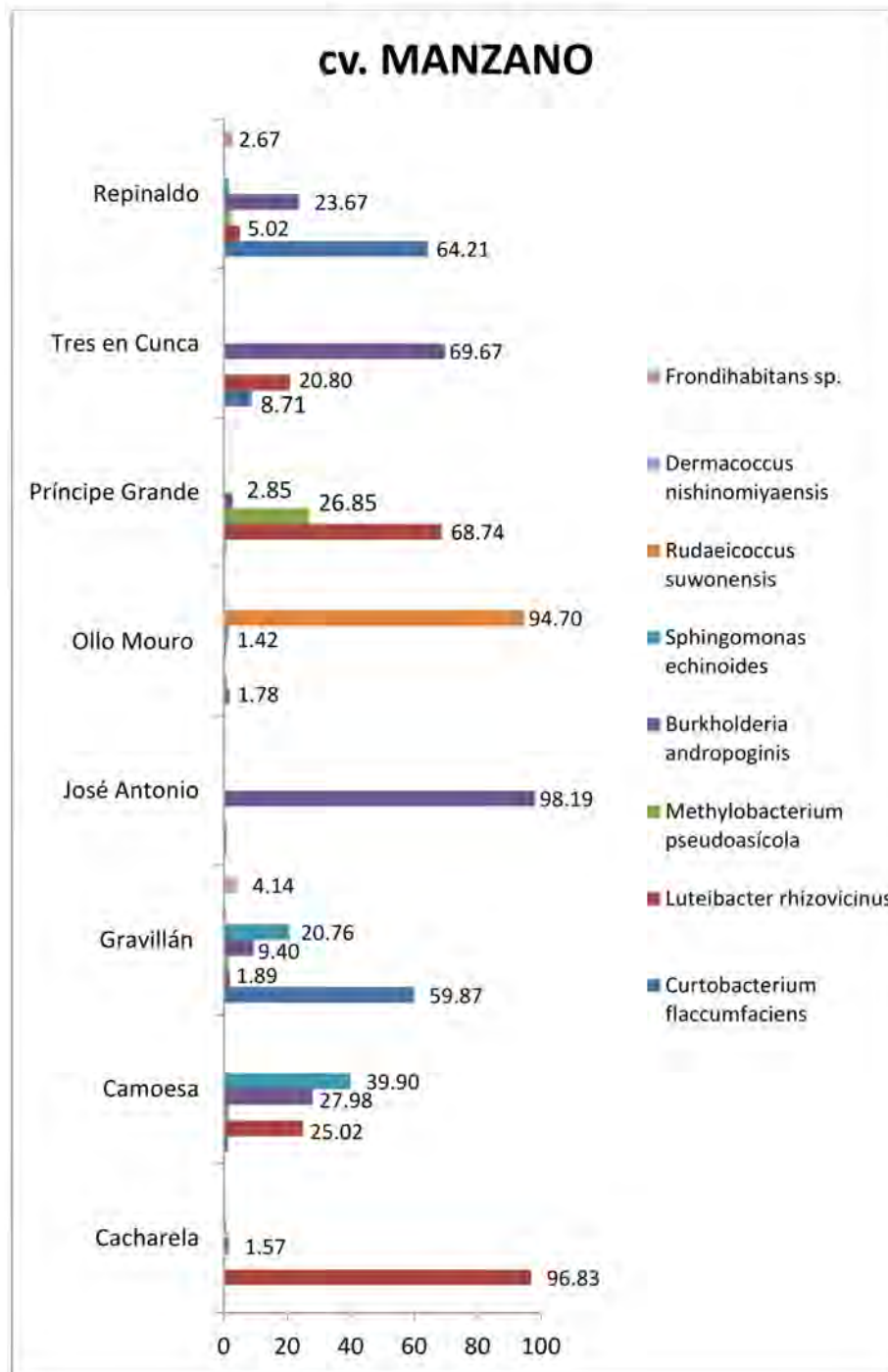


Figura 4.46 Histograma representativo de las ocho especies comunes de bacterias, algunas predominantes, presentes en cada uno de los cultivares de manzano.

Es importante destacar que en estos cultivares de manzano y peral, existen bacterias endófitas no susceptibles de cultivo ya sea porque se encuentran en menor

porcentaje o porque necesiten de la planta para poder vivir. Dentro de la diversidad bacteriana obtenida por análisis 16S de metagenómica, que aparece documentado en este estudio tanto en brotes de manzano como de peral in vitro, hay que señalar que únicamente cuatro géneros fueron susceptibles de ser aislados y cultivados en medio bacteriológico (*Curtobacterium*, *Methylobacterium*, *Luteibacter* y *Dermacoccus*). Por poner un ejemplo, tenemos el caso del manzano ‘Gravillán’ en el que, mediante el análisis de todo su genoma, se identificaron 26 géneros de bacteria ($\geq 0.01\%$) y solo 4 de ellos fueron bacterias cultivables.

Esta alta diversidad bacteriana endofítica identificadas en brotes in vitro, sin potencialmente daños aparentes tanto en plantas en campo como en cultivo in vitro nos sugiere que estos organismos comparten una asociación simbiótica o mutualista con el huésped. Sería importante explicar el papel que desempeñan estas bacterias endófitas en los cultivares de ambas especies tanto en *Pyrus* como en *Malus* para comprender mejor, en futuras investigaciones, esa interrelación entre huésped-microorganismo, y su implicación en los procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas así como su intervención en los mecanismos de defensa contra ciertos patógenos lo que nos llevaría a un mejor aprovechamiento a nivel hortofrutícola en la explotación de estos frutales.

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

En términos generales, la conservación de genotipos tradicionales de frutales en bancos de germoplasma es un hecho de interés económico y social que se hace cada día más necesario debido a la continua aparición de nuevas variedades, adaptadas a la demanda del consumidor, lo que nos ha llevado a una lenta pero continua sustitución de nuestra diversidad frutícola tradicional por variedades foráneas. Los problemas son mayores cuando estos frutales, tanto de manzano como de peral (*Malus* y *Pyrus*), presentan enfermedades, principalmente víricas, derivadas casi siempre de los métodos tradicionales de propagación vegetativa. La recuperación y saneamiento de estos cultivares es imprescindible para evitar la pérdida irreparable de la diversidad genética y, por otro lado, para poder comercializarlos. En la recuperación y la eliminación in vitro de virus, que son causa de enfermedad de estos frutales, el desarrollo de protocolos de micropropagación eficaces es un requisito previo para conseguir disponer de un gran número de plántulas (Sedlák & Paprstein 2016).

En la fase de establecimiento en cultivo in vitro, uno de los principales problemas, si no el mayor, es el hecho de que el material vegetal de partida, procedente del campo, esté muy contaminado, dificultando así su establecimiento in vitro. La utilización de yemas apicales de pequeño tamaño (1.0-1.5 mm), como explantos iniciales nos permitió el establecimiento in vitro de estos diez cultivares de los géneros *Malus* y *Pyrus*. Otros autores han demostrado también que el uso de yemas apicales, de tan solo unos pocos mm de longitud, presenta beneficios para el establecimiento (Tan et al. 2010; Wang MR et al. 2016) al ser un material mucho menos contaminado. En nuestro trabajo la colocación de un disco de papel filtro estéril sobre el medio de cultivo de establecimiento evitó en gran medida, en esta fase, la contaminación y la rápida proliferación de bacterias endófitas presentes en el material vegetal de partida lo que permitió el desarrollo más rápido de las yemas apicales establecidas, mejorando así la tasa de supervivencia del material in vitro.

Las observaciones y las conclusiones derivadas de los resultados de los ensayos preliminares realizados con los cultivares de manzano y de peral motivo de estudio (datos no mostrados), nos llevó a seleccionar, de entre todos los medios probados, el medio mineral MS adicionado con BA (1 mgL^{-1}) GA₃ (0.2 mgL^{-1}) y AIB (0.3 mgL^{-1})

que resultó ser el más conveniente para establecer todos los cultivares seleccionados. El efecto combinado de BA y GA₃ para el establecimiento del cultivo in vitro en árboles frutales ya fue definido tanto para el peral (Hirabayashi et al. 1987) como para los manzanos (Yepes et al. 1994), incluso a partir de brotes nodales de manzanos (Chakrabarty et al. 2003). La presencia de GA₃ junto con la citoquinina BA y la auxina AIB promovió el crecimiento de los brotes establecidos tanto en *Pyrus* (Shibli et al. 1997) como en *Malus* (Modgil et al. 1999). Sin embargo, algunos autores indican que la presencia de GA₃ inhibe el desarrollo de brotes de manzana en etapas posteriores de multiplicación e incluso en la de enraizamiento (Rodríguez et al. 1991). Nosotros también pudimos comprobar que suprimiendo GA₃ en los medios de cultivo, para la etapa de multiplicación mejoraba el desarrollo de los brotes axilares de los distintos cultivares, de manera que la multiplicación de todos se realizó sobre medios basales MS con distintas combinaciones entre diferentes citoquininas y la auxina AIB.

Hay que señalar desde un principio que los resultados que obtuvimos en el establecimiento in vitro de cultivares de manzano y peral, variaron mucho en función del cultivar utilizado. Esta diferencia porcentual, entre el 11% para ‘Camoesa’ y el 55% para ‘Repinaldo’, pudo ser debido, por un lado, a que todo el material de partida, al proceder del exterior, está muy contaminado, incluso con bacterias endófitas, aunque en distinto grado de contaminación. Y por otro lado, a que la capacidad de establecimiento, sobre todo en cultivares de *Malus*, ya se ha comprobado que varía notablemente en función del genotipo de la planta (Yepes et al. 1994).

En la etapa de multiplicación, dada la gran complejidad de combinaciones posibles entre auxinas y citoquininas, se utilizó la auxina AIB a una única concentración (0.1 mgL⁻¹) como la más indicada para actuar junto a las cuatro diferentes citoquininas seleccionadas estudiándose los efectos de las distintas concentraciones de cada una de ellas con o sin la presencia de auxina. La presencia de reguladores de crecimiento en un medio de cultivo, así como su combinación adecuada, es necesaria para la obtención de plántulas viables en el proceso de micropropagación. La inducción del desarrollo de brotes axilares in vitro capaces de incrementar el número de nuevos brotes se utiliza de manera extensiva para propagar árboles frutales (Drobránszki et al. 2000a). Además, si pensamos en el aspecto de conservación, el porcentaje de riesgo de mutación en clones

derivados de brotes axilares es mucho menor que el riesgo de mutación durante la organogénesis para formar brotes adventicios a partir del callo (Magyar-Tábori et al. 2010).

Las citoquininas añadidas al medio de cultivo cumplen un papel importante porque intervienen en funciones como es el desarrollo de brotes axilares, reduciendo la dominancia apical, e inducen la división celular en plantas in vitro (Howell et al. 2003). Una de las citoquininas más utilizada y efectiva para el desarrollo de brotes axilares, tanto en manzano (Boudabous et al. 2010) como en peral (Wang L et al. 2006), es BA. En el presente trabajo en el que se estudiaron los efectos de cuatro citoquininas, BA, Zea, 2iP y TDZ, a diferentes concentraciones, los resultados obtenidos con presencia de TDZ o con BA muestran que la tasa de multiplicación de los brotes, en todos los cultivares de manzano y peral, fue significativamente mayor que con otras citoquininas. Si analizamos el efecto de cada una de las citoquininas podemos comprobar que con la BA presente en el medio a la mayor concentración (1 mgL^{-1}) se obtuvo la mayor tasa de multiplicación para esa citoquinina en todos los cultivares estudiados, excepto en el caso del manzano 'Gravillán' en el que se obtuvo la mayor tasa en presencia de 0.5 mgL^{-1} de BA. Sin embargo, cuando crecieron en medios con la concentración más alta probada de BA (1 mgL^{-1}), la altura de los brotes siempre fue menor en todos los cultivares estudiados y las hojas fueron más pequeñas. En consonancia con estos resultados también se observó que concentraciones más bajas de BA (0.25 y 0.5 mgL^{-1}) indujeron menor desarrollo de brotes pero con una longitud más larga de los entrenudos en el resto de los cultivares estudiados. Este dato concuerda con los resultados obtenidos por Shibli et al. (1997) que mostraron que el aumento de la concentración de la citoquinina BA presente en el medio, causaba mayor proliferación de brotes de *Pyrus syrica* cultivados in vitro junto a una reducción de la longitud de los mismos.

Además del efecto de las citoquininas mostrado en la propagación, hay crecientes evidencias que sugieren que su combinación con una auxina puede mejorar las tasas de multiplicación (Caboni et al. 2002; Tang et al. 2008). De los estudios actuales consultados sabemos que se puede seleccionar una auxina apropiada para el cultivo in vitro de una especie vegetal, en este caso para manzano y peral, que pueda mejorar los resultados. De todas las auxinas probadas hasta ahora, el AIB ha sido y es la

auxina más usada para la multiplicación de diversos cultivares de perales in vitro, sobre todo si se utiliza a bajas concentraciones (Banno et al. 1989; Kadota & Niimi 2003; Palombi et al. 2007; Poudyal et al. 2008). Sin embargo, en el presente trabajo, cuando se realizó el análisis estadístico de los resultados obtenidos en la multiplicación de los brotes y se comparó entre los ocho cultivares de manzano y entre los dos de peral, se obtuvo un número relativamente mayor de brotes cuando se añadió al medio solamente la citoquinina BA en lugar de combinarla con AIB, excepto en los cultivares de manzano ‘Príncipe Grande’ y ‘Tres en Cunca’ lo que sugiere incidencia del genotipo en la respuesta. Resultados similares fueron mostrados por Mahna & Motallebi (2007) quienes obtuvieron mayor tasa de multiplicación in vitro con el manzano ‘Golden delicious’ en un medio mineral MS suplementado solamente con 1 mgL^{-1} de BA. En nuestro estudio, el reducido número de brotes axilares obtenidos, en algunos casos, en la fase de multiplicación, cuando se utilizaba un medio con una combinación de distintas concentraciones de BA junto al AIB se puede atribuir al posible efecto inhibitor de la auxina AIB en el proceso de multiplicación de brotes de algunos cultivares o bien a la respuesta del propio genotipo de los dichos cultivares. En relación con este hecho, Hartman et al. (2004) sugiere que las auxinas deberían estar completamente ausentes o ser utilizadas en muy pequeña concentración en el medio de multiplicación de brotes.

