



Universidad de Valladolid

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍAS
AGRARIAS**

**Titulación
Grado en enología**

**Métodos de conservación de la vid mediante el
cultivo *"in vitro"***

Alumno: Jesús Martínez Rodríguez

Tutora: Elena Hidalgo Rodríguez

ÍNDICE

1. RESUMEN	2
2. INTRODUCCIÓN	3
3. JUSTIFICACIÓN	5
4. OBJETIVOS.....	6
5. MÉTODOS Y MATERIALES.....	6
5.1 Búsqueda y recopilación de información	6
5.2 Elaboración de la revisión bibliográfica	6
6. ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO	7
6.1.1 Perspectiva histórica	7
6.1.2 Revisión de alternativas	7
6.2 El cultivo “<i>in vitro</i>” y su potencial en conservación de germoplasma	9
6.2.1 Panorámica.....	9
6.2.2 Potencial del cultivo “ <i>in vitro</i> ” como sistema de conservación	10
6.2.3 Posibles alternativas y ejemplos de éxito en otras especies	11
6.3 La crioconservación:	14
6.3.1 Técnicas y alternativas de crioconservación	14
6.4 El caso de la vid: perspectiva histórica y de futuro.....	17
7. CONCLUSIÓN	27
8. BIBLIOGRAFÍA	27

1. RESUMEN

Las variedades de vid forman parte del patrimonio vitivinícola mundial, constituyendo una pieza fundamental para la mejora y el enriquecimiento de la cultura y la economía. En países como España es aún más evidente, donde la tradición, el clima y la superficie de cultivo hacen de la viticultura un factor clave para el desarrollo económico de muchas zonas. Actualmente, una de las grandes preocupaciones en el ámbito vitivinícola global es la pérdida de la variabilidad genética, conocida como erosión genética, que ha ido aumentando desde finales del siglo XIX con la llegada de enfermedades (filoxera, oídio y mildiu) desde América y que se ha acentuado en la segunda mitad del siglo XX con las subvenciones de arranque, el fomento del cultivo de variedades de interés económico en las denominaciones de origen o el cambio climático. En esta revisión bibliográfica se pretende estudiar cómo las técnicas de cultivo "*in vitro*", ya utilizadas sobre otras plantas leñosas, pueden reducir la erosión genética en la vid.

Palabras clave: *vid, conservación "in situ", conservación "ex situ", cultivo "in vitro", germoplasma, bancos de germoplasma, crioconservación, meristemos apicales.*

ABSTRACT

Vine varieties are an essential part of the world's wine heritage what constitutes a key element in the improvement and enrichment of culture and economy. This is even more evident in countries such as Spain where tradition, climate and surface area of cultivation make viticulture a key factor in the economic development of many rural areas. Currently, one of the major concerns in the global wine industry is the loss of genetic variability, known as genetic erosion, which has been increasing since the late nineteenth century with the arrival of diseases (phylloxera, oidium and mildew) from America and has been accentuated in the second half of the twentieth century with grubbing subsidies, the promotion of the cultivation of varieties of economic interest in the Apellations of origin or climate change. This bibliographical review aims to study how "*in vitro*" cultivation techniques, already used on other woody plants, can reduce genetic erosion in vine.

2. INTRODUCCIÓN

La vid (*Vitis vinifera* L.) es una planta que se propaga de forma vegetativa y cuyo cultivo se extiende entre los paralelos 50° LN y 40°LS. Su producción va destinada principalmente a la elaboración de vino, seguido de la producción de uva de mesa según la O.I.V. A nivel mundial en el 2018 se cultivaron 7,4 millones de hectáreas de viñedo, que produjeron 78 millones de toneladas de uva. Restando las uvas destinadas al consumo en fresco y a la producción de pasas se obtuvieron 292 millones de hectolitros de vino. Es de gran importancia destacar que a pesar de que la superficie de viñedo haya disminuido ligeramente durante los últimos años y que el volumen de producción se mantenga prácticamente constante, su valor en el mercado internacional ha aumentado notablemente hasta llegar alcanzar los 30 billones de €.

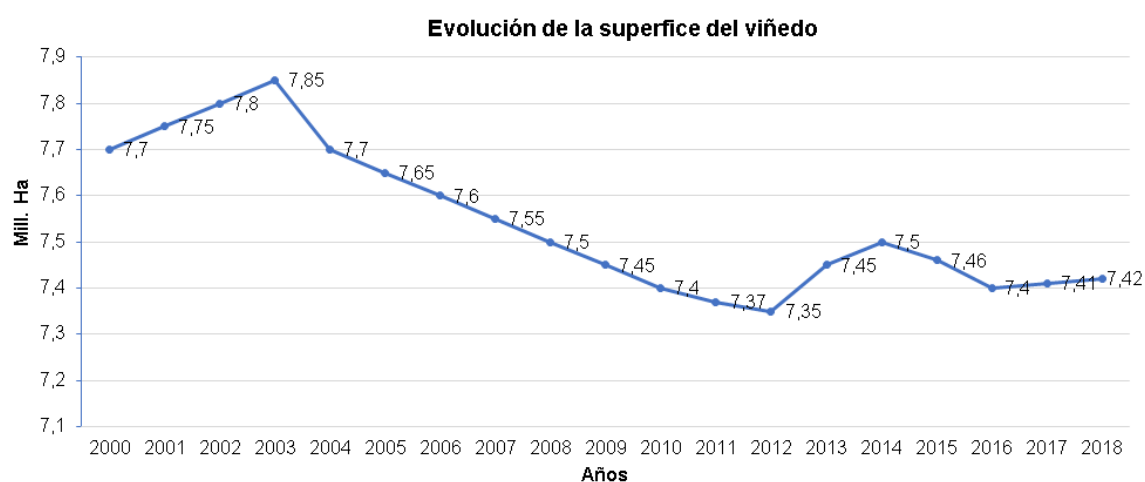


Fig. 1. Evolución de la superficie mundial de viñedo (en millones de hectáreas) y el valor en el mercado internacional (en billones de euros). (Fuente: OIV *Statistical report on World Vitiviniculture, 2018*)

Genéticamente *Vitis vinifera* L. es una especie del género *Vitis* perteneciente al subgénero *Euvitis* que posee una dotación cromosómica de $2n=38$ (Xu & Lu *et al.*, 2004; Chu *et al.*, 2018).

La vid cultivada (*V. vinifera subsp. vinifera*), ha sido domesticada a partir de su pariente silvestre y dioica, *V. vinifera subsp. sylvestris*. El acervo genético de las vides actuales se ha formado por la acción de la hibridación espontánea, la variación somática, la selección y la propagación a través de esquejes o semillas. El uso durante la domesticación y la selección de los progenitores más interesantes favoreció la aparición de grupos de variedades afines (Myles *et al.*, 2011; Zinelabidine *et al.*, 2015; Laucou *et al.*, 2018).

Actualmente estamos destinados a la imposición de la uniformidad en vez de la diversidad ocasionando una pérdida de biodiversidad causada por la destrucción de los hábitats, por la selección natural y por los agentes bióticos que se conoce como erosión genética (Álvarez *et al.*, 2000).

En la viticultura, con la llegada en el siglo XIX de vides desde América trajeron enfermedades como la filoxera (*Phylloxera vastatrix*) y otros patógenos como el oídio (*Erysiphe necator*) y el mildiu (*Plasmopara viticola*), que supuso la pérdida de gran parte del viñedo y de la diversidad, que en el siglo XX esta pérdida se agrandó debido a la tendencia de plantar viñedos con variedades de interés económico y con el abandono de viñedos situados en zonas donde se cultivaban variedades locales (Pouget *et al.*, 1990).

Según datos obtenidos de la OIV, el cultivo de la vid alcanzó su máxima extensión entre los años 1975-1980 con una superficie de 10.213.000 ha., a partir de aquí debido a las políticas de arranques y los intereses económicos se suprimieron muchas hectáreas de viñedo llegando a contar con 7.877.700 ha en los inicios del siglo XXI. A día de hoy, los datos más recientes indican una estabilización de las superficies de viñedo, contando con 7.429.000 ha registradas en 2018.

Otro de los factores que favorece a la pérdida de la diversidad es el cambio climático. Según los datos climáticos a escala global de los últimos 50 años, revelan un incremento en las 10 principales regiones vitivinícolas del mundo de 1,26 °C de la temperatura media, este incremento puede influir en la producción y en la calidad de la uva, este incremento también puede ocasionar un mayor riesgo de plagas y enfermedades (Fraga *et al.*, 2013).

Temperatura media mundial en relación al promedio 1981-2010

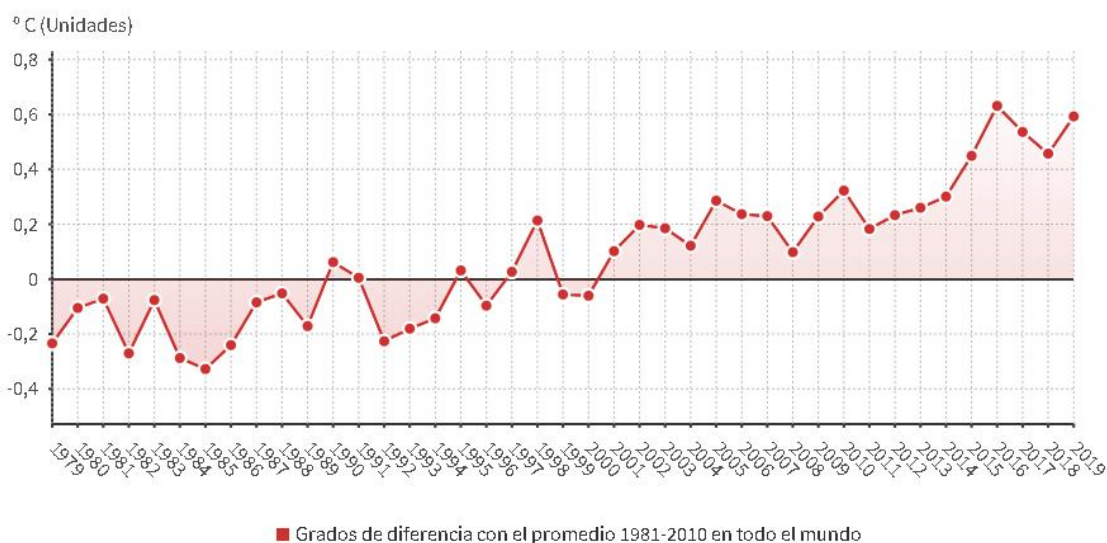


Fig. 2. Gráfica de la temperatura media mundial en relación al promedio 1981-2010 (Fuente: Servicios de cambio climático de Copérnico, epdata).