El papel de otras citoquininas, bien derivadas de la adenina o de la fenilurea, en relación a su eficacia en el desarrollo de brotes, está muy bien ilustrado en toda la bibliografía, de manera que el uso de Zea, 2iP y kinetina, en la multiplicación de brotes in vitro es menos frecuentes (Dalal et al. 2006; Moretti et al. 1992). En nuestro estudio, de las cuatro citoquininas analizadas (BA, Zea, 2iP y TDZ), los brotes de todos los cultivares establecidos que fueron cultivados en medios suplementados con Zeatina o con 2iP apenas mostraron desarrollo de brotes axilares con medias igual o cercanas a 1, lo que representa un comportamiento y un resultado, en número, parecido al medio control MS0 sin reguladores. Resultados similares se alcanzaron cuando se utilizó Zeatina en la multiplicación de brotes de *Pyrus syrica* (Shibli et al. 1997) donde se consiguió una escasa tasa de multiplicación. Otras citoquininas como TDZ y CPPU, derivadas de la fenilurea, se citan a veces en la bibliografía en los protocolos de desarrollo de brotes en cultivos de peral (Kadota & Niimi 2003) con resultados positivos en cuanto al número de brotes desarrollados. Por tanto, el éxito de un cultivo

se verá afectado por el tipo y concentración de la citoquinina aplicada (Magyar-Tábori et al. 2010) aunque la eficacia de cualquiera de estas citoquininas en el medio de multiplicación dependerá principalmente del genotipo del cultivar (Dobránszki et al. 2010). Como ya se dijo anteriormente, las citoquininas más utilizadas en la micropropagación y regeneración de los manzanos son BA y TDZ y su acción y efectividad han sido comparadas en varios estudios (Amiri & Elahinia 2011; Magyar-Tábori et al. 2010) encontrando que TDZ es una citoquinina más eficaz que BA para la regeneración de brotes en numerosos ensayos (Fasolo et al. 1989; Pawlicki & Welander 1994; Sarwar & Skirvin 1997). Se ha demostrado también que la presencia de TDZ en el medio de cultivo es adecuada para la micropropagación y regeneración de especies de plantas leñosas e incluso para genotipos recalcitrantes (Huetteman & Preece 1993) viendo, una vez más, que la concentración óptima de TDZ dependía en gran medida del genotipo. De los resultados obtenidos en la multiplicación de los cultivares de manzano ‘José Antonio’ y ‘Tres en Cunca’, así como los dos cultivares de peral ‘Barburiña’ y ‘Manteca Oscura’, se comprobó que fueron los medios con la mayor concentración de TDZ (1 mgL^{-1}) los tratamientos en los que más brotes se desarrollaron mientras que para los otros seis cultivares de manzano estudiados, las concentraciones más bajas de TDZ (0.25 y 0.5 mgL^{-1}) fueron más eficaces.

En los ensayos experimentales durante la fase de multiplicación, se constató la formación de callo en la zona basal de los explantos cultivados en los medios que contenían la citoquinina TDZ. A mayor concentración de TDZ (1 mgL^{-1}), se observó mayor formación de callo, variando su tamaño según la concentración presente en el medio y también según el cultivar, afectando al mismo tiempo al número y longitud de los brotes desarrollados que fueron, en general, numerosos, pero de pequeño tamaño.

Aunque algunos autores han mostrado resultados de obtención de brotes largos en otras especies de manzano (Hanke et al. 1991), lo cierto es que nosotros encontramos que la concentración de TDZ afectó a la longitud de los brotes en todos los cultivares, que fueron visiblemente más cortos, en todos los casos en los que los brotes se formaron en medios con la concentración más alta de 1 mgL^{-1} . Los datos obtenidos de brotes axilares formados en los tratamientos con TDZ mostraron que muy pocos fueron hiperhídricos y solo en algunos de los cultivares, pero sí se observaron, en todos ellos,

notables diferencias en la morfología de los brotes desarrollados: aparecen apiñados, muy próximos unos a otros con un aspecto más compacto, tallos y entrenudos cortos y hojas pequeñas con bordes ondulados, casi rizados.

En otro aspecto como es la aparición de hiperhidricidad en los cultivos, todavía hay mucha discrepancia acerca de los efectos que producen las citoquininas en el desarrollo de brotes ya que, como se ha dicho, dependen en gran medida del genotipo de la planta en estudio aunque relacionado con el tipo de citoquinina y su concentración. Así, los resultados obtenidos con *Pyrus pyrifolia* mostraron que la presencia de explantos con hiperhidricidad estaba influenciada por el tipo de citoquinina presente en el cultivo siendo los brotes más hiperhídricos cuando se utilizó TDZ en lugar de BA o cualquier otra citoquinina derivada de adenina viendo, además, que la concentración tuvo en ello poca influencia (Huetteman & Preece 1993).

También se observó que, en la multiplicación de manzano, *Malus pumila*, la presencia de TDZ tuvo un efecto mayor sobre la hiperhidricidad de los brotes (Pawlicki & Welander 1994) que otras citoquininas. Sin embargo, los resultados de nuestro estudio con los distintos tratamientos con TDZ o BA mostraron que el factor “concentración” ha sido más determinante en relación con la formación de brotes hiperhídricos que el hecho, ya comentado, de si la citoquinina derivaba de la fenilurea o de la adenina. Por otro lado, en los tratamientos con las otras citoquininas probadas (2iP y Zeatina), a la concentración más alta (1 mgL^{-1}), no se produjeron brotes hiperhídricos, excepto en cultivares de manzano, ‘Camoesa’, ‘Ollo Mouro’ y ‘Gravillán’ con una media de brotes hiperhídricos variable, de entre 0.02 y 0.96, en estos tres cultivares. Esto nos confirma que la elección del tipo de citoquinina y la concentración óptima seleccionada para la micropropagación de las plantas leñosas van a depender de los genotipos de las especies vegetales estudiadas (Kadota & Niimi 2003).

En relación al proceso de rizogénesis hay que señalar que uno de los principales factores que determinan la eficacia de este proceso, sobre todo en leñosas, es la acción de las auxinas. La mayoría de los estudios que involucran el enraizamiento in vitro del manzano y peral usan auxinas tales como AIB, AIA y ANA. El uso de la auxina sintética AIB ha demostrado desempeñar un papel importante en el enraizamiento de estos árboles (*Pyrus* y *Malus*), así como en otros frutales diferentes (Kalinina & Brown

2007). Algunos autores han mostrado en sus trabajos que la acción de AIB fue más eficaz que la acción de otras auxinas en el enraizamiento tanto para manzano (Amiri & Elahinia 2011; Boudabous et al. 2010), como en peral (Berardi et al. 1993, Bommineni et al. 2001; Shibli et al. 1997). Sin embargo, la concentración óptima de AIB para obtener el enraizamiento máximo difiere entre las especies y entre los distintos cultivares (Damiano et al. 2000; Xiao et al. 2014). En nuestro estudio se observó que la transferencia directa de los brotes del medio de multiplicación específico de cada cultivar, que siempre contenía una citoquinina y AIB 0.1 mgL^{-1} , a un medio de enraizamiento MS suprimiendo la citoquinina pero con la presencia de AIB 0.1 mgL^{-1} , aumentó significativamente la media del enraizamiento in vitro de los brotes en algunos de los cultivares, en comparación con los resultados obtenidos al pasarlos a un medio libre de auxina (MS0), con excepción de los valores alcanzados en el enraizamiento del cultivar de manzano ‘Ollo Mouro’ y del peral ‘Manteca Oscura’ que únicamente enraizaron en medio MS0. Hay que señalar que, en el caso contrario, el enraizamiento de los cultivares ‘Cacharela’ y ‘Príncipe Grande’ solo se produjo en un medio MS con la presencia de AIB 0.1 mgL^{-1} . Algunos autores apuntan que una posible razón del bajo porcentaje de enraizamiento obtenido en algunos cultivares de manzano se debe al poco número de subcultivos realizados antes de ponerlos a enraizar; los brotes no se rejuvenecen y por tanto son menos sensibles a la acción de la auxina, lo que hace que el porcentaje de enraizamiento varíe con la edad del cultivo (Modgil et al. 1999). En el caso del manzano cv ‘Jonathan’, Xiao et al. (2014) afirman que la capacidad de enraizamiento de este cultivar mejoró significativamente con el aumento del número de subcultivos al comportarse los brotes como más jóvenes; lo mismo que sucede en el caso de los perales en los que, después del séptimo subcultivo, se observaron explantos mejor adaptados y el porcentaje de enraizamiento aumentó gradualmente cuanto mayor fue el número de subcultivos (Banno et al. 1989). En nuestro estudio encontramos que la capacidad de enraizamiento de los brotes in vitro se vio influenciada también por otro factor que fue la concentración de citoquinina del medio de multiplicación de procedencia de cada cultivar en cuestión ya que el porcentaje de enraizamiento fue considerablemente más bajo en el caso de los cultivares de manzano ‘Repinaldo’ y ‘José Antonio’, cuando el medio de multiplicación del que provenían los brotes, de ambos

cultivares, contenía BA 0.5 mgL^{-1} frente a los brotes que crecieron en un medio con 0.25 mgL^{-1} de BA, en los que el porcentaje de enraizamiento fue mayor.

Aunque se obtuvieron mejores resultados de enraizamiento en todos los cultivares al transferir los brotes de su medio de multiplicación a medio MS conteniendo AIB 0.1 mgL^{-1} , este método no dio buen resultado cuando se aplicó a los brotes de los cultivares de manzano y peral libres de virus (datos no mostrados), posiblemente debido a la ausencia o al menos disminución de la población de gran parte de las bacterias endófitas, junto con los virus eliminados, y por ello se eligió para este material el método de inmersión basal (*dipping*) en una solución muy concentrada (1 y 2 gL^{-1}) de la auxina AIB, ya ensayado anteriormente con algunos cultivares, consiguiendo así, con el material saneado, tasas de enraizamiento más altas que con el método anterior. En nuestro estudio de enraizamiento por *dipping* se observó que, aunque en términos generales los brotes enraizaban mejor, hay que tener en cuenta que el rendimiento de enraizamiento también estuvo influenciado por la longitud del brote, (datos no mostrados) siendo mejor cuando estos eran más largos > 25 milímetros. Según lo descrito por Xu et al. (2008) en su estudio con brotes de *Malus zumi*, solo enraizaron el 15% cuando tenían entre 15-25 mm, mientras que el porcentaje fue mayor, del 70%, en el enraizamiento con brotes más largos de entre 35-50 mm de longitud. Una de las razones argumentadas por otros autores es que, probablemente, los brotes más desarrollados se encontrarían en una condición fisiológica mejor para la formación de raíces (Sánchez et al. 1996). De las dos concentraciones de AIB probadas en nuestro estudio para el enraizamiento de los brotes libres de virus, de todos los cultivares, se consideró que la concentración de 1 gL^{-1} dio mejor resultado al presentar las raíces, formadas siempre en la base del brote, un aspecto morfológico normal frente a los resultados de la inmersión basal en una solución doblemente concentrada de AIB 2 gL^{-1} que tendió a producir raíces más gruesas, cortas y fusionadas, con aspecto acorchado, algo deformes y con formación de callo en la base de los brotes, donde además podrían tener su origen las raíces formadas. Hay que señalar sin embargo que, a pesar del distinto aspecto, no hubo diferencia en cuanto al porcentaje de enraizamiento en la mayoría de los cultivares estudiados. Aunque en nuestro estudio con todos los cultivares de manzano AIB 1 gL^{-1} fue la concentración más eficaz para enraizar, algunos autores exponen que una concentración aún más alta de AIB, de 3 gL^{-1} fue la óptima para el

enraizamiento en *Malus xiaojinensis* (Xiao et al. 2014). También Banno et al. (1989) trabajando con cultivares de peral describieron que, en la rizogénesis de peras japonesas, altas concentraciones de AIB indujeron la formación de callo basal y raíces deformadas. El éxito del enraizamiento, tal como mencionamos, varía entre distintos cultivares dependiendo por tanto del genotipo.

En cualquier método de propagación in vitro el éxito de supervivencia de las plantas y de su adaptación a condiciones ambientales depende, ante todo, de obtener un alto porcentaje de enraizamiento de brotes y la formación de un buen sistema de raíces, antes de su paso a tierra. Si bien algunos de los cultivares de manzano y peral no dieron altas tasas de enraizamiento o bien formaron un número de raíces bajo, las plántulas conseguidas se transfirieron con éxito a tierra para su aclimatación en condiciones establecidas en el invernadero. Sin embargo, no todos los cultivares respondieron de la misma manera a la aclimatación, debido al distinto potencial de enraizamiento y al propio carácter de adaptabilidad de los distintos cultivares, tanto de manzano como de peral, señalando que en las plantas enraizadas libres de virus, como vimos más tarde, también debió influir en la supervivencia el tiempo de aclimatación transcurrido y a la ausencia de virus y de parte de su microbioma interno. En su estudio con el cv. 'Bartlett' de peral, Bommineni et al. (2001) exponen que el bajo porcentaje de aclimatación logrado con ese cultivar tal vez fuera debido a que la mayoría de las raíces fueron inducidas a partir de las células del callo formado en lugar de originarse directamente en las células del cambium o del parénquima de floema del brote. Por otro lado, Banno et al. (1989) también manifiestan que las plántulas de *Pyrus*, con más formación de callo basal, tendieron a morir en la etapa de aclimatación debido a la infección sobrevenida en esa zona por patógenos fúngicos. Se señala como una de las principales razones para la baja supervivencia de las nuevas plantas la falta de conexión vascular entre el brote y las raíces formadas (Yepes & Aldwinckle 1994). Hay que decir que en el enraizamiento con inmersión basal en AIB 1gL^{-1} , no formó callo basal y las raíces partían directamente de la base de los brotes tratados; sin embargo, con 2gL^{-1} de AIB sí se formó callo basal en la mayoría de los cultivares.

En nuestro estudio, dado que la tasa de enraizamiento in vitro fue baja en los dos cultivares de peral 'Barburiña' y 'Manteca Oscura' y en alguno de manzano como 'Tres

en Cunca', como consecuencia también se obtuvo un número limitado de plántulas en estos cultivares y se observó en ellos un bajo porcentaje de supervivencia al paso a tierra y aclimatación. Las pérdidas durante la aclimatación se debieron principalmente a que las plántulas producidas *in vitro* son muy susceptibles a la desecación y deben adaptarse a las nuevas condiciones ambientales del invernadero para afrontar las distintas condiciones externas de luz, humedad y temperatura y soportar el estrés del cambio. Además de estos factores señalados, el genotipo de los cultivares de manzano y peral estudiados, influyó fuertemente en el proceso de aclimatación a condiciones ambientales, siendo por tanto otro factor importante que limita el éxito de la micropropagación de estos árboles frutales. Habría que tener en cuenta también la época del año en la que se realiza el paso a tierra ya que se ha observado una mejor adaptación a condiciones ambientales y supervivencia de las plantas enraizadas, en aquellos cultivares que se pasaron a tierra en los meses de primavera.

Tener material vegetal sano como material de propagación en campo es una medida importante para evitar la pérdida de productividad de los árboles frutales debido a la infección por virus. Las pérdidas económicas por enfermedades víricas son considerables ya que como dijimos en la Introducción, la tasa de infección por ACLSV en manzanas comerciales puede ser entre el 80% y 100%, con pérdidas de rendimiento de entre el 30 y el 40% (Cembali et al. 2003). Estudios anteriores han demostrado que el uso de plantas libres de virus, produjo un incremento del vigor vegetativo, así como de la calidad de la fruta (Mannini et al. 1996). El virus de la mancha clorótica de la hoja del manzano (ACLSV) y el virus del mosaico del manzano (ApMV) son los principales responsables de enfermedades virales en los árboles de *Pyrus* y *Malus* (Lister 1970; Mink 1992), provocando retraso en el crecimiento y pérdida de productividad. La infección por ACLSV también está extendida en árboles frutales de hueso, causando enfermedades a las ciruelas (Gella & Errea 1998). Estos virus pueden ser transmitidos mecánicamente y diseminados por material de propagación infectado (Fulton 1972). Está comprobado que los virus son transmisibles por injerto y persisten en el material de propagación vegetativa de árboles infectados, siendo probablemente la principal fuente de inóculo. No existen vectores conocidos u otro modo de transmisión natural de estos virus (Ji et al. 2013; Wang LP et al. 2010). Por lo tanto, conseguir el cultivo de plantas

libres de virus tiene además la ventaja de evitar que otras plantas o árboles frutales sean contaminados.