A nivel mundial, se prevén importantes daños en los viñedos, aunque serán muy diferentes en función de la localización geográfica y de las variedades que se utilicen. Hasta mediados del siglo XXI se esperan incrementos de 0,42 °C por década en las regiones vitivinícolas de Francia, Italia y España entre muchas otras que llevarán a una disminución de las áreas óptimas para el cultivo de la vid entre un 25 y 73% (Hannah *et al.*, 2013).

En Europa, este incremento de la temperatura ya ha producido en regiones vitivinícolas como la situada en la cuenca Mediterránea un adelanto de la brotación, del envero, de la maduración o un adelanto de la vendimia entre muchas otras cosas (Davis *et al.*, 2000).

En España, los principales problemas se producirán en las zonas vitícolas más cálidas, el calentamiento global podría causar la modificación de las zonas óptimas para el cultivo de la vid, incrementaría la evapotranspiración y haría que el riego fuera imprescindible para mantener el viñedo (Resco *et al.*, 2012). Como consecuencia de las altas temperaturas la producción sería irregular teniendo efectos negativos en la calidad, al ocasionar una concentración elevada de azúcares en la uva (Fraga *et al.*, 2013).

3. JUSTIFICACIÓN

En consecuencia a los grandes cambios que ha tenido el cultivo de la vid a lo largo de su historia y dada su gran importancia a nivel mundial, se deben buscar formas de conservar su material genético para así evitar a la grave pérdida de diversidad que está sufriendo.

A finales del siglo XIX, debido a la introducción en Europa de la filoxera, proveniente de América, estaba ocurriendo una importante pérdida de material vegetal arrasando con millones de hectáreas por culpa del ataque del insecto citado, Por esto, para evitar la fuerte erosión genética se crean los primeros Bancos de Germoplasma de vid, siendo una de las estrategias que contribuye a la conservación y multiplicación de variedades autóctonas de vid en Europa y también en España.

Actualmente el problema viene por las nuevas plantaciones, que se están realizando principalmente con variedades de interés económico o con plantas procedentes de selección clonal que poseen muy poca variabilidad genética. Por tanto, en estos momentos el viñedo está sufriendo una erosión genética a nivel intravarietal, facilitando la pérdida de variedades locales que poseen poca superficie de cultivo y se encuentran en peligro de extinción.

A día de hoy, hay suficientes indicios de que el cultivo "*in vitro*" puede ser una buena opción para conservar la biodiversidad en plantas, pero hay poca experiencia en vid y los protocolos que hay están menos avanzados que en otras especies. Por consiguiente, nos ha parecido pertinente revisara la información disponible en vid y su viabilidad como sistema de conservación, basándonos en estudios con otras especies leñosas.

Este tipo de conocimiento permitirá desarrollar nuevas estrategias de conservación siendo más efectivas que las existentes con el fin de proteger a escala mundial el patrimonio inestimable que representan las variedades y especies de vid ante los riesgos cada vez más urgentes de erosión genética, de desaparición definitiva de genotipos originales y empobrecimiento global de la diversidad.

4. OBJETIVOS

El objetivo principal de esta revisión bibliográfica es el siguiente:

- Revisar las técnicas de conservación de germoplasma basados en el cultivo “*in vitro*” y discutir su viabilidad para la conservación de variedades y variantes de vid, a la luz de la experiencia en otras especies leñosas.

5. MÉTODOS Y MATERIALES

5.1 Búsqueda y recopilación de información

Esta revisión bibliográfica se ha elaborado utilizando buscadores de interés académicos como *Web of Science (WOS)*, *Web of Knowledge (WOK)*, *Dialnet plus*, *Uva Doc*, *Science Direct* o *Springer Link* entre otros, para luego realizar una selección de los artículos, tesis o libros teniendo en cuenta el factor de impacto, según la relevancia del autor/es así como del número de citas en las que aparecen en otros artículo o revisiones bibliográficas. Por último, también se ha tenido en cuenta la fecha de publicación del artículo, aunque este factor no es muy importante, en este caso se dispone de bastante información sobre el cultivo “*in vitro*” y toda ella es actual.

Los métodos utilizados para buscar y recopilar información han consistido en buscar las palabras claves (keywords) de este trabajo tanto en inglés como en español en los buscadores nombrados anteriormente, con el objetivo de hacer un filtro de búsqueda y así conseguir información acorde con el tema de esta revisión bibliográfica.

La selección de los artículos más importantes se ha realizado teniendo en cuenta los criterios nombrados anteriormente y en particular aquellos que trataban de los métodos de conservación “*in vitro*” de cualquier especie vegetal y en concreto los que especifiquen este tipo de conservación en la vid o en algunas de sus variedades.