Se sabe que los virus se dispersan en la planta por el xilema y floema y por esta razón se supone que los meristemos apicales de las yemas, sin conexión vascular, están libres de virus. Basándose en este hecho, el aislamiento y posterior cultivo in vitro de meristemos es un método ampliamente utilizado para la erradicación de virus de plantas hortícolas (Panattoni et al. 2013). Sin embargo, la eficacia de este laborioso método suele ser muy baja, ya que es difícil aislar y regenerar plantas a partir de meristemos muy pequeños (<0.20 mm) y que al mismo tiempo ese material tenga altas tasas de supervivencia (Papstein et al. 2008). De hecho, los meristemos de 0.20 mm constituyen el material idóneo sin virus ya que explantos mayores de 0.25 mm pueden contener algo de tejido vascular y presencia de virus. Por ello el tamaño del meristemo aislado es crítico en este proceso de saneamiento y erradicación de virus.

Por otro lado, la terapia de calor aplicada in vivo o in vitro puede reducir los títulos de virus en las plantas y mejorar la eficacia para la erradicación (Mink et al. 1998) aunque el éxito de la erradicación viral por termoterapia dependerá, en gran medida, del tipo de virus y de la especie vegetal (Cieślińska 2002), de la duración del tratamiento por calor y de la temperatura alcanzada. La terapia de calor aplicada a plantas virosadas, ha demostrado ser muy eficaz, debido a la sensibilidad de los virus a las temperaturas elevadas (Campbell 1968; Papstein et al. 2008; Verma et al. 2005) y a la inactivación de los virus que pudieran estar presentes en el meristemo apical (Grout 1990). La terapia de aplicación de calor ha sido utilizada para la eliminación de virus en árboles de manzano (Papstein et al. 2008) y de peral (Tan et al. 2010) e incluso en otros frutales de la familia de las rosáceas (Cieślińska 2007; Koubouris et al. 2007). Sin embargo, la variedad de tratamientos con altas temperaturas es muy grande ya que la sensibilidad de los virus a diferentes temperaturas puede variar y los tiempos de aplicación habrá que establecerlos para cada caso. Del equilibrio entre ambas variables va a depender, en gran medida, el éxito de esta técnica aplicada en la erradicación de virus. Estudios anteriores mostraron que existe una distribución desigual del virus ACLSV en plantas de *Pyrus pyrifolia* cv. 'Huanghua', ya que en plantas tratadas in vitro con termoterapia durante 50 días a 34°C/42°C, el título del virus en el meristemo

apical de las plantas tratadas disminuyó mucho más que en la base del tallo (Wang LP et al. 2010).

Hay que señalar que, aunque el éxito de la erradicación viral por termoterapia dependa en gran medida del tipo de virus y de la especie vegetal (Cieślińska 2002) así como de la interacción específica entre el patógeno y el genotipo en particular (Papstein et al. 2008), otro factor como es la duración del tratamiento con altas temperaturas está directamente asociada con una disminución de la presencia de virus en la planta. Si tenemos en cuenta el valor de las temperaturas junto a los tiempos de duración, la aplicación de temperaturas alternas noche/día de 32°C - 38°C durante 50 días produjo porcentajes bajos de plantas de peral sin virus, mientras que temperaturas más altas de 42°C día y 34°C noche mejoraron el porcentaje de plantas libres de virus (hasta el 100%), pero sólo si se aplicaban durante periodos de 60 días (Tan et al. 2010), demasiado largos para la supervivencia del material vegetal. En nuestro caso, en los que se alcanzó un 100% de erradicación de virus ApMV y casi el 100% de ACLSV en la mayoría de los cultivares, la duración de la termoterapia durante 18 días con subida gradual desde los 25°C hasta alcanzar una temperatura máxima de 40°C mantenida de forma constante durante tres días consecutivos, ha tenido un efecto tan positivo como aumentar la temperatura a los 42°C y aplicarlos durante 60 días.

Desde hace años se han desarrollado varios procedimientos combinando la termoterapia, que retarda la multiplicación de virus, con la técnica de aislamiento de meristemas apicales in vitro. Esta combinación ha demostrado ser eficiente (Manganaris et al. 2003; Zilka et al. 2002), aunque el porcentaje de recuperación de plantas viables libres de virus ha sido relativamente bajo. La termoterapia se realiza con más frecuencia a 36-38°C durante periodos de 21-35 días (Knapp et al. 1995). Sin embargo, mantener altas temperaturas durante largos períodos de tiempo vemos que tiene un efecto negativo sobre la supervivencia y el crecimiento de los meristemas, aunque sea más efectivo para lograr altas tasas de plantas libres de virus. Recientemente se ha tratado de obtener tasas más altas de plantas libres de virus de manzano (*Malus x domestica*) mediante organogénesis a partir de la formación de brotes adventicios, pero incluso con este método no han logrado erradicarlos (Wang MR et al. 2016).

En nuestro caso, el protocolo diseñado combinando la termoterapia gradual in vitro y el aislamiento de ápices meristemáticos ha sido muy eficaz en comparación con los métodos existentes. Así, la aplicación de la termoterapia en brotes que crecían in vitro, desde los 25°C iniciales hasta los 40°C, aumentando gradualmente 1°C cada día, duró en total solo 18 días y permitió a los brotes adaptarse a ese aumento gradual de temperatura, desde la temperatura establecida (24°C) de la cámara de crecimiento, sin producir demasiados daños ni estrés, facilitando el aislamiento de sus meristemas apicales y permitiendo que estos fueran de un tamaño tres veces mayor que 0.2 mm lo cual favoreció su supervivencia. Al mismo tiempo, la temperatura máxima de 40°C, mantenida durante tres días consecutivos, ralentizó o inactivó a los virus del material vegetal ya que los resultados obtenidos de las pruebas DAS-ELISA y RT-PCR utilizadas, mostraron que el método diseñado en nuestro laboratorio para este trabajo (Lizárraga et al. 2017) fue muy eficaz en la erradicación de los dos tipos de virus ACLSV y ApMV presentes en todos los cultivares de manzano y peral estudiados. Ya Gella & Errea (1998) señalan que el éxito del tratamiento térmico consiste en seleccionar la temperatura y la duración del tratamiento, no sólo para la eliminación del virus, sino también para la supervivencia de la planta. A medida que se aumenta la temperatura y se prolonga la duración del tratamiento para la eliminación de virus, las tasas de supervivencia de las plantas tratadas se reducen significativamente (Tan et al. 2010).

Para mejorar la eliminación de virus después de la termoterapia, el aislamiento de los meristemas debe ser de 0.2 mm, considerando que cuanto más pequeña sea la porción de tejido aislado, se puede corresponder con una menor concentración de virus, siendo este el punto crítico para lograr la erradicación de virus (Panattoni et al. 2013). En nuestro caso, después de la terapia de calor in vitro, el aislamiento de los ápices meristemáticos de mayor tamaño, entre 0.7-1.0 mm, fue muy efectivo en la erradicación mejorando al mismo tiempo los porcentajes de supervivencia de plantas libres de virus tanto en manzano como en peral (Lizárraga et al. 2017). En cultivares de manzano Plopa & Preda (2013) demostraron que la tasa de recuperación de brotes a partir de meristemas de 0.3 mm era del 40-50%, mientras que utilizando meristemas de 1 mm la recuperación de los brotes aumentó hasta un 80-95%. Por otro lado, en el cultivo de ápices de manzano de 0.5 mm que contenían 3-4 primordios de hojas Li et al. (2016)

informaron que no fue eficaz para la erradicación de virus, mientras que el cultivo de ápices más pequeños que contenían sólo dos primordios iniciales de hojas produjeron el 100% de brotes libre de virus. El cultivo in vitro de meristemas apicales (Manganaris et al. 2003) junto con la terapia por calor son herramientas valiosas muy importantes para la recuperación y erradicación de los principales virus, ApMV y ACLSV, presentes en casi todos los manzanos y perales (Papstein et al. 2008).

En nuestro estudio, la novedad ha sido utilizar la terapia de calor a brotes cultivados in vitro y ser aplicada de forma gradual con un incremento de la temperatura de 1°C por día comenzando desde la temperatura establecida para el crecimiento en la cámara. El proceso de termoterapia se aplicó solo durante 18 días, un periodo muy corto en comparación con los utilizados hasta ahora en la mayoría de trabajos; otro dato a tener en cuenta es que siempre se aplicó a brotes subcultivados in vitro dos semanas antes de comenzar la termoterapia, por lo tanto en el mejor momento de crecimiento activo, y fue seguido al terminar la terapia de calor por el aislamiento de los extremos apicales de las yemas <1 mm, que contienen los meristemas, obteniendo como resultado el 100% de plantas libres de ApMV en todos los cultivares de manzano y peral y, en la mayoría de los cultivares, el 100% de plantas libres del otro virus presente, ACLSV, por lo que el método expuesto resulta altamente eficaz siempre que se combinen adecuadamente varios factores: la edad del cultivo y estado del explanto a tratar, la temperatura de la terapia de calor y modo de aplicarla, el tiempo de duración y el tamaño del meristemo aislado. Hay que recordar que el establecimiento en cultivo in vitro de todos los cultivares motivo de este estudio, ya se hizo a partir de explantos muy pequeños <1.5 mm lo cual es una selección de la zona meristemática probablemente con menos presencia de virus lo que favorecería su erradicación posterior en los brotes obtenidos tras el tratamiento con termoterapia durante los 18 días y el aislamiento, esta vez de 0.7 mm, de los ápices meristemáticos.

Por tanto, y de acuerdo con otros autores (Hansen & Lane 1985; Knapp et al. 1995; Manganaris et al. 2003; Wang et al. 2006), la combinación de termoterapia seguida del cultivo de meristemas es un método eficaz para producir plantas libres de virus. Hay que tener presente de nuevo que el éxito final de terapia de calor, combinado con otros métodos, depende de varios factores incluyendo el tipo de virus, el método

utilizado y también, como siempre, el genotipo del material vegetal estudiado (Cieślińska 2002; Gella & Errea 1998).

Uno de los principales problemas dentro del cultivo *in vitro* es la contaminación microbiana, debido a que los microorganismos endofíticos que no son eliminados por la desinfección o esterilización del material inicial, pueden causar pérdidas graves en las plantas micropropagadas en cada una de las etapas de crecimiento (Cassells 1991, Leifert et al. 1991a). Además, el hecho de tener contaminación presente en el medio va contra la propia definición de cultivo *in vitro* y de lo que debe ser un cultivo aséptico. La mayoría de las bacterias presentes en el interior de las plantas no son necesariamente patógenas para las plantas en campo, sino que más bien establecen unas relaciones de simbiosis protegiéndolas de ataques externos de otros microorganismos, hongos y enfermedades, pero sí son perjudiciales para los explantos cultivados *in vitro*, porque compiten por los nutrientes del medio causándole visibles daños (Leifert et al. 1994). Las bacterias endófitas son difíciles de detectar y también de erradicar (George 1993; Leifert et al. 1994) ya que pueden estar localizadas en diferentes tejidos de la planta desplazándose por el xilema o floema (Deberegh & Zimmerman 1991). Los métodos de desinfección externa del material vegetal con agentes químicos, antes de su establecimiento *in vitro*, no eliminan las bacterias endófitas debido a que permanecen en los haces conductores, quedando así protegidas de estos agentes, propagándose continuamente junto con el material vegetal (George 1993). En nuestro estudio se detectó la presencia de distintos tipos de contaminación bacteriana endófitas, en la mayoría de los cultivares de manzano y peral, tanto en la etapa de establecimiento como posteriormente en el de multiplicación, lo que afectó visiblemente al crecimiento y desarrollo de los explantos. Algunos autores ya habían evidenciado hace más de dos décadas que los microorganismos contaminantes encontrados en la fase de establecimiento del explanto, que eran resistentes a la desinfección superficial, serían probablemente de carácter endófito (Reed et al. 1995). La presencia, variedad y cantidad de la comunidad endófitas o microbioma interno durante el establecimiento y propagación del material vegetal en cultivo *in vitro* va a depender del tipo de planta, de la edad, de su estado fisiológico y del origen del cultivo vegetal (Boine et al. 2008).

Hay que señalar que la identificación de estas bacterias nos proporciona información importante acerca de la fuente de contaminación, de si son simbióticas, de si provocan enfermedades, o si son de cuarentena, para poder combatir las o bien prevenir la contaminación (Leifert et al. 1991b) permitiéndonos así eliminar enfermedades de poblaciones de frutales en campo. En cultivos de frutales establecidos in vitro la detección de contaminantes bacterianos endófitos generalmente se ha realizado mediante inspección visual del propio medio de cultivo o bien en la zona de contacto de la base del brote o explanto con el medio, pero en algunos casos este método no es el adecuado para detectarlas; es el caso de bacterias de crecimiento lento, de las llamadas “no cultivables”, especialmente difíciles de cultivar en los medios bacteriológicos o de aquellas bacterias que no crecen en los medios de cultivos vegetales (Kane 1995). Tampoco serían detectados los fitoplasmas, pertenecientes al orden Firmicutes o algún otro tipo de microorganismo no cultivable. Hasta donde sabemos, apenas hay estudios del microbioma de las plantas, y menos de plantas in vitro (Orlikowska et al. 2017). En nuestro caso se observó la presencia de bacterias endófitas tanto en la fase de establecimiento como en la fase de multiplicación y fueron visibles en los ocho cultivares de manzano y en los dos de peral estudiados. Sin embargo, no todos los cultivares presentaban el mismo tipo de bacterias, identificables por el diferente color de las cepas y hábito de crecimiento, y en algunos se encontraron de forma visible algunas cepas bacterianas en forma de halo turbio, difíciles de cultivar, o no cultivables, tanto en el medio mineral de cultivo MS con una citoquinina, como en el medio bacteriológico TSC utilizado habitualmente para su cultivo. En cuanto a la cantidad de bacteria presente en los medios de cultivo varió según el cultivar, el número de repiques, e incluso la época del año, observando que no siempre aparecía visible la misma cantidad. Esta observación coincide con lo descrito por Quambusch et al. (2016) que indica que la concentración de bacterias endófitas en brotes de *Prunus avium* in vitro fue muy variable en el tiempo, así como entre plantas individuales, incluso en el marco de las condiciones presentes durante la propagación del cultivo in vitro.

Aún se sabe muy poco actualmente sobre los factores simbióticos en término de plantas debido a que diversos microorganismos, generalmente bacterias, y algún fitoplasma, son capaces de asociarse con las plantas como organismos endófitos (Mano & Morisaki 2008; Saito et al. 2007). Algunos autores han descrito que las

bacterias endófitas crecen rápidamente dentro de los tejidos de los explantos y en el propio medio de cultivo produciendo efectos negativos, como es reducir el crecimiento de los brotes y las tasas de enraizamiento de los mismos (Leifert & Cassells 2001). Sin embargo, Quambusch et al. (2014) mencionan que las poblaciones de bacterias endófitas, en brotes de *Prunus avium* in vitro, se correlacionan con el éxito de la propagación in vitro y podrían mejorar la supervivencia y el crecimiento de las plantas durante las fases críticas del cultivo de tejido vegetal. Tenemos que resaltar que las plantas libres de virus de algunos de nuestros cultivares de manzano, en su periodo de aclimatación a condiciones de invernadero, fueron susceptibles al ataque por hongos como el oídio lo que puede estar relacionado con la ausencia de virus y parte del microbioma interno de dichas plantas. El papel más importante de las bacterias beneficiosas en las plantas micropropagadas es probablemente durante la aclimatación, cuando el crecimiento se reanuda en condiciones ambientales.