Después de esta selección, se han utilizado algunas referencias relacionadas con las búsquedas realizadas, lo que ha resultado interesante para encontrar algunos documentos con información útil para complementar la búsqueda.

Otro método utilizado consistía en la búsqueda de los artículos más relacionados o de los autores más citados en la bibliografía dentro de los artículos ya seleccionados para recopilar cualquier tipo de información válida para facilitar el trabajo.

Una vez encontrada la información básica de esta revisión, se ha ido realizando búsquedas profundas sobre temas más concretos de algunos de los apartados de que se compone el trabajo con el fin de obtener información más precisa.

5.2 Elaboración de la revisión bibliográfica

Una vez recopilada la bibliografía disponible, he leído los abstracts de todas las referencias y las he agrupado en las siguientes categorías:

- Artículos sobre la vid y los problemas que le afectan a su cultivo
- Artículos generales sobre la conservación de germoplasma vegetal
- Artículos relacionados con la conservación “*in vitro*” y sus alternativas
- Artículos de métodos de conservación de vid y de otras especies con sus correspondientes ensayos

Así he definido los capítulos de la revisión en tres apartados que reflejan los aspectos que me han parecido más interesantes.

Esta revisión bibliográfica se ha realizado siguiendo las normas recogidas en el documento “Normas de Estilo y Formato de TFG Enología” así como en la nueva propuesta aprobada por la Junta de Centro y el Comité del Grado de Enología que entró en vigor en el curso 2018/2019, en formato de “Normas de Revisión bibliográfica para Enología”.

La mayoría de la información genérica sobre cultivo “*in vitro*” estaba recogida en artículos de entre 1990 y 2018, considerando que cuando la información está recogida en más de dos artículos, se opta por poner el más reciente o de mayor impacto.

6. ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO

6.1. Conservación de germoplasma vegetal:

6.1.1 Perspectiva histórica

La historia de la conservación de germoplasma vegetal comienza en el Neolítico, con el inicio de la agricultura y el sedentarismo que llevó a la necesidad de conservar recursos para así asegurar la disponibilidad en las distintas poblaciones de alimento.

En el siglo XX la actividad de conservar germoplasma vegetal aumento, a mediados de los años 70 debido a la sustitución de variedades primitivas por otras variedades de interés económico y nuevos cultivares supuso un problema para la diversidad vegetal que se fue agravando con el deterioro de los ecosistemas naturales por la actividad humana (Maxted *et al.*, 1997).

En la actualidad la conservación de recursos genéticos está aceptada como una responsabilidad social dentro del contexto de preservación de la biodiversidad (UNCED *et al.*, 1992).

Algunos de los principales hechos históricos y los responsables del desarrollo de esta técnica son: Cultivos de raíces de tomates (White *et al.*, 1934); tejidos de zanahorias (Gauthere *et al.*, 1934; Nobecourt & White *et al.*, 1934); embriones de tomates (P. G. Smith *et al.*, 1944); yemas (Ernest. A. Bola *et al.*, 1946); granos de polen de orquídeas (Tulecke *et al.*, 1953; Guha & Maheswari *et al.*, 1966).

6.1.2 Revisión de alternativas

La conservación es una técnica utilizada para la preservación, mantenimiento, estudio y utilización del acervo que representa la biodiversidad. La conservación se puede realizar de dos maneras distintas: “*in situ*” y “*ex situ*”, estos dos tipos

MÉTODOS DE CONSERVACIÓN DE LA VID MEDIANTE EL CULTIVO IN VITRO

de conservación son complementarios y garantizan la conservación de las distintas especies y sus poblaciones tanto a medio como a largo plazo.

Según el Convenio sobre la Diversidad Biológica firmado en río de Janeiro en el 1992, la conservación *“in situ”* se define como: *“conservación, mantenimiento y recuperación de poblaciones viables en sistemas dinámicos y evolutivos del hábitat original o, en el entorno en que hayan desarrollado sus características, generalmente en parques nacionales, reservas biológicas y reservas ecológicas”* y la conservación *“ex situ”* la define como: *“la conservación de muestras genéticamente representativas de las especies o cultivos, que se mantienen viables a través del tiempo, fuera de sus hábitats naturales o lugares de cultivo, en ambientes controlados y con el apoyo de tecnologías adecuadas”* (Frankel & Soulé *et al.*, 1992).

Tabla. 1. Tabla comparativa de las ventajas e inconvenientes entre la conservación *“in situ”* y la conservación *“ex situ”* (Elaboración propia).

	Ventajas	Inconvenientes
<i>“in situ”</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Es dinámica - Permite la evolución natural y el desarrollo de nuevas características genéticas y adaptaciones a los cambios ambientales - Permite la coevolución con otras especies formando variantes en los complejos genéticos que favorecen los procesos adaptativos 	<ul style="list-style-type: none"> - Vulnerabilidad a los diversos factores tanto antrópicos como naturales - Problemas en cuanto a la representatividad genética de las especies y a la concentración de biodiversidad que conservan - Problemas derivados de la fragmentación de los hábitats sugiriendo un aumento del número y la superficie de las áreas protegidas
<i>“ex situ”</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Facilita el conocimiento de las características anatómicas, fisiológicas y bioquímicas del material almacenado - Control directo sobre el material - Fácil accesibilidad y disponibilidad 	<ul style="list-style-type: none"> - Alto coste y mantenimiento - Se elimina la selección natural - Hay limitación de espacio por lo que hay poca representatividad

Dentro de la conservación *“ex situ”* hay dos tipos de alternativas: las colecciones de plantas y los bancos de conservación de germoplasma.

Las colecciones de plantas forman el método tradicional de conservación *“ex situ”* de recursos, esta alternativa esta formada por los jardines botánicos y las colecciones de plantas. Los jardines botánicos se pueden considerar como las primeras instituciones implicadas en la conservación *“ex situ”* de recursos vegetales. Actualmente hay cerca de 2.000 jardines botánicos por el mundo, en los que se conservan alrededor de 100.000 especies distintas de plantas vasculares y de especies de interés económico (Wyse Jackson & Sutherland *et al.*, 2000).

Por otra parte, los bancos de germoplasma son espacios dedicados al almacenamiento de una fracción representativa de la variabilidad genética de determinadas especies, normalmente se utilizan para la conservación de especies raras o en peligro de extinción. Dentro de esta alternativa se encuentran distintos tipos de bancos, como son los bancos de semillas, los bancos de polen y los bancos de ADN (Iriondo Alegría *et al.*, 2001).

Los bancos de semillas son uno de los procedimientos de conservación “*ex situ*” más extendidos en la actualidad debido a su gran utilidad en plantas que se propagan mediante semillas ortodoxas y no recalcitrantes, de origen sexual. (Bacchetta *et al.*, 2008).

Se entienden que las semillas son ortodoxas cuando mantienen su viabilidad conservadas a menos de 5-10% de contenido en humedad, siendo así un material adecuado para el almacenamiento a largo plazo en bancos de conservación. Por el contrario, las semillas recalcitrantes pierden la viabilidad cuando se desecan por debajo de un contenido mínimo de humedad, de modo que no pueden ser objeto de conservación como tales en bancos de semillas (Chin & Roberts *et al.*, 1980).

Si bien la conservación “*ex situ*” en bancos de semillas es una de las alternativa más utilizada, en ciertas especies, entre las que se encuentra la vid, hay diversos casos en los que la conservación de semillas no está recomendada.

Dentro de la conservación “*ex situ*” en bancos de cultivo “*in vitro*” hay otras técnicas de conservación, como el crecimiento mínimo, la criopreservación y la embriogénesis somática, que se explicarán en el apartado 5.2 “El cultivo “*in vitro*” y su potencial en conservación de germoplasma”.

Debido a la evolución de las técnicas de ingeniería genética, hay una nueva alternativa de conservación “*ex situ*” que se está empezando a utilizar, la instalación de bancos de ADN. Esta alternativa es solo útil en especies o géneros en las que su genoma ha sido estudiado y donde se conocen las secuencias de numerosos genes. Sin embargo, en un futuro este tipo de bancos serán más utilizados según se vayan perfeccionando las técnicas de ingeniería (Iriando Alegría *et al.*, 2001).

Los bancos de polen y los bancos de yemas son otras dos alternativas de conservación que se pueden aplicar en la conservación de especies raras o en peligro de extinción. La ventaja de los bancos de polen, es que requieren un espacio mínimo y se pueden aplicar tanto a especies con semillas ortodoxas como con semillas recalcitrantes. Sin embargo, entre sus inconvenientes se pueden citar: que solo conservan la mitad del genoma y la necesidad de tener una colección de campo que proporcione flores femeninas para poder realizar una propagación convencional (Wang *et al.*, 1993). Los bancos de yemas vegetativas se utilizan en la conservación de clones de especies frutales, pero también se podría ser utilizada en especies arbustivas o arbóreas en peligro de extinción.

6.2 El cultivo “*in vitro*” y su potencial en conservación de germoplasma

6.2.1 Panorámica

La historia del cultivo de tejidos comenzó en 1838, con la teoría celular básica enunciada por los investigadores Schleiden y Schwann, en la que explicaban la autonomía que presenta la célula formulando así la teoría de la totipotencia, su teoría que fue el inicio del cultivo de tejidos y células. En 1853 Trécul realizó ensayos de cicatrización de heridas y formación de callo en distintas especies

vegetales. Reehinger (1893) realizó un ensayo en el que determinó el límite de la divisibilidad de las plantas, lo que supuso una aproximación al cultivo de tejidos.

Haberlandt fue el primero en realizar el cultivo "*in vitro*" de tejidos vegetales en 1902, en sus ensayos utilizó células aisladas, pero fracasó al no ser capaz de mantener vivos los tejidos. Más tarde, Simon (1908) observó el crecimiento de segmentos de tallo de álamo, que produjeron callos, raíces y yemas, pero al no ser asépticos los cultivos sus resultados no se tuvieron en cuenta. White (1934) consiguió cultivar con éxito "*in vitro*", ápices radiculares de tomate y tejidos tumorales de tabaco. Gautheret (1939) realizó el cultivo "*in vitro*" de cambium de diferentes especies utilizando diferentes factores de crecimiento. De este modo, utilizando raíces de zanahorias obtuvo un cultivo indefinido de tejidos vegetales, lo que supuso el primer cultivo de tejidos auténtico.