La presencia de bacterias endófitas promueve incluso el crecimiento y desarrollo in vitro en algunas familias de plantas, como las orquídeas, y podría estar relacionada su presencia en el cultivo con un efecto directo sobre la biomasa en las plántulas (Wang X et al. 2016). Otros autores como Kamoun et al. (1998) señalaron que las bacterias endófitas asociadas a brotes de *Prunus cerasus* cultivados in vitro, podían persistir en forma latente no visible durante todo el proceso de la micropropagación de estas plantas. Nosotros pudimos observar que no hubo crecimiento bacteriano visible en los medios de cultivo ni en la base de las plantas que resultaron libres de virus, derivadas del cultivo de los ápices meristemáticos aislados después del tratamiento con termoterapia. Este hecho nos hace suponer que, al aislar los meristemas, aparte de erradicar los virus ApMV y ACLSV, también se han logrado eliminar las bacterias endófitas o bien parte del microbioma presente en el interior de los brotes, estando con una densidad de población celular tan baja (sin *quórum sensing*) que permanecerían latentes en el interior de los brotes y no presentarían crecimiento externo. Para asegurarlo se necesitaría hacer un seguimiento a lo largo del tiempo de estas plantas logradas e iniciar nuevos cultivos ya que podrían estar latentes, quedar solo aquellas bacterias y/o fitoplasmas no cultivables o bien que queden en tan pequeña cantidad que no lleguen a manifestarse.

Se sabe muy poco de la interacción del microbioma con las plantas y su papel en la regulación del metabolismo. Hemos observado que las plantas libres de virus, en las que no se detecta externamente presencia de bacterias, presentan tasas más bajas de enraizamiento que las que tienen bacterias, se adaptan peor a las condiciones externas y sobreviven menos. Otro punto a tener en cuenta es que la presencia o ausencia de bacterias endófitas pueden confundirnos a la hora de dar resultados de estabilidad genética de plantas derivadas de cultivo in vitro. En su estudio Moreno-Vázquez et al. (2014) sugieren que hay que detectar las bacterias contaminantes en plantas in vitro antes de realizar estudios somaclonales o de estabilidad genética en los que las bacterias endófitas puedan confundir los resultados, incluso en ausencia de síntomas visibles de contaminación bacteriana. Los métodos de detección de bacterias endófitas, existentes en una determinada especie o variedad de planta, es un paso importante para comprender las respuestas de las plantas dentro del cultivo in vitro.

Por otro lado, la identificación previa de las cepas bacterianas existentes en una planta facilita la selección de los antibióticos indicados para su control y/o prevención (Birmeta et al. 2004). Así, para caracterizar bacterias es importante hacerlo a través de cultivos puros aislados de las plantas in vitro y la fiabilidad del sistema dependerá del número y de la diversidad de bacterias incluidas en las bases de datos que se consulten (Reed & Tanprasert 1995). En nuestro caso la identificación de las cepas bacterianas aisladas y purificadas de cada cultivar, mediante análisis de secuenciación del gen ARNr 16S, dio como resultado la presencia de diferentes poblaciones bacterianas encontradas en los distintos cultivares de manzano establecidos y cultivados in vitro. Sin embargo, de todas las secuencias analizadas a partir del ARNr 16S de las cepas halladas en los cultivos de los diferente cultivares de manzano, una vez cultivadas y purificadas, fueron las cepas bacterianas Gram-positiva *Curtobacterium flaccumfaciens* encontradas en los cultivares de manzano 'Tres en Cunca' y 'Repinaldo' y la bacteria Gram-negativa *Methylobacterium pseudoasícola* presente en el manzano 'Príncipe Grande' las que se obtuvieron con un porcentaje mayor de identificación, de más del 99%, en ambas cepas. Se sabe que la presencia en campo de *Curtobacterium* es muy amplia afectando a numerosas especies de familias como las leguminosas, muy lejanas a los manzanos y perales; así algunos autores han mostrado que la marchitez total de *Phaseolus vulgaris* está causada por la bacteria *Curtobacterium flaccumfaciens*,

produciendo hasta un 50% de plantas infectadas en campo (González et al. 2005; Osdaghi et al. 2015) siendo considerada una bacteria de cuarentena para diversos cultivos (EPPO 1994). Hasta ahora no conocemos referencias de su presencia en plantas de manzano, peral y no nos consta que se haya detectado en plantas in vitro de estos dos géneros.

Una vez aisladas, purificadas e identificadas las bacteria endófitas presentes en los cultivos, se estableció el antibiograma como prueba de susceptibilidad de los contaminantes, en este caso de cepas de bacterias endófitas, frente a los productos antimicrobianos, lo que nos permitió determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los distintos antibióticos, para las diferentes cepas bacterianas encontradas antes de poder aplicarlos en el medio de cultivo o directamente en los explantos, y así desarrollar un tratamiento eficaz para obtener resultados más favorables en futuros trabajos de investigación con estos cultivares de manzano y peral. De todos los agentes antimicrobianos probados en nuestro estudio (aminoglucósidos, betalactámicos y tetraciclinas), fueron los antibióticos pertenecientes al grupo de las cefalosporinas (betalactámicos), los que tuvieron un mayor espectro de acción frente a la mayoría de cepas bacterianas identificadas, siendo casi todas sensibles a este grupo de antibióticos.

Una comprensión más profunda de las comunidades microbianas asociadas a las plantas ofrece oportunidades para controlar el crecimiento de los cultivos agrícolas sostenibles (Kawaguchi & Minamisawa 2010). Al mismo tiempo las bacterias diazotróficas endófitas podrían ser utilizadas con éxito para promover el crecimiento de las plantas e inducir resistencia fúngica en plantas (Ji SH et al. 2014). Aunque estas redes de señalización celular que determinan las simbiosis se superponen en las leguminosas, aún queda por investigar si la interacción de las bacterias asociadas a estos cultivares de manzano y peral son de naturaleza mutualista y si la planta se beneficia o no de la colonización bacteriana. Con los datos obtenidos de los resultados podemos ver que aparecen bacterias que no son las habituales de los frutales como peral y manzano sino que son propias de leguminosas, como el caso de *Curtobacterium flaccumfaciens*, una bacteria Gram-positiva del orden Firmicutes, descrita por primera vez por Hedges en 1922 en campos de guisantes y causante de la marchitez de la judía y de otras leguminosas. El resultado del análisis de secuenciación del gen ARNr 16S, es que

aparece en el interior de algunos cultivares de manzano, lo cual nos muestra que ha habido una infección o paso de las bacterias de su planta hospedadora habitual a otro tipo de plantas, hecho muy interesante que abre un nuevo campo de investigación.

Lo mismo ocurre con *Methylobacterium pseudoasícola* encontrado en el cultivar de manzano ‘Príncipe Grande’ con un porcentaje de identificación de su ARNr 16S del 99.32% y que fue aislado de dos orígenes diferentes: hojas y tallos. Algunos autores han demostrado que las bacterias del género *Methylobacterium*, del phylum Proteobacteria, son endófitos comunes en plantas (Andreote et al. 2009, Schauer & Kutschera 2008), ampliamente distribuidos en la naturaleza y son particularmente conocidos por su estrecha asociación con las plantas (Lisdrom et al. 2002). Sin embargo, esta asociación puede beneficiar o no a la planta huésped. En este sentido Madhaiyan & Poonguzhali (2014) demostraron que esta cepa bacteriana tiene capacidad para promover el crecimiento y desarrollo de las plantas mediante la producción de fitohormonas. Así como estas bacterias se benefician del metanol producido por las plantas (Schmidt et al. 2010), catalogándose como bacterias “metilotróficas facultativas rosa-pigmentadas” (siglas en inglés PPFMs), también este tipo de bacterias pueden proporcionar mecanismos indirectos como la eliminación de fitopatógenos a través de biocontrol o inducción de enzimas para la defensa de la planta (Katiyar & Goel 2004; Lee et al. 2005).

En nuestro estudio se observó mayor población de *Methylobacterium* en el establecimiento de ‘Príncipe Grande’ dificultando la supervivencia de los explantos en esta fase. Sin embargo, en la fase de multiplicación de este cultivar se observó en los medios de cultivo menor población bacteriana, sobre todo a la cuarta semana de cada subcultivo, cuando ya se tenía que volver a subcultivar. Esto concuerda con el trabajo de Madhaiyan et al. (2007) en cultivo de arroz en campo, en el que demostraron que la población endófito de la bacteria *Methylobacterium* aumentó o disminuyó según la etapa de crecimiento de la planta.

Con este resultado encontrado en el cultivar de manzano ‘Príncipe Grande’ se describe por primera vez la presencia de *Methylobacterium pseudoasícola* o bacterias metilotróficas en cultivos in vitro de cultivares de *Malus* localizadas tanto en la fase de establecimiento como en la de multiplicación. Sin embargo, la relación entre este

cultivar con la bacteria es todavía un campo desconocido, así como el origen de esta asociación.

Por otro lado, se ha descubierto la presencia de bacterias de hábitat humano como *Dermaococcus nishinomiyaensis* con un porcentaje de identificación de su ARNr 16S de más del 98% y fue cultivada a partir de brotes in vitro del manzano ‘Camoesa’. Hay que pensar que en estos casos podría deberse a una contaminación externa reciente de origen humano, pero hay datos que indican que es posible que bacterias presentes en los humanos, a veces patógenos, puedan colonizar otros hábitats y asociarse con plantas (Barak & Liang 2008; Barak & Schroeder 2012) representando un riesgo para la salud humana. El conocimiento de toda la diversidad de microorganismos que conviven con una planta determinada, nos proporcionaría una información muy valiosa. Actualmente, la herramienta de la metagenómica nos abre una vía importante para el conocimiento de la presencia de todo el microbioma existente y que nos conduciría a conocer las interrelaciones entre las plantas y todo el conjunto de bacterias, simbióticas, saprófitas o patógenas, que conviven en su interior.

Las bacterias y las plantas están unidas en varias relaciones simbióticas que se han desarrollados durante milenios y han influido en la evolución de ambos grupos, las bacterias habitan las superficies de la mayoría de las plantas y también están presentes dentro de muchos órganos. Estas bacterias pueden mejorar la nutrición de las plantas o aumentar la resistencia al estrés biótico o abiótico (Lodewyckx et al. 2002)

El análisis de metagenómica realizado de todo el micobioma interno existente en cada uno de los cultivares de manzano y peral estudiados nos ha permitido conocer cuáles son las poblaciones de bacterias más abundantes, en cada uno de ellos, consideradas como bacterias endófitas predominantes que, en la mayoría de los cultivares, no es coincidente. En general, la mayoría de las bacterias endófitas pertenecen principalmente a 4 phylum pero abarcan muchos géneros y especies (Hardoim et al. 2015). El análisis de metagenómica también pone de manifiesto la presencia de otras muchas bacterias que no proliferan en los medios de cultivo y que suelen estar latentes.

Se sabe que los endófitos pueden afectar los procesos fisiológicos de la planta, en una medida no muy diferente a la acción del propio genotipo (Sessitsch et al. 2012), como una fuente de metabolitos, similares o diferentes, a los producidos por las plantas (Brader et al. 2014, Ludwig-Müller 2015). Por lo tanto, en cualquier examen de las características funcionales de una planta es obligatorio tener en cuenta no solo los rasgos que resultan del propio genotipo, sino también los de los genotipos de microorganismos endofíticos que la habitan (Friesen et al. 2011). Se sabe que algunos endófitos son muy específicos para el genotipo huésped pero otros tienen una gama más amplia de huéspedes potenciales (Hardoim et al. 2011). En nuestro estudio del microbioma de todos los cultivares, se mostró que en los manzanos ‘Cacharela’, ‘Camoesa’, ‘Repinaldo’ y ‘Gravillán’, se identificaron géneros específicos de bacterias para cada uno de ellos. Así, la bacteria *Paenibacillus validus*, fue encontrada únicamente en el cultivar ‘Gravillán’. En este sentido algunos autores como Hildebrandt et al. (2005) afirman que bacterias específicas como *Paenibacillus validus*, promueven las interacciones entre hongos micorrízicos arbusculares (AMF) y las plantas, actuando como un tercer socio en esta simbiosis. Este suceso nos hace pensar que estos endófitos específicos encontrados en estos manzanos, deben jugar un papel aún más importante en la supervivencia de la plantas en cada cultivar que el resto de bacterias endofíticas comunes en todos los cultivares de manzano y peral como son los géneros *Burkholderia*, *Luteibacter*, *Methylobacterium*, *Curtobacterium*, *Rudaeicoccus*, *Sphingomonas* y *Dermacoccus*. Otro aspecto importante es la localización de estas bacterias endofíticas dentro de la planta. En nuestro estudio histológico de muestras de brotes de manzano in vitro se ha observado que algunas de las bacterias detectadas mediante la tinción específica Tionina-Orange G, son intracelulares y viven en células adyacentes a los tejidos vasculares como el xilema. Algunos autores (Thomas & Shekar 2014) demostraron que existe una gran colonización intracelular por bacterias endofíticas en bananos, siendo estas mayoritariamente no cultivables. Al mismo tiempo señalan que existe una variación en la distribución y tipo de bacteria en diferentes genotipos de banano así como en distintas células y tejidos dentro de la planta. Kokismäki et al (2015), demostraron en su estudio que la bacteria endofítica *Methylobacterium extorquens*, actúa como un simbionte intracelular en células meristemáticas de brotes de pino silvestre. También Compant et al. (2005) en su estudio señalaron que

Burkholderia sp. coloniza los espacios intercelulares e intracelulares de las células corticales, endodermis y los vasos del xilema en las raíces, tallos y hojas de plántulas de *Vitis vinífera* llegando a colonizar toda la planta.

Por tanto, cada una de las bacterias identificadas mediante el análisis de metagenómica en cada uno de los cultivares de manzano y peral, cultivados in vitro, seleccionados en nuestro estudio, deberían ser motivo de investigaciones futuras para llegar a conocer tanto el papel que desempeñan en las plantas así como para mejorar nuestra comprensión de la forma en que estas bacterias endófitas penetran y colonizan a estas plantas.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

I. Se consiguió el establecimiento in vitro de los cultivares tradicionales de Galicia seleccionados, ocho de manzano ('Camoesa', 'Cacharela', 'Repinaldo', 'Gravillán', 'José Antonio', 'Príncipe Grande', 'Ollo Mouro' y 'Tres en Cunca') y dos de peral ('Barburiña' y 'Manteca Oscura'), en medio MS BA 1 mgL⁻¹ GA3 0.2 mgL⁻¹ y AIB 0.3 mgL⁻¹.