Por primera vez en 1944, el investigador Morell logró con grandes resultados el cultivo "*in vitro*" de tejidos de cambium de vid.

En la segunda mitad del siglo XX, las investigaciones se aceleraron considerablemente. A partir de los años 50, el desarrollo de este campo ha evolucionado rápidamente con grandes resultados para la agricultura, la silvicultura y la horticultura (Pierik et al., 1990).

6.2.2 Potencial del cultivo "*in vitro*" como sistema de conservación

La conservación "*in vitro*" se define como, la conservación del material vegetal que involucra el cultivo de tejidos, para un mantenimiento prolongado y un almacenamiento de recursos cultivados "*in vitro*", utilizando procesos que suponen la disminución o el cese de la división celular, sin causar daño bajo unas condiciones controladas (Bhojwani & Dantu et al., 2013).

La conservación "*in vitro*" surge de la necesidad de solucionar los problemas ocasionados por la conservación "*in situ*" y "*ex situ*" y también para crear copias de colecciones conservadas in vivo (Becerrill et al., 2010; Bhojwani & Dantu et al., 2013). En el 2011 Engelmann y Pence propusieron una serie de razones en las que se deben emplear las técnicas de conservación in vitro:

- 1) Algunas plantas no producen semillas y se reproducen vegetativamente.
- 2) Algunas especies generan genotipos estériles o genotipos, que aunque generan semillas ortodoxas, éstas son altamente heterocigotas, por lo cual es preferible conservarlas como clones.
- 3) Especies frutales y forestales tropicales que, generalmente, producen semillas recalcitrantes.
- 4) La conservación de especies con semillas recalcitrantes es aún problemática.

Entre sus principales ventajas destaca la obtención de materia libre de virus, la alta tasa de multiplicación, el bajo costo de producción o la necesidad de un espacio pequeño de almacenamiento entre muchas otras. Sin embargo, los mayor inconvenientes, son que hay que mantener un ambiente de asepsia para evitar contaminaciones, se necesita de operarios cualificados y que el material

conservado puede estropearse con cualquier tipo de alteración (Mohan *et al.*, 2011; Iriondo *et al.*, 2011). En consecuencia, cualquier especie que se esté conservando “*in vitro*” debe ser revisada periódicamente y a ser evitar los ciclos largos para no favorecer las variaciones somaclonales.

El cultivo “*in vitro*” ha facilitado el progreso en varios campos, por lo que hay una bibliografía muy abundante de las distintas aplicaciones, entre las que podemos destacar las siguientes: la producción en horticultura, erradicación de enfermedades originadas por virus (Galzy *et al.*, 1964), selección y mejora genética de plantas (Skene *et al.*, 1974), preservación del germoplasma (Blaich *et al.*, 1985), propagación vegetativa (Barlass & Skene *et al.*, 1978) y selección de clones resistentes a enfermedades y estrés (Hazel *et al.*, 1994).

6.2.3 Posibles alternativas y ejemplos de éxito en otras especies

Los métodos de conservación “*in vitro*” se pueden agrupar en dos grandes categorías: una formada por aquellos métodos basados en el crecimiento mínimo o a corto plazo, que permiten la conservación del material a medio plazo entre los que destacan la frigoconservación y la encapsulación, y otra formada por aquellos métodos basados en la crioconservación, los cuales permiten la conservación del material vegetal a largo plazo (Llácer & Badenes *et al.*, 2010; Bhojwani & Dantu *et al.*, 2013).

En la conservación de germoplasma el método de crecimiento mínimo ha sido muy utilizado Este método es muy sencillo y puede ser establecido con facilidad con el equipamiento que normalmente existe en un laboratorio de cultivo de tejidos. El principal objetivo de este método es el de incrementar la longevidad “*in vitro* de los cultivos sin que exista el riesgo de producirse cambios genéticos (Roca *et al.*, 1994).

Dependiendo de la temperatura, la intensidad de la luz o la adición de compuestos osmóticos al medio como la sacarosa o el manito y/o la adición de compuestos retardantes del crecimiento, los porcentajes de crecimiento puede verse afectada. La edad, el tamaño o el estado fisiológico del material a conservar puede afectar al tiempo de almacenamiento, por lo que se deben definir estos factores para cada especie (Ozudogru *et al.*, 2010). Por esto, algunas de las estrategias empleadas para limitar el crecimiento y aumentar los periodos entre subcultivos, consisten en la reducción de la temperatura combinada con poca intensidad de luz en la cámara de crecimiento (Bhojwani & Dantu *et al.*, 2013).

Otras estrategias consisten en cambiar la composición del medio de cultivo utilizando inhibidores del crecimiento, con el objetivo de limitar el crecimiento, o también la adición de agentes osmóticos anteriormente comentados con el objetivo de disminuir el potencial osmótico del medio para conseguir una deshidratación de los tejidos para que puedan soportar mejor las bajas temperaturas. Los agentes osmóticos y los retardantes de crecimiento como ancimidol o ABA se pueden combinar con las bajas temperaturas para minimizar el crecimiento y desarrollo de los cultivos conservados (Bhojwani & Dantu *et al.*, 2013).

MÉTODOS DE CONSERVACIÓN DE LA VID MEDIANTE EL CULTIVO IN VITRO

La frigoconservación es un método de conservación “in vitro” a medio plazo, que mediante el uso de bajas temperaturas se consigue ralentizar el crecimiento de las plantas (Xia et al., 2009).

Otras de las técnicas de conservación es la encapsulación, esta surgió con la idea de crear semillas sintéticas para el desarrollo de embriones somáticos y así protegerlos durante su transporte y manipulación. La encapsulación puede ser muy útil en micropropagación, puede ser empleada para la conservación de germoplasma o como un método para reducir el subcultivo del material durante un periodo de tiempo, ya que las secciones encapsuladas a bajas temperaturas no requieren la transferencia a medio fresco (Preece & West et al., 2009).

En cuanto al empleo de la encapsulación para la conservación del material a baja temperatura, se han realizado ensayos en distintas especies, algunos de los más importantes se muestran en la Tabla. 2. “Condiciones de los experimentos de encapsulación y conservación a corto plazo en distintas especies”.

Tabla. 2. Condiciones de los experimentos de encapsulación y conservación a corto plazo en distintas especies (Fuente: Cabello Moreno, Borja 2016).

Especie	Explantos	Alginato	CaCl ₂	Matriz	Tiempo	Temp	Viabilidad	Autor
<i>Cedrela fissilis</i>	s.a.	4%	100mM	MS	6 meses	25 °C	44%	Nunes et al., 2003
<i>Dalbergia sisoo</i>	s.n.	3%	75mM	MS	3 meses	4 °C	30%	Chand y Singh, 2004
<i>Drimiopsis kirkii</i> Baker.	Tejido embriogénico	2.5%	75mM	MS	6 meses	15 °C	15%	Haque y Ghosh, 2014
Eucalipto	s.n.	3%	75mM	azúcar 3mM	3 meses	10 °C	47%	Watt et al., 2000
Fresa	s.a.	3%	75mM	MS	9 meses	4 °C	58%	Lisek y Orlikowska, 2004
Frambuesa	s.a.	3%	75mM	Boxus	9 meses	4 °C	60%	Lisek y Orlikowska, 2004
Granado	s.n.	3%	100mM	MS	1 mes	4 °C	51%	Naik y Chand, 2006
Guayaba	s.n.	3%	100mM	MS + Sac	1 mes	4 °C	25%	Rai et al., 2008a
<i>Hemidesmus indicus</i>	Tejido embriogénico	3%	75mM	MS	4 meses	5 °C	86%	Cheruvathur y Najeeb, 2013
<i>Hibiscus moscheutos</i>	s.n.	2,75%	50mM	DKW	6 meses	5 °C oscuridad	80%	Preece y West, 2009
<i>Morus spp</i>	s.n.	4%	75mM	MS	3 meses	4 °C	13-18%	Pattniak y Chand, 2000
Olivo	s.n.	2,50%	1,10%	OMM	1 mes	4 °C	100%	Micheli et al., 2007b
Olivo	s.n.	2,50%	1,10%	OMM	2 meses	4 °C	60%	Ikhlaq et al., 2010
<i>Phyllanthus amarus</i>	s.n.	3%	75mM	MS	2 meses	4 °C	47%	Singh et al., 2006
<i>Populus</i>	s.n.	4%	1,40%	MS	1 mes	24 °C	100%	Tsvetkov et al., 2006
Roble	s.n.	4%	1,40%	GD	1 mes	4 °C	95%	Tsvetkov y Hausman, 2005
<i>Solanum Nigrum</i>	s.n.	3%	100mM	MS	2 meses	4 °C oscuridad	25%	Verma et al., 2010
<i>Vitex negundo</i>	s.n.	3%	100mM	MS	2 meses	4 °C	50%	Ahmad y Anis, 2010

Por otro lado para conservar ápices, polen, callos y suspensiones celulares se utiliza el método de conservación a largo plazo, este método garantiza la conservación de explantos durante periodos indefinidos y a la vez evita que en plantas con propagación vegetativa se produzcan variaciones somaclonales (Sánchez & Jiménez et al., 2010).

Para la conservación a largo plazo de células y tejidos vegetales se emplea la criopreservación, esta técnica consiste en conservar explantos vivos a bajas temperaturas, normalmente utilizando nitrógeno líquido (-196 °C), con el objetivo de paralizar la división celular y los procesos metabólicos, pero sin causar ningún tipo de daño. Por lo tanto, la criopreservación debe de evitar la formación de

MÉTODOS DE CONSERVACIÓN DE LA VID MEDIANTE EL CULTIVO IN VITRO

cristales de hielo que pueden causar la muerte celular (Hairai & Sakai *et al.*, 1999).

Dentro de la criopreservación se reconocen dos tipos de métodos:

- Los métodos convencionales o clásicos, más adecuados para criopreservar células y callos, y también utilizados para congelar meristemas apicales.
- La técnica de encapsulación-deshidratación y el método de vitrificación, que han resultado ser útiles para la criopreservación de ápices y embriones (González-Arno *et al.* 2009).