II. En la etapa de multiplicación, de las cuatro citoquininas probadas (6-Benciladenina, Zeatina, 2- isopentiladenina, y Thidiazurón), presentes en los medios de cultivo, con o sin AIB 0.1 mgL⁻¹, se comprobó que Thidiazurón y 6-Benciladenina han mostrado ser las citoquininas más eficaces en la multiplicación de todos los cultivares, variando la concentración óptima según el genotipo. Se descarta en todos ellos el uso de Zeatina y 2iP a cualquiera de las concentraciones probadas, por su baja eficacia, y también el uso de Thidiazurón por provocar malformaciones en hojas y tallos en todos los cultivares, aunque con las tres concentraciones de TDZ, se consiguieran tasas más altas de multiplicación. Se considera BA, a concentraciones de 0.25, 0.5 y 1.0 mgL⁻¹, como la citoquinina más eficaz para la multiplicación de todos los cultivares.

III. Se ha conseguido el principal objetivo de erradicar los virus de los cultivares de manzano y peral seleccionados para este estudio, estableciendo un protocolo eficaz de termoterapia aplicada a brotes de manzano y peral cultivados in vitro para erradicar los virus ApMV y ACLSV. La aplicación gradual de temperatura, desde 25°C hasta 40°C, a brotes cultivados in vitro, en los medios de multiplicación específicos para cada cultivar, incrementando 1°C por día y permaneciendo a 40°C durante tres días consecutivos, ha logrado acortar el periodo de termoterapia a tan solo 18 días e incrementar la tasa de supervivencia y la efectividad del método.

Se consiguió erradicar el 100% de ApMV y entre el 57 y 100% para ACLSV en todos los cultivares, salvo en el cultivar de manzano 'Tres en Cunca' en el que, al disponer de una muestra muy pequeña, no se llegó a erradicar este último virus. Unido al método

descrito de termoterapia, también se consiguió una mayor tasa de supervivencia aislando los ápices meristemáticos de mayor tamaño, entre 0.7 y 1.0 mm, en vez de los meristemas apicales que son de tamaño cinco veces menor, facilitando así la técnica de aislamiento y sin restar eficacia a la erradicación de los virus.

IV. Para el enraizamiento de todos los cultivares libres de virus los mejores resultados se consiguieron con el método de inmersión basal de brotes in vitro, durante 45 segundos, en una solución acuosa concentrada de la auxina AIB 1 gL^{-1} , pasados a MS0, logrando un máximo de un 93% de enraizamiento con el cultivar ‘Gravillán’. Con las plantas obtenidas con este tratamiento de inmersión basal en 1 gL^{-1} AIB, se ha conseguido también los mejores porcentajes de aclimatación a condiciones ambiente en la mayoría de los cultivares.

V. Se ha logrado aislar y cultivar las cepas bacterianas de los géneros *Curtobacterium*, *Methylobacterium*, *Luteibacter* y *Dermacoccus* asociadas a los distintos cultivares de manzano (‘Tres en Cunca’, ‘Repinaldo’, ‘Príncipe Grande’, ‘Camoesa’ y ‘Cacharela’) establecidos in vitro. Al mismo tiempo se ha conseguido establecer un rango de susceptibilidad de dichas cepas bacterianas a tres distintos grupos de antibióticos: Aminoglucósidos, Betalactámicos y Tetraciclina, concluyendo que la Tetraciclina y las Cefalosporinas (grupo betalactámico) son los más eficaces frente a todas las cepas bacterianas cultivables encontradas. Este dato es de utilidad para que en futuros trabajos se pueda controlar el crecimiento bacteriano endófito que dificulta, sobre todo, el establecimiento y multiplicación in vitro de estos y de otros cultivares de manzano y en general de cualquier cultivo en el que estén presentes estas bacterias.

VI. Y finalmente, se ha conseguido conocer por vez primera la diversidad de bacterias endófitas componentes del microbioma interno de cada uno de los cultivares de manzano y peral estudiados en este trabajo, siendo los cultivares de peral ‘Barburiña’ y ‘Manteca Oscura’ junto al de los manzanos ‘Tres en Cunca’, ‘Ollo Mouro’ y ‘José

Antonio' los que menos diversidad bacteriana presentan, mientras que, de los otros cultivares, han sido 'Gravillán' y 'Camoesa' los que tienen una mayor diversidad en su microbioma.

Se ha encontrado que las Proteobacterias con un 72.71%, seguido de Firmicutes con un 12.48% y Actinobacterias con un 7.42% son los tres phylum más abundantes y que seis géneros de bacterias están presente en todos los cultivares de manzano y peral aunque los porcentajes de presencia son variables en cada cultivar. Las seis especies comunes son *Burkholderia andropoginis*, *Luteibacter rhizovicinus*, *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Methylobacterium pseudoasícola*, *Rudaeicoccus suwonensis* y *Sphingomonas echinoides*, llegando a ser cada una de ellas predominante en algunos de los cultivares, frente al resto de bacterias presentes de cada microbioma.

Como una reflexión final a estas conclusiones queremos resaltar que el conocimiento del microbioma interno en estos cultivares nos abre nuevas vías de investigación para comprender mejor la relación que existe entre el huésped y los distintos microorganismos, y el papel que desempeñan estos en la vida de la planta. La presencia de bacterias endófitas en los cultivos in vitro juegan un papel que hasta ahora no ha sido suficientemente estudiado.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFIA

- Ábreu-Tarazi MF, Navarrete AA, Andreote FD, Almeida CV, Tsai SM, Almeida M (2010) Endophytic bacteria in long-term in vitro cultivated “axenic” pineapple microplants revealed by PCR-DGGE. *World Journal Microbiology Biotechnology* **26**: 555-560
- Almeida CV, Andreote FD, Yara R, Tanaka FAO, Azevedo JL, Almeida M (2009) Bacteriosomes in axenic plants: endophytes as stable endosymbionts. *World Journal Microbiology Biotechnology* **25**: 1757-1764
- Amiri EM, Elahinia A (2011) Optimization of medium composition for apple rootstocks. *African Journal of Biotechnology* **10**: 3594-3601
- Andreote FD, Carneiro RT, Salles JF, Marcon J, Labate CA, Azevedo JL, Araújo WL (2009) Culture-independent assessment of Rhizobiales-related alphaproteobacteria and the diversity of *Methylobacterium* in the rhizosphere and rhizoplane of transgenic eucalyptus. *Microbial Ecology* **57**: 82-93
- Andreu P, Marín JA (2005) In vitro culture establishment and multiplication of the *Prunus* rootstock ‘Adesoto 101’ (*P. Insititia* L.) as affected by the type of propagation of the donor plant and the culture medium composition. *Scientia Horticulturae* **106**: 258-267
- Arce C, Real E (2001) Introducción al análisis estadístico con SPSS para Windows. PPU, Barcelona
- Banno K, Yoshida K, Hayashi S, Tanabe K (1989) In vitro propagation of Japanese pear cultivars. *Journal Japanese Society Horticultural Science* **58**: 37-42
- Barak JD, Liang AS (2008) Role of soil, crop debris, and a plant pathogen in *Salmonella enterica* contamination of tomato plants. *PLoS One* **3**(2) e1657
- Barak JD, Schroeder BK (2012) Interrelationships of food safety and plant pathology: the life cycle of human pathogens on plants. *Annual review of phytopathology* **50**: 241-266

- Bassil N, Hummer KE, Postman JD, Fazio G, Baldo A, Armas I, Williams R (2009). Nomenclature and genetic relationships of apples and pears from Terceira Island. *Genetic Resources and Crop Evolution* **56**: 339-352
- Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *American Journal Clinical Pathology* **45**: 493-496
- Berardi G, Infante R, Neri D (1993) Micropropagation of *Pyrus calleryana* Dcn. from seedlings. *Scientia Horticulturae* **53**: 157-165
- Berg G, Eberl L, Hartmann A (2005) The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environmental Microbiology* **7**: 1673-1685
- Birmeta G, Passoth V, Roos S, Welander M (2004) Identification of bacteria and yeasts from in vitro and surface-sterilized field samples of *Ensete ventricosum* by rDNA analysis. *Biotechnology Letters* **26**: 1867-1872
- Boine B, Naujoks G, Stauber T (2008) Investigations on influencing plant-associated bacteria in tissue cultures of black locust (*Robinia pseudoacacia* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **94**: 219-223
- Bommineni VR, Mathews H, Samuel SB, Kramer M, Wagner DR (2001) A new method for rapid in vitro propagation of apple and pear. *American Society for Horticultural Science* **36**: 1102-1106
- Boudabous M, Mars M, Marzougui N, Ferchichi A (2010) Micropropagation of apple (*Malus domestica* L. cultivar 'Douce de Djerba') through *in vitro* culture of axillary buds. *Acta Botanica Gallica* **157**: 513-524
- Brader G, Compant S, Mitter B, Trognitz F, Sessitsch A (2014) Metabolic potential of endophytic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* **27**: 30-37
- Bradford FC, Joley L (1933) Infectious variegation in the apple. *Journal of Agricultural Research* **46**: 901-908

- Caboni E, D'Angeli S, Chiappetta A, Innocenti AM, Van Onckelen H, Damiano C (2002) Adventitious shoot regeneration from vegetative shoot apices in pear and putative role of cytokinin accumulation in the morphogenetic process. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **70**: 199-206
- Campbell, AI (1968) Heat Sensitivity of Some Apple Viruses. Tagungsber DAL DDR, Berlin **97**: 311-316
- Campbell R (1985) Plant microbiology. Edward Arnold Ltd.
- Capdevila Argüelles L, Iglesias Garcia A, Orueta JF, Zilleti B (2006) Especies exóticas invasoras: Diagnóstico y bases para la prevención y el manejo. Ed. Organismo Autónomo Parques Nacionales, Ministerio de Medio Ambiente, Madrid
- Cassells AC (1988) Bacterial and bacteria-like contaminants of plant tissue cultures. *International Society for Horticultural Science* Cork, Ireland
- Cassells AC (1991) Problems in tissue culture: Culture contamination. In: Micropropagation. Springer, Netherlands
- Cembali T, Folwell RJ, Wandschneider P, Eastwell KC, Howell WE (2003) Economic implications of a virus prevention program in deciduous tree fruits in the US. *Crop Protection* **22**: 1149-1156
- Chakrabarty D, Hahn EJ, Yoon YJ, Paek KY (2003) Micropropagation of apple rootstock M.9 EMLA using bioreactor. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **78**: 605-609
- Cieślińska M (2002) Elimination of Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV) from pear by in vitro thermotherapy and chemotherapy. *International Society for Horticultural Science* **596**: 481-484
- Cieślińska M (2007) Application of thermo-and chemotherapy in vitro for eliminating some viruses. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* **15**: 117-124

- Clark MF, Adams AN (1977) Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* **34**: 475-483
- Compant S, Reiter B, Sessitsch A, Nowak J, Clément C, Bark EA (2005) Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 1685-1693
- Compant S, Kaplan H, Sessitsch A, Nowak J, Ait Barka E, Clement C (2008) Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN: from the rhizosphere to inflorescence tissues. *FEMS Microbial Ecology* **63**: 84-93
- Conejero A, Romero C, Cunill M, Mestre MA, Martínez-Calvo J, Badenes ML, Llácer G (2013) In vitro shoot-tip grafting for safe *Prunus* budwood exchange. *Scientia Horticulturae* **150**: 365-370
- Dalal MA, Das B, Sharma AK, Mir MA, Sounduri AS (2006) In vitro cloning of apple (*Malus domestica* Borkh) employing forced shoot tip cultures of M9 rootstock. *Indian Journal of Biotechnology* **5**: 543-550
- Damiano C, Frattarelli A, Giorgioni M (2000) Micropropagation of temperate fruit trees through temporary immersion technique: the case of pear. In *VIII International Symposium on Pear* (pp120-121) Ferrara-Bologna, Italy
- Deberegh PC, Zimmerman RH (1991) *Micropropagation Technology and Application* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London
- Deberegh PC, Zimmerman RH (2002) *Micropropagation Technology and Application* Kluwer Academic Publishers Boston, USA
- Días ACF, Costa FEC, Andreote FD, Lacava PT, Teixeira MA, Assumpção LC, Araujo WL, Azevedo JL, Melo IS (2009) Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. *World Journal Microbiology Biotechnology* **25**: 189-195

- Dinsdale EA, Edwards RA, Hall D, Angly F, Breitbart M, Brulc JM, Furlan M, Desnues C, Haynes M, Li L, McDaniel L, Moran MA, Nelson KE, Nilsson C, Olson R, Paul J, Brito BR, Ruan Y, Swan BK, Stevens R, Valentine DL, Thurber RV, Wegley L, White BA, Rohwer F (2008) Functional metagenomic profiling of nine biomes. *Nature* **452**: 629-632
- Donnarumma F, Capuana M, Vettori C, Petrini G, Giannini R, Indorato C, Mastromei G (2011) Isolation and characterisation of bacterial colonies from seeds and in vitro cultures of *Fraxinus* spp. from Italian sites. *Plant Biology* **13**: 169-176
- Drobránszki J, Abdul-Kader A, Magyar-Tábori K, Jámbor-Benczúr E, Bubán T, Szalai J, Lazányi J (2000a) In vitro shoot multiplication of apple: comparative response of three rootstocks to cytokinins and auxin. *International Journal of Horticultural Science* **6**: 36-39
- Drobránszki J, Abdul-Kader A, Magyar-Tábori K, Jámbor-Benczúr E, Bubán T, Szalai J, Lazányi J (2000b) Single and dual effects of different cytokinins on shoot multiplication of different apple scions. *International Journal of Horticultural Science* **6**: 76-78
- Drobránszki J, Teixeira da Silva JA (2010) Micropropagation of apple-a review. *Biotechnology Advances* **28**: 462-488
- EPPO (1994) PM 3/55 phytosanitary procedure *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* field inspection and seed-testing method. Bulletin EPPO Bulletin **24**: 329-331
- EPPO (1999) EPPO Standards PM 4/27(1) Certification Schemes *Malus*, *Pyrus* and *Cydonia* European Plant Organization, Paris
- EPPO (2014) PQR database. Paris, France: European and Mediterranean Plant Protection Organization. <http://www.eppo.int/DATABASES/pqr/pqr.htm>
- Erig AC, Fortes GR (2002) In vitro establishment of pear (*Pyrus* spp.) starting from meristems and buds. *Ciencia Rural* **32**: 577-582

- Espinosa AC, Pijut PM, Michler CH (2006) Adventitious shoot regeneration and rooting of *Prunus serotina* in vitro cultures. *American Society for Horticultural Science* **41**: 193-201
- FAO (2009) FAOSTAT-Agriculture <http://faostat.fao.org>
- FAO (2013) Fuente: <http://faostat.fao.org>
- Fasolo F, Zimmerman RH, Fordham I (1989) Adventitious shoot formation on excised leaves of in vitro grown shoots of apple cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **16**: 75-87
- Fisher PJ, Petrini O, Lappin, SHM (1992) The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L.). *New Phytologist* **122**: 299-305
- Forsline PL, Aldwinckle HS, Dickson EE, Luby JJ, Hokanson SC (2003) Collection, maintenance, characterization, and utilization of wild apples of Central Asia. *Horticultural Reviews Westport Then New York* **29**: 1-62
- Foster, GD, Taylor SC (1998) Plant Virology Protocols. Methods in Molecular Biology, Humana Press, Totowa, USA
- Friesen ML, Porter SS, Stark SC, von Wettberg EJ, Sachs JL, Martinez-Romero E (2011) Microbially mediated plant functional traits. *Annual review of ecology, evolution, and systematics* **42**: 23-46
- Fulton RW (1972) Apple mosaic virus. Commonwealth Mycological Institute Association of Applied Biologists. Descriptions of plant viruses, N° 83
- Gella R, Errea P (1998) Application of in vitro therapy for ilarvirus elimination in three *Prunus* species. *Journal of Phytopathology* **146**: 445-449
- George EF (1993) Plant propagation by tissue culture. Exegetics limited. Edington, UK
- Gisbert C, Molina L (2013) Termoterapia y cultivo de meristemos de cultivares de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) infectados con el virus del mosaico de la caña. X Reunión SECIVTV- Zaragoza (comunicación personal)

- González AJ, Tello JC, Rodicio MR (2005) Bacterial wilt of beans (*Phaseolus vulgaris*) caused by *Curtobacterium flaccumfaciens* in south eastern Spain. *Plant Disease* **89**: 1361
- Grant NJ, Hammatt N (2000) Adventitious shoot development from wild cherry (*Prunus avium* L.) leaves. *New Forest* **20**: 287-295
- Grout BWW (1990) Meristem-tip culture for propagation and virus elimination. In: *Methods in Molecular Biology. Plant Cell Culture Protocols* Press, Totowa, New Jersey **111**: 115-123
- Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee WF, Kloepper JW (1997) Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal Microbiology* **43**: 895-914
- Hanke V, Rohde A, Grafe C (1991) Studies on regeneration from somatic tissue *in vitro*. Adventitious shoot formation on leaf explants in apple (*Malus x domestica* Borkh). Dresden-Pillnitz **56**: 214-220
- Hansen AJ, Lane WD (1985) Elimination of Apple chlorotic leaf spot virus from apple shoots cultures by ribavirin. *Plant Disease* **69**: 134-135
- Hanshew AS, Mason CJ, Raffa KF, Currie CR (2013) Minimization of chloroplast contamination in 16S rRNA gene pyrosequencing of insect herbivore bacterial communities. *Journal of microbiological methods* **95**:149-155
- Hardoim PR, Andreote FD, Reinhold-Hurek B, Sessitsch A, van Overbeek LS, van Elsas JD (2011) Rice root-associated bacteria: insights into community structures across 10 cultivars. *FEMS microbiology ecology* **77**: 154-164
- Hardoim PR, Van Overbeek LS, Berg G, Pirttilä AM, Compant S, Campisano A, Döring M, Sessitsch A (2015) The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **79**: 293-320
- Harlan JR (1971) Agricultural origins: Centers and Noncenters. *Science* **174**: 468-474

- Hartmann HT, Kaster DE, Davies FT, Geneve RL (2004). *Plant Propagation: Principles and Practices*. Ed. Prentice Hall of India Private Limited, New Delhi, India
- Hedges (1922) *Pseudomonas flaccumfasciens*
- Hildebrandt U, Ouziad F, Marne FJ, Bothe H (2005) The bacterium *Paenibacillus validus* stimulates growth of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* up to the formation of fertile spores. *FEMS Microbiology Letters* **254**: 258–267
- Hirabayashi T, Moriguchi T, Kozaki I, Yamamoto Y, Matsuzaki S (1987). In vitro propagation of *Pyrus* shoot tips. *Bull Fruit Tree Res Stn* **14**: 9-16
- Howell SH, Lall S, Che P (2003) Cytokinins and shoot development. *Trends Plant Science* **8**: 453-459
- Hu GJ, Hong N, Wang LP, Hu HJ, Wang GP (2012) Efficacy of virus elimination from in vitro-cultured sand pear (*Pyrus pyrifolia*) by chemotherapy combined with thermotherapy. *Crop Protection* **37**: 20-25
- Huang SC, Millikan DF (1980) In vitro micrografting of apple shoot tips. *American Society for Horticultural Science* **15**: 741-743
- Huetteman CA, Preece JE (1993) Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **33**: 105-119
- Hull R (2002) *Matthews' Plant Pathology*, 4th ed Academic Press, San Diego, USA
- IBM Corp. Released (2011) *IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0* Armonk, NY: IBM Corp.
- James D, Trytten PA, Mackenzie DJ, Towers GHN, French CJ (1997) Elimination of Apple stem grooving virus by chemotherapy and development of an immune capture RT-PCR for rapid sensitive screening. *Annals of Applied Biology* **131**: 459-470

-
- James K, Olivares FL (1997) Infection and colonization of sugar cane and other *Graminaceous* plants by endophytic diazotrophs. *Critical Reviews in Plant Sciences* **17**:77–119
- Jarausch W, Lansac M, Dosba F (1996) Long-term maintenance of nonculturable apple-proliferation phytoplasmas in their micropropagated natural host plant. *Plant Pathology* **45**: 778-786
- Jensen WA (1962) Botanical histochemistry. Freeman and Company, San Francisco
- Ji SH, Gururani MA, Chun SC (2014) Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. *Microbiological Research* **169**: 83–98
- Ji Z, Zhao X, Duan H, Hu T, Wang S, Wang Y, Cao K (2013) Multiplex RT-PCR detection and distribution of four apple viruses in China. *Acta Virologica* **57**: 435-441
- Jones DR (2005) Plant viruses transmitted by thrips. *European Journal of Plant Pathology* **113**: 119-157
- Juniper BE, Watkins R, Harris SA (1998) The origin of apple. *International Society for Horticultural Science* **484**: 27-34
- Kadota M, Niimi Y (2003) Effects of cytokinin types and their concentrations on shoot proliferation and hyperhydricity in in vitro pear cultivar shoots. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **72**: 261-265
- Kadota M, Niimi Y (2004). Influences of Carbon Sources and their Concentrations on Shoot Proliferation and Rooting of ‘Hosui’ Japanese Pear. *American Society for Horticultural Science* **39**: 1681-1683
- Kalinina A, Brown DCW (2007) Micropropagation of ornamental *Prunus* spp. and GF305 peach, a *Prunus* viral indicator. *Plant Cell Reports* **26**: 927-935

- Kamoun R, Lepoivre P, Boxus P (1998) Evidence for the occurrence of endophytic prokaryotic contaminants in micropropagated plantlets of *Prunus cerasus* cv. 'Montmorency'. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **52**: 57-59
- Kane ME (1995) Indexing explants and cultures to maintain clean stock. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* **31**: 25A
- Kassani B (1965) Therapy of virus-infected plants. *J. Roy. Agr. Soc. Engl.* **126**: 105-119
- Katiyar V, Goel R (2004) Improved plant growth from seed bacterization using siderophore overproducing cold resistant mutant of *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **14**: 653-657
- Kawaguchi M, Minamisawa K (2010) Plant–microbe communications for symbiosis. *Plant Cell Physiology* **51**: 1377-1380
- Knapp E, Hanzer V, Weiss H, da Câmara Machado A, Wang Q, Weiss B, Katinger H, Laimer da Câmara Machado M (1995) New aspects of virus elimination in fruit trees. *International Society for Horticultural Science* **386**: 409-418
- Koubouris GC, Maliogka VI, Efthimiou K, Katis NI, Vasilakakis MD (2007) Elimination of *Plum pox virus* through in vitro thermotherapy and shoot tip culture compared to conventional heat treatment in apricot cultivar Bebecou. *Journal General Plant Pathology* **73**: 370-373
- Koskimäki JJ, Pirttilä AM, Ihantola EL, Halonen O, Frank AC (2015). The intracellular scots pine shoot symbiont *Methylobacterium extorquens* DSM13060 aggregates around the host nucleus and encodes eukaryote-like proteins. *MBio* **6(2)**: e00039-15
- Krechel A, Faupel A, Hallmann J, Ulrich A, Berg G (2002) Potato-associated bacteria and their antagonistic potential towards plant-pathogenic fungi and the plant parasitic nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood. *Canadian Journal Microbiology* **48**: 772-786

- Laimer M, Barba M (2011) Elimination of systemic pathogens by thermotherapy, tissue culture, or in vitro micrografting. In: Virus and virus-like diseases of pome and stone fruits. *American Phytopathological Society*, St. Paul, MN
- Lane WD, Iketani H, Hayashi T (1998) Shoot regeneration from cultured leaves of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **54**: 9-14
- Laszloffy K, Abdul Kader AM, Mathé A (1992) In vitro propagation of 'Julyred' apple. *International Society for Horticultural Science* **300**: 149-154
- Lee HJ, Park KH, Shim JH, Park RD, Kim YW, Cho JY, Hwangbo H, Kim YC, Cha G S, Krishnan HB, Kim KY (2005) Quantitative changes of plant defense enzymes in biocontrol of pepper (*Capsicum annuum* L.) late blight by antagonistic *Bacillus subtilis* HJ927. *World Journal Microbiology Biotechnology* **15**: 1073-1079
- Leifert C, Ritchie JY, Waites WM (1991a) Contaminants of plant-tissue and cell-cultures. *World Journal Microbiology Biotechnology* **7**: 452-469
- Leifert C, Camotta H, Wright SM, Waites B, Cheyne VA, Waites WM (1991b) Elimination of *Lactobacillus plantarum*, *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus saprophyticus* and *Pseudomonas paucimobilis* from micropropagated *Hemerocallis*, *Choisya* and *Delphinium* cultures using antibiotics. *Journal of Applied Microbiology* **71**: 307-330
- Leifert C, Morris CE, Waites WM (1994) Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field grown plants: reason for contamination problems in vitro. *Critical Reviews in Plant Sciences* **13**: 139-183
- Leifert C, Cassells A (2001) Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* **37**: 133-138
- Leppick EE (1970) Gene centers of plants as sources of disease resistance. *Annual Reviews of Phytopathology* **8**: 323-344
- Li B-Q, Feng F-C, Hu L-Y, Wang M-R, Wang Q-C (2016) Shoot tip culture and cryopreservation for eradication of *Apple stem pitting virus* (ASPV) and *Apple*

- stem grooving virus* (ASGV) from apple rootstocks 'M9' and 'M26'. *Annals of Applied Biology* **168**: 142-150
- Li X, Xu M, Korban SS (2002) DNA methylation profiles differ between field and in vitro-grown leaves of apple. *Journal of Plant Physiology* 159:1229-1234
- Lidstrom ME, Chistoserdova L (2002) Plants in the pink: Cytokinin production by *Methylobacterium*. *Journal Bacteriology* **184**: 1818
- Lister RM (1970) Apple chlorotic leaf spot virus. Commonwealth Mycological Institute Association of Applied Biologists. Description of plant viruses, N° 30
- Lizárraga A, Ascasíbar J, González ML (2017) Fast and reliable thermotherapy treatment for in vitro virus eradication in apple and pear trees. *European Journal of Plant Pathology* (en revisión)
- Lodewyckx C, Vangronsveld J, Porteous F, Moore ERB, Taghavi S, Mezgeay M, der Lelie DV (2002) Endophytic bacteria and their potential applications. *Critical Reviews in Plant Sciences* **21**: 583-606
- Ludwig-Müller J (2015) Plants and endophytes: equal partners in secondary metabolite production?. *Biotechnology letters* **37**: 1325
- Madhaiyan M, Poonguzhali S, Sa T (2007) Influence of plant species and environmental conditions on epiphytic and endophytic pink-pigmented facultative methylotrophic bacterial populations associated with field-grown rice cultivars. *World Journal Microbiology Biotechnology* **17**: 1645-1654
- Madhaiyan M, Poonguzhali S (2014) "*Methylobacterium pseudosasicola* sp. nov. and *Methylobacterium phyllostachyos* sp. nov., isolated from bamboo leaf surfaces." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **64**: 2376-2384
- Madigan M, Martinko J, Parker J (1997) Brock Biology of Microorganisms, Eighth Ed. Prentice Hall, New Jersey, USA

- Madoff S, Lawson JW (1992) The L-forms of bacteria In: The prokaryots. Springer, New York
- Magyar-Tábori K, Dobránszki J, Teixeira da Silva A, Bulley SM, Hudák I (2010) The role of cytokinins in shoot organogenesis in apple. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **101**: 251-267
- Mahna N, Motallebi AA (2007) In vitro micropropagation of apple (*Malus × domestica* borkh.) cv. Golden delicious. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences* **72**: 235-238
- Manganaris GA, Economou AS, Boubourakas IN, Katis NI (2003) Elimination of PPV and PNRSV through thermotherapy and meristem-tip culture in nectarine. *Plant Cell Reports* **22**: 195-200
- Mannini F, Argamante N, Credi R, (1996) Improvements in the quality of grapevine ‘Nebbiolo’ clones obtained by sanitation. *International Society for Horticultural Science* **427**: 106-111
- Mano H, Morisaki H (2008) Endophytic bacteria in the rice plant. *Microbes Environments* **23**: 109-117
- Marino BG, Gaggía F (2015) Antimicrobial activity of *Melia azedarach* fruit extracts for control of bacteria in inoculated in vitro shoots of “MRS 2/5” plum hybrid and calla lily and extract influence on the shoot cultures. *European Journal Plant Pathology* **141**: 505-521
- Massart S, Brostaux Y, Barbarossa L, Batlle A, Cesar V, Dutrecq O, Fonseca F, Guillem R, Komorowska B, Olmos A, Steyer S, Wetzl T, Kummert J and Jijakli MH (2009) Interlaboratory evaluation of two Reverse-transcriptase Polymerase Chain Reaction-based methods for detection of four fruit tree viruses. *Annals of Applied Biology* **154**: 133-141
- Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (2015) Anuario de Estadística, Madrid

- Mink GI, Shay JR (1959) Preliminary evaluation of some Russian apple varieties as indicators for apple viruses. *Plant Disease Reporter Supplement* **254**: 13-7
- Mink GI (1992): Ilarvirus vectors. *Advances in Disease Vector Research* **9**: 261-281
- Mink GI, Wample R, Howell WE (1998) Heat treatment of perennial plants to eliminate phytoplasmas, viruses, and viroids while maintaining plant survival. In: *Control Plant virus disease* St. Paul, MN, USA
- Modgil M, Sharma DR, Bhardwaj SV (1999) Micropropagation of apple cv. Tydeman's Early Worcester. *Scientia Horticulturae* **81**: 179-188
- Moraes LKA, Felisbino C, Crestani L, Silva AL (2004) Estabelecimento e multiplicação in vitro de *Pyrus calleryana* D-6 em sistema de cultura 'dupla-fase'. *Revista Brasileira de Fruticultura* **26**: 403-405
- Morel G, Martin G (1952) Guérison de dahlias atteintes d'une maladie á virus. *Comp Rend Acad. Seances Soc. Biol. Paris* **235**: 1324-1325
- Moreno-Vázquez S, Larrañaga N, Uberhuaga EC, Braga EJB, Pérez-Ruíz C (2014) Bacterial contamination of in vitro plant cultures: confounding effects on somaclonal variation and detection of contamination in plant tissues. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **119**: 533-541
- Moretti C, Scozzoli A, Pasini D, Paganelli F (1992) In vitro propagation of pear cultivars. *International Society for Horticultural Science* **300**: 115-118
- Moutia M, Dookun A (1999) Evaluation of surface sterilization and hot water treatments on bacterial contaminants in bud culture of sugarcane. *Experimental agriculture* **35**: 265-274
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissues cultures. *Physiologia Plantarum* **15**: 473-497
- Nadarajan J, Staines HJ, Benson EE, Marzalina M, Krishnapillay B, Harding K (2006) Optimization of cryopreservation protocol for *Sterculia cordata* zygotic embryos using Taguchi experiments. *Journal of Tropical Forest Science* **18**: 222-230

- Nemeth M (1986) Apple chlorotic leaf spot. In: Akademiai Kiado, Budapest, Martinus Nijhoff, Ed. Virus: mycoplasma and rickettsia diseases of fruit trees. Dordrecht, Boston, Lancaster
- O'Herlihy EA, Croke JT, Cassells AC (2003) Influence of in vitro factors on titre and elimination of model fruit tree viruses. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **72**: 33-42
- Orlikowska T, Nowak K, Reed B (2017) Bacteria in the plant tissue culture environment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **128**: 487-08
- Osdaghi E, Taghavi SM, Hamedi J, Mohammadipanah F (2015) Bacterial wilt of common bean (*Phaseolus vulgaris*) caused by *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in Iran. *Australasian Plant Disease Notes* **10**: 23
- Palombi MA, Lombardo B, Caboni E (2007) In vitro regeneration of wild pear (*Pyrus pyrastrer* Burgsd) clones tolerant to Fe-clorosis and somaclonal variation analysis by RAPD markers. *Plant Cell Reports* **26**: 489-496
- Panattoni A, Luvisi A, Triolo E (2013) Review Elimination of viruses in plants: twenty years of progress. *Spanish Journal of Agricultural Research* **11**: 173-188
- Papstein F, Sedláč J, Polak J, Svobodova L, Hassan M, Bryxiova M (2008) Results of in vitro thermotherapy of apple cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **94**: 347-352
- Pawlicki N, Welander M (1994) Adventitious shoot regeneration from leaf segments of *in vitro* cultured shoots of the apple rootstock Jork 9. *Journal Horticultural Science and Biotechnology* **69**: 687-696
- Pereira-Lorenzo S, Ascáibar-Errasti J, Ramos-Cabrera AM, Piñeiro-Andión J (2002) Colección de cultivares autóctonos gallegos de manzano (*Malus x domestica*) del Banco de Germoplasma de Mabegondo. Ministerio de Ciencia y Tecnología, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentación, Madrid

- Pereira-Lorenzo S, Ramos-Cabrer AM, Ascasíbar-Errasti J, Piñeiro-Andión J (2003) Analysis of apple germplasm in northwestern Spain. *American Society for Horticultural Science* **128**: 67-84
- Pereira-Lorenzo S, Ramos-Cabrer AM, Díaz-Hernández MB (2007) Evaluation of genetic identity and variation of local apple cultivars (*Malus x domestica* Borkh.) from Spain using microsatellite markers. *Genetic Resources Crop Evolution* **54**: 405-420
- Pereira-Lorenzo S, Ramos-Cabrer AM, Fischer M (2009) Breeding apple (*Malus x Domestica* Borkh.). In *Breeding Plantation Tree Crops: Temperate species* (pp. 33-81) Springer, New York
- Pereira-Lorenzo S, Carregosa AR, Ramos-Cabrer AM, Díaz-Hernández MB (2013) Caracterización dos cultivares de Pereira do Banco de Xermoplasma do Centro de Investigacións Agrarias de Mabegondo (CIAM). Ed. Consellería do Medio Rural e do Mar, Santiago de Compostela
- Pérez JN (1998) Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología Ed. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Cuba
- Petrzik K, Lenz O (2011) Apple mosaic virus in pome fruits. In: *Virus and virus-like diseases of pome and stone fruits*. American Phytopathological Society (pp. 25-28) Press, St. Paul, MN, USA
- Plopa C, Preda S (2013) Elimination of Apple mosaic virus by tissue culture of some infected apple cultivars. *International Society for Horticultural Science* **981**: 517-522
- Ponka A, Andersson Y, Siitonen A, De Jong B, Jahkola M, Haikala O, Kuhmonen A & Pakkala P (1995) Salmonella in alfalfa sprouts. *Lancet* **345**: 462-463
- Ponomarenko VV (1977) On the specific composition of wild growing apple trees in the USSR and centers of their genetic diversity. *Botanical Journal* (in Russian) **62**: 820-831

- Ponomarenko VV (1987) History of *Malus domestica* Borkh origin and evolution. *Botanical Journal* (in Russian) **176**: 10-18
- Posnette AF, Cropley R (1956) Apple mosaic virus host reactions and strain interference. *Journal of Horticulture Science* **31**: 119-133
- Posnette AF, Cropley R (1959) The reduction in yield caused by Apple mosaic. *Annual Report East Malling Research Station* 89–90
- Poudyal BK, Zhang Y, Du G (2008) Adventitious shoot regeneration from the leaves of some pear varieties (*Pyrus spp.*) grown in vitro. *Frontiers Agriculture China* **2**: 82-92
- Pruski KW, Lewis T, Astatkie T, Nowak J (2000) Micropropagation of Chokecherry and Pincherry cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **63**: 93
- Quadt-Hallmann A, Kloeppe JW (1996) Immunological detection and localization of the cotton endophyte *Enterobacter asburiae* JM22 in different plant species. *Canadian Journal Microbiology* **42**:1144–1154
- Quambusch M, Pirttilä AM, Tejesvi MV, Winkelmann T, Bartsch M (2014) Endophytic bacteria in plant tissue culture: differences between easy- and difficult-to-propagate *Prunus avium* genotypes. *Tree Physiology* **34**: 524-533
- Quambusch M, Brümmer J, Haller K, Winkelmann T, Bartsch M (2016) Dynamics of endophytic bacteria in plant in vitro culture: quantification of three bacterial strains in *Prunus avium* in different plant organs and in vitro culture phases. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **126**: 305-317
- Rafail ST, Mosleh MS (2010) Factors involved in micropropagation and shoot-tip grafting of apple (*Malus domestica* borkh.) and pear (*Pyrus sp.*). Tropetang, Zurich
- Reed BM, Tanprasert P (1995) Detection and control of bacterial contaminants of plant tissue cultures. A review of recent literature. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* **1**: 137-142

- Reed BM, Buckley PM, Dewilde TN (1995) Detection and eradication of endophytic bacteria from micropropagated mint plants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* **31**: 53-57
- Reinhold-Hurek B, Hurek T (1998) Life in grasses: diazotrophic endophytes. *Trends in Microbiology* **6**: 139-144
- Reinhold-Hurek B, Hurek T. (2011) Living inside plants: bacterial endophytes. *Current Opinion in Plant Biology* **14**: 435-443
- Rodríguez PE, Rodrigues LS, de Oliveira MAL, Baldani VLD, dos Santos Teixeira KR, Urquiaga S, Reis VM (2008) Azospirillum amazonense inoculation: effects on growth, yield and N₂ fixation of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant and Soil* **302**: 249-261
- Rodriguez R, Diaz-Sala C, Cuzzo L, Ancora G (1991) Pear in vitro propagation using a double-phase culture system. *American Society for Horticultural Science* **26**: 62-64
- Saito A, Ikeda S, Ezura, H Minamisawa K (2007) Microbial community analysis of the phytosphere using culture-independent methodologies. *Microbes and Environments* **22**: 93-105
- Sanchez MC, San-Jose MC, Ballester A, Vieitez AM (1996) Requirements for in vitro rooting of *Quercus robur* and *Q. rubra* shoots derived from mature trees. *Tree Physiology* **16**: 673-680
- Sarwar M, Skirvin RM (1997) Effect of thidiazuron and 6-benzylaminopurine on adventitious shoot regeneration from leaves of three strains of 'McIntosh' apple (*Malus x domestica* Borkh.) in vitro. *Scientia Horticulturae* **68**: 95-100
- Schauer S, Kutschera U (2008) Methylophilic bacteria on the surfaces of field-grown sunflower plants: a biogeographic perspective. *Theory in Biosciences* **127**: 23-29
- Schmidt S, Christen P, Kiefer P, Vorholt JA (2010) Functional investigation of methanol dehydrogenase-like protein XoxF in *Methylobacterium extorquens* AM1. *Microbiology* **156**: 2575-2586

- Sedlák J, Paprstein F, Bilavčík A, Zámečník J (2001) Adaptation of apple and pear plants to *in vitro* conditions and to low temperature. *International Society for Horticultural Science* **560**: 457-460
- Sedlák J, Paprstein F, Talacko L (2011) Elimination of Apple stem pitting virus from pear cultivars by *in vitro* chemotherapy. *International Society for Horticultural Science* **923**: 111–115
- Sedlák J, Paprstein F (2016) *In vitro* establishment and proliferation of apple cultivars. *International Society for Horticultural Science* **1113**: 107-112
- Seija V, Vignoli R (2006) Principales grupos de antibióticos. *Temas de Bacteriología y Virología Médica* 631-647
- Sessitsch A, Hardoim P, Döring J, Weilharter A, Krause A, Woyke T, Mitter B, Hauberg-Lotte L, Friedrich F, Rahalkar M, Hurek T, Sarkar A, Bodrossy L, van Overbeek L, Brar D, van Elsas JD, Reinhold-Hurek B (2012) Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **25**: 28-36
- Sharma VK, Nowak J (1998) Enhancement of verticillium wilt resistance in tomato transplants by *in vitro* co-culture of seedlings with a plant growth promoting rhizobacterium (*Pseudomonas* sp. strain PsJN). *Canadian Journal Microbiology* **44**: 528-536
- Shibli RA, Ajlouni MM, Jaradat A, Aljanabi S, Shatnawi M (1997) Micropropagation in wild pear (*Pyrus syrica*). *Scientia Horticulturae* **68**: 237-242
- Sprent JI, de Faria SM (1988) Mechanisms of infection of plants by nitrogen fixing organisms. *Plant Soil* **110**: 157-165
- Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, Grimont PAD, Kampfer P, Maiden MCJ, Nesme X, Rossello-Mora R, Swings J, Trüper HG, Vauterin L, Ward AC, Whitman WB (2002) Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal Systematic Evolutionary Microbiology* **52**: 1043-1047

- Stoughton RH (1930) Thionin and Orange G for the differential staining of Bacteria and Fungi in Plant Tissues. *Annals of Applied Biology* **17**: 162-164
- Streit WR, Schmitz RA (2004) Metagenomics The key to the uncultured microbes. *Current Opinion Microbiology* **7**: 492-498
- Sturz AV, Christie BR, Matheson BG, Arsenault WJ, Buchanan NA (1999) Endophytic bacterial communities in the periderm of potato tubers and their potential to improve resistance to soil-borne plant pathogens. *Plant Pathology* **48**: 360-369
- Svoboda J, Polák J (2010) Relative concentration of Apple mosaic virus coat protein in different parts of apple tree. *Horticulture Science* **37**: 22-26
- Tan R, Wang L, Hong N, Wang G (2010) Enhanced efficiency of virus eradication following thermotherapy of shoot-tip cultures of pear. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **101**: 229-235
- Tang H, Luo Y, Liu C (2008) Plant regeneration from in vitro leaves of four commercial *Pyrus* species. *Plant Soil and Environment* **54**: 140-148
- Tarr SAJ (1972) The principles of plant pathology. Macmillan, London
- Thakur A, Kanwar JS (2008) Micropropagation of “Wild Pear” *Pyrus pyrifolia* (Burm F) Nakai I Explant Establishment and shoot Multiplication. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj Napoca* **36**: 103-108
- Thomas P, Sekhar AC (2014) Live cell imaging reveals extensive intracellular cytoplasmic colonization of banana by normally non-cultivable endophytic bacteria. *AoB Plants* **6**
- Thresh JM, Adams AN, Barbara DJ, Clark MF (1977) The detection of three viruses of hop (*Humulus lupulus*) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Annals of Applied Biology* **87**: 57-65
- Torres AC, Caldas LS, Buso JA (1998) Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. *Brasilia Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq* **1**: 133-145

- Van Peer R, Punte HLM, De Wega LA, Schippers B (1990) Characterization of root surface and endorhizosphere *Pseudomonads* in relation to their colonization of roots. *Applied and Environmental Microbiology* **56**: 2462–2470
- Vavilov NI (1926) Studies on the Origin of Cultivated Plants. *Bulletin of Applied Botany, Genetics and Plant Breeding* **16**: 1-248
- Vavilov NI (1931) The problem concerning the origin of agriculture in the light of recent research. (Socialist reconstruction and science) **1**: 34-43
- Verma N, Ram R, Zaidi AA (2005) In vitro production of Prunus necrotic ringspot virus-free begonias through chemo-and thermotherapy. *Scientia Horticulturae* **103**: 239-247
- Wang L, Wang G, Hong N, Tang R, Deng X (2006) Effect of thermotherapy on elimination of Apple stem grooving virus and Apple chlorotic leaf spot virus for in vitro-cultured pear shoot tips. *American Society for Horticultural Science* **41**: 729-732
- Wang LP, Hong N, Wang GP, Xu WX, Michelutti R, Wang AM (2010) Distribution of apple stem grooving virus and apple chlorotic leaf spot virus in infected in vitro pear shoots. *Crop Protection* **29**: 1447-1451
- Wang MR, Li BQ, Feng CH, Wang QC (2016) Culture of shoot tips from adventitious shoots can eradicate Apple stem pitting virus but fails in Apple stem grooving virus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **125**: 283-291
- Wang X, Yam TW, Meng Q, Zhu J, Zhang P, Wu H, Wang J, Zhao Y, Song X (2016) The dual inoculation of endophytic fungi and bacteria promotes seedlings growth in *Dendrobium catenatum* (Orchidaceae) under in vitro culture conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **126**: 523-531
- Watpade S, Raigond B, Thakur PD, Handa A, Pramanick KK, Sharma YP, Tomar M (2012) Molecular detection of latent Apple chlorotic leaf spot virus in elite mother plants of apple. *Indian Journal of Virology* **23**: 359-363

- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology* **173**: 697-703
- White RP (1928) An infectious chlorosis of roses. *Plant Disease Reporter* **13**: 33-34
- Wilheim E, Arthofer W, Schafleitner R (1997) *Bacillus subtilis*, an endophyte of chestnut (*Castanea sativa*), as antagonist against chestnut blight (*Cryphonectria parasitica*) Ed. Pathogen and microbial contamination management in micropropagation. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherland
- Xiao Z, Ji N, Zhang X, Zhang Y, Wang Y, Wu T, Xu X, Han Z (2014) The lose of juvenility elicits adventitious rooting recalcitrance in apple rootstocks. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **119**: 51-63
- Xu J, Wang Y, Zhang Y, Chai TY (2008) Rapid in vitro multiplication and ex vitro rooting of *Malus zumi* (Matsumura) Rehd. *Acta Physiologiae Plantarum* **30**: 129-132
- Yepes LM, Aldwinckle SH (1994) Micropropagation of thirteen *Malus* cultivars and rootstocks, and effect of antibiotics on proliferation. *Plant Grow Regulation* **15**: 55-67
- Yoon SH, Ha SM, Kwon S, Lim J, Kim Y, Seo H, Chun J (2016) Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. *International Journal Systematic Evolutionary Microbiology*
- Zaspel I, Ulrich A, Boine B, Stauber T (2008) Occurrence of culturable bacteria living in micropropagated black locust cultures (*Robinia pseudoacacia* L.) *European Journal Horticultural Science* **73**: 231-235
- Zilka S, Faingersh E, Rotbaum A, Tam Y, Spiegel S, Malca N (2002) In vitro production of virus-free pear plants. *International Society for Horticultural Science* **596**: 477-479
- Zohary D, Hopf M (2000) Domestication of plants in the Old World. Oxford University Press, New York

ANEXOS

Tabla 1. Composición del medio mineral Murashige & Skoog empleados en los cultivos de esta tesis.

MICRONUTRIENTES (μM)	MACRONUTRIENTES (mM)		
CoCl ₂ *6H ₂ O	0.11	CaCl ₂	2.99
CuSO ₄ *5H ₂ O	0.1	KH ₂ PO ₄	1.25
FeNaEDTA	100	KNO ₃	18.79
H ₃ BO ₃	100	MgSO ₄	1.5
MnSO ₄ *H ₂ O	100	NH ₄ NO ₃	20.61
Na ₂ Mo ₄ *2H ₂ O	1.03		
ZnSO ₄ *7H ₂ O	29.91		

Tabla 2. Composición de las vitaminas utilizadas en el medio mineral Murashige & Skoog.

Vitaminas MS Modificadas	(μM)
Mio-Inositol	560
Acido Nicotínico	4.06
Piridoxina-HCL	2.43
Tiamina-HCL	2.96
Glicina	26.64

Tabla 3. Conversión de unidades de los Reguladores de Crecimiento (PGRs) utilizados en los medios de cultivo para el desarrollo de esta tesis.

BA		Zeatina	
mgL ⁻¹	μM	mgL ⁻¹	μM
0.25	1.11	0.25	1.14
0.5	2.22	0.5	2.28
1	4.44	1	4.56
2iP		TDZ	
mgL ⁻¹	μM	mgL ⁻¹	μM
0.25	1.23	0.25	1.135
0.5	2.46	0.5	2.27
1	4.92	1	4.54
AIB		ANA	
mgL ⁻¹	μM	mgL ⁻¹	μM
0.1	0.49	1000	5.35*10 ³
0.3	1.48	2000	10.7*10 ³
1000	4.9*10 ³	GA ₃	
2000	9.8*10 ³	mgL ⁻¹	μM
		0.2	0.58

Tabla 4. Composición del tampón revestimiento de las placas (DAS-ELISA), para 1000 mL.

Na ₂ CO ₃	1.59g
NaHCO ₃	2.93g
NaN ₃	0.20g

Tabla 5. Composición de tampón fosfato salino (PBST), para 1000 mL.

NaCl	8.00g
KH ₂ PO ₄	0.20g
Na ₂ HPO ₄	1.15g
KCl	0.20g
Tween 20	0.50g

Tabla 6. Composición de tampón sustrato para el test DAS-ELISA, para 1000 mL.

Diethanolamine	97.00 mL
NaN ₃	0.20g

Tabla 7. Composición de tampón conjugado para el test DAS-ELISA, para 1000 mL.

TRIS	2.40g
NaCl	8.00g
PVP K25 (MW 24000)	20.00g
Tween 20	0.50g
BSA (albumina de suero bovino)	2.00g
MgCl ₂ . 6 H ₂ O	0.20g
KCl	0.20g
NaN ₃	0.20g

Tabla 8. Composición de los tampones utilizados para la amplificación del producto de la PCR, para el desarrollo de esta tesis.

Tampón Tris-Acetato (TAE)	Tampón Tris-EDTA (TE)
Tris-Acetato 0.04 M	Tris 10 mM
EDTA 0.001 M	EDTA 1 mM
Solución stock (1 litro) 50x:	Solución stock (1litro) 1x:
Tris base 242 g	10 ml 1M Tris-Cl 10 mM
Ácido acético 57.1 ml	2 ml 0.5M EDTA pH 8.0 1 mM
EDTA (pH 8.0) 0.5 M 100 ml	

Tabla 9. Identificación de géneros y algunas especies de bacterias endófitas de los cultivares de manzano ‘Cacharela’, ‘Camoesa’, ‘Gravillán’ y ‘José Antonio’.

Microbioma	Cacharela	Camoesa	Gravillán	José Antonio
<i>Cloacibacterium normanense</i>	0,000563298	0,010151666	0	0
<i>Corynebacterium sp.</i>	0,000563298	0,018272999	0,002023636	0
<i>Bacillus selenatarsenatis</i>	0	0	0,004047272	0
<i>Syntrophus spp.</i>	0,000563298	0,046697663	0	0
<i>Acinetobacter sp.</i>	0	0	0	0,000893943
<i>Delftia spp.</i>	0,001689893	0,012181999	0,234741784	0,004469713
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	0,325586111	1,368444562	58,76436782	0,205606808
<i>Chryseobacterium sp.</i>	0	0,006091	0	0
<i>Corynebacterium tuberculostearicum</i>	0	0	0,036425449	0
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	0	0	0,026307269	0
<i>Eikenella sp.</i>	0	0	0	0,000893943
<i>Rudaecoccus suwonensis</i>	0,147584016	0,190851319	0,263072689	0,109954945
<i>Sphingomonas spp.</i>	0,021405315	0,201002985	0,135583617	0,003575771
<i>Bacteroides sp.</i>	0,000563298	0,016242665	0,002023636	0
<i>Spirosoma sp.</i>	0,000563298	0,014212332	0,319734499	0
<i>Frigoribacterium spp.</i>	0,001126596	0,002030333	0,006070908	0
<i>Hyphomicrobium spp.</i>	0	0	0,034401813	0
<i>Cyanobacterium spp.</i>	0,019152124	0,363429639	0,481625384	0,007151541
<i>Shigella sonnei</i>	0	0,012181999	0	0
<i>Lysobacter sp.</i>	0,036614355	0,006091	0	0
<i>Cellulomonas sp.</i>	0,001126596	0,012181999	0,1234418	0
<i>Chloroflexus spp.</i>	0,007322871	0	0	0
<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	0,008449467	1,508537551	0,111299984	0,002681828
<i>Burkholderia spp.</i>	0,000563298	0,002030333	0,002023636	0,000893943
<i>Curvibacter spp.</i>	0	0,192881652	0,002023636	0,001787885
<i>Sphingomonas echinoides</i>	0,304744094	39,66255863	20,40634612	0,122470142
<i>Frondehabitans sp.</i>	0,018588826	0,148214322	4,047272139	0,011621254
<i>Sorangium spp.</i>	0	0,004060666	0,020236361	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	0,004060666	0,161890886	0,000893943
<i>Streptomyces sp.</i>	0	0	0,078921807	0
<i>Pseudomonas spp.</i>	0,001689893	0,138062656	0,121418164	0,000893943
<i>Rhodanobacter ginsengisoli</i>	0,001689893	0	0	0,000893943

Continuación de Tabla 9

<i>Propionibacterium acnés</i>	0	0,028424664	0,089039987	0
<i>Oaenibacillus validus</i>	0,001689893	0,002030333	0,435081755	0,001787885
<i>Acidovorax sp.</i>	0,001689893	0,649706617	0,01011818	0,008045484
<i>Arsenicococcus sp.</i>	0	0	0,01011818	0
<i>Geobacillus spp.</i>	0	0,008121333	0	0
<i>Xanthobacter sp.</i>	0	0	0,012141816	0
<i>Herminiimonas spp.</i>	0	0	0,028330905	0,000893943
<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i>	0,023658506	0,030454998	0,04654363	0,01698491
<i>Pseudomonas sp.</i>	0	0,004060666	0	0,010727312
<i>Kribbia sp.</i>	0,000563298	0,12791099	0	0
<i>Rhodanobacter terrae</i>	0,152090398	0,071061661	0,002023636	0,003575771
<i>Burkholderia andropoginis</i>	1,5411827	27,28361724	9,373482273	98,17903883
<i>Methylobacterium pseudoasícola</i>	0,114349447	1,104501249	0,704225352	0,084030609
<i>Pelomonas aquatica</i>	0,002253191	0,002030333	0,153796341	0,001787885
<i>Methylobacterium spp.</i>	0,001689893	0,022333665	0,01011818	0,000893943
<i>Luteibacter rhizovicinus</i>	96,26477248	24,79848943	1,835437915	0,682078238
<i>Ralstonia spp.</i>	0	0	0	0,003575771

Tabla10. Identificación de géneros y algunas especies de bacterias endófitas de los cultivares de manzano ‘Príncipe Grande’, ‘Repinaldo’, ‘Tres en Cunca’ y ‘Ollo Mouro’.

Microbioma	Príncipe Grande	Repinaldo	Tres en Cunca	Ollo Mouro
<i>Cloacibacterium normanense</i>	0,00085655	0,00515557	0,00744364	0,00516756
<i>Corynebacterium sp.</i>	0	0,00257778	0,0095704	0,00775134
<i>Bacillus selenatarsenatis</i>	0	0	0,00106338	0
<i>Acinetobacter sp.</i>	0,00085655	0	0,00425351	0
<i>Delftia spp.</i>	0,00256964	0,00773335	0,00212675	0
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	0,39915031	64,1816823	8,22522331	1,7750562
<i>Chryseobacterium sp.</i>	0	0,00257778	0,00106338	0
<i>Eikenella sp.</i>	0	0,00257778	0	0
<i>Rudaeicoccus suwonensis</i>	0,1610306	0,41760111	0,22118248	94,6489936
<i>Sphingomonas spp.</i>	0,00685237	0,01804449	0,03509145	0,00516756
<i>Spirosoma sp.</i>	0,00256964	0	0	0
<i>Frigoribacterium spp.</i>	0,00085655	0,00515557	0,00212675	0,00258378
<i>Hyphomicrobium spp.</i>	0,00085655	0	0	0
<i>Chryseobacterium hominis</i>	0	0	0,00212675	0
<i>Cyanobacterium spp.</i>	0,01456128	0,01288892	0,00531689	0,00775134

Continuación de Tabla 10

<i>Streptococcus salivarius</i>	0,00085655	0,00515557	0	0
<i>Leifsonia spp.</i>	0	0	0,00425351	0
<i>Shigella sonnei</i>	0	0	0,00106338	0
<i>Lysobacter sp.</i>	0,00342618	0	0,00531689	0
<i>Cellulomonas sp.</i>	0	0	0,00212675	0
<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	0,01199164	0,03608899	0,00212675	0,02067023
<i>Burkholderia spp.</i>	0	0,00257778	0,00106338	0
<i>Curvibacter spp.</i>	0,00171309	0	0,00212675	0
<i>Sphingomonas echinoides</i>	0,4197074	1,42035934	0,21373883	1,34873266
<i>Frondehabitans sp.</i>	0,0205571	2,66285155	0,0701829	0,06459448
<i>Massilia timonae</i>	0	0,01031114	0	0
<i>Agromyces sp.</i>	0	0,00773335	0,00106338	0
<i>Streptomyces sp.</i>	0	0,00257778	0,00106338	0
<i>Pseudomonas spp.</i>	0,00171309	0	0,00212675	0
<i>Rhodanobacter ginsengisoli</i>	0,00342618	0,00515557	0,00531689	0
<i>Ropionibacterium acnes</i>	0	0	0,00106338	0
<i>Granulicella paludicola</i>	0	0	0,00425351	0
<i>Paenibacillus validus</i>	0,00256964	0	0	0
<i>Acidovorax sp.</i>	0,00342618	0,00257778	0,00638026	0
<i>Arsenicicoccus sp.</i>	0	0,00515557	0	0,00258378
<i>Microbacterium testaceum</i>	0,00085655	0	0,00106338	0
<i>Herminiimonas spp.</i>	0,00085655	0	0,00106338	0
<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i>	0,02227019	0,01804449	0,03721821	0,54000982
<i>Pseudomonas sp.</i>	0,00085655	0	0,00531689	0
<i>Kribbia sp.</i>	0	0,00257778	0	0
<i>Rhodanobacter terrae</i>	0,14389968	0,01804449	0,07868992	0,00258378
<i>Burkholderia andropoginis</i>	2,81717888	23,653752	69,6522756	0,63819342
<i>Methylobacterium pseudoasicola.</i>	26,5203687	2,08542778	0,14461931	0,04392424
<i>Pelomonas aquatica</i>	0,00085655	0	0,00212675	0
<i>Methylobacterium spp.</i>	0,009422	0,00257778	0,00425351	0
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	0	0,00773335	0	0
<i>Luteibacter rhizovicinus</i>	68,724946	5,00605779	20,0180774	0,73379325
<i>Ralstonia spp.</i>	0	0	0,00425351	0

Tabla 11. Identificación de géneros y algunas especies de bacterias endófitas de los cultivares de peral ‘Barburiña y ‘Manteca Oscura’.

Microbioma	Barburiña	Manteca Oscura
<i>Cloacibacterium normanense</i>	0,01983461	0,00135342
<i>Corynebacterium sp.</i>	0,01296878	0
<i>Bacillus selenatarsenatis</i>	0,00076287	0,00270684
<i>Syntrophus spp.</i>	0,00076287	0
<i>Acinetobacter sp.</i>	0,00228861	0,00135342
<i>Delftia spp.</i>	0,00457722	0,00406025
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	0,2235208	0,22737423
<i>Chryseobacterium sp.</i>	0,00076287	0
<i>Eikenella sp.</i>	0,00228861	0,00135342
<i>Rudaeicoccus suwonensis</i>	0,13655366	0,08661876
<i>Sphingomonas spp.</i>	0,00610296	0
<i>Spirosoma sp.</i>	0,00076287	0
<i>Frigoribacterium spp.</i>	0,00076287	0
<i>Chryseobacterium hominis</i>	0,00076287	0
<i>Cyanobacterium spp.</i>	0,01068017	0,00541367
<i>Streptococcus salivarius</i>	0,00228861	0
<i>Leifsonia spp.</i>	0	0,00135342
<i>Shigella sonnei</i>	0,00076287	0
<i>Lysobacter sp.</i>	0	0,00135342
<i>Turicella spp.</i>	0,00686583	0
<i>Chloroflexus spp.</i>	0,00076287	0
<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	0,00534009	0
<i>Burkholderia spp.</i>	0	0,00270684
<i>Curvibacter spp.</i>	0,00152574	0,00406025
<i>Sphingomonas echinoides</i>	0,23954106	0,08391192
<i>Frondihabitans sp.</i>	0,00915444	0,01353418
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0,00228861	0
<i>Pseudomonas spp.</i>	0,00076287	0
<i>Rhodanobacter ginsengisoli</i>	0	0,00135342
<i>Propionibacterium acnes</i>	0	0
<i>Paenibacillus validus</i>	0,00152574	0
<i>Acidovorax sp.</i>	0,00305148	0,00135342
<i>Microbacterium testaceum</i>	0,00076287	0
<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i>	0,01983461	0,02436153
<i>Pseudomonas sp.</i>	0,00915444	0,01759443
<i>Rhodanobacter terrae</i>	0,00152574	0,00135342

Continuación de Tabla 11

<i>Burkholderia andropoginis</i>	97,8090385	98,2892796
<i>Methylobacterium pseudoasícola</i>	0,12129627	0,05819698
<i>Pelomonas aquatica</i>	0,00076287	0,00135342
<i>Methylobacterium spp.</i>	0,00076287	0
<i>Luteibacter rhizovicinus</i>	0,74913796	0,56708217
<i>Ralstonia spp.</i>	0	0,00541367



DEPARTAMENTO DE BIOLOXÍA FUNCIONAL
FACULTADE DE BIOLOXÍA