En la figura 3, se recoge esquemáticamente los distintos procedimientos para la realización de la conservación “in vitro”.

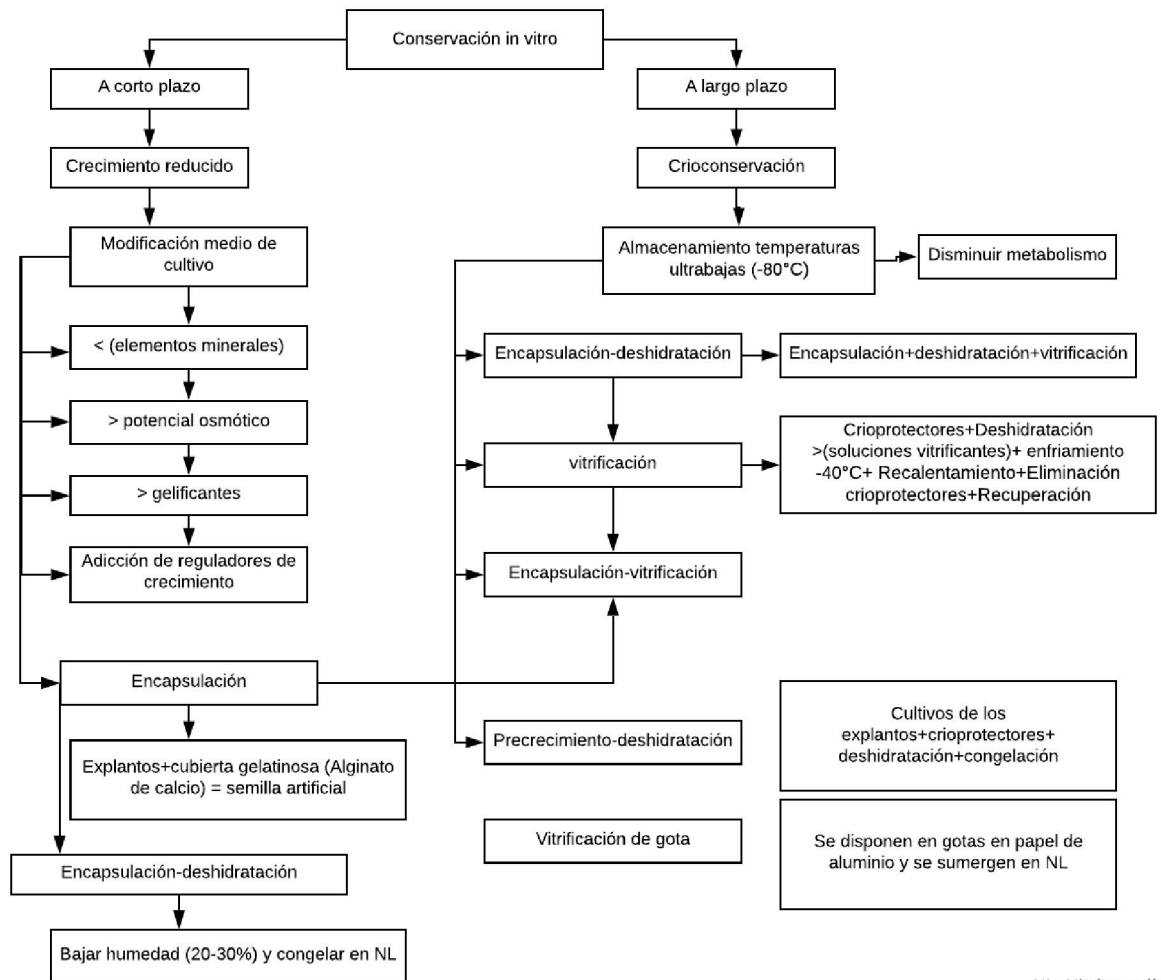


Fig. 3. Esquema resumen de la estrategia de conservación “in vitro” para los recursos filogenéticos (Fuente: *Conservación “in vitro”: Una perspectiva para el manejo de los recursos filogenéticos UNAD*)

Estos dos métodos han sido el punto de partida para la creación de nuevos protocolos criogénicos, como la encapsulación-deshidratación, la vitrificación, la encapsulación-vitrificación y la gota-vitrificación. Estos protocolos han contribuido en la mejora de los distintos tratamientos crioprotectores (Gámez-Pastrana *et al.*, 2004), en facilitar los procedimientos criogénicos (Yamamoto *et al.*, 2012) y, por último en el mayor uso de los bancos de germoplasma (Panis *et al.*, 2011).

Entre las especies crioconservadas se encuentran plátano (*Musa spp.*), yuca (*Manihot esculenta*), zarzamora (*Rubus*), pera (*Pyrus*), solanáceas, café (*Coffea arabica*), palma aceitera (*Elaeis Guineensis*), té (*Camellia sinensis*) (Mohan *et al.*, 2011), distintas especies de orquídeas (*Vanda pumila*, *Bletilla striata*, *Geodorum densiflorum*, *Doritaenopsis orchid*), el boniato (*Ipomoea batatas*) y el rábano (*Armoracia rusticata*) (Bunnag & Monthatong *et al.*, 2007). La crioconservación de semillas recalcitrantes ha resultado exitosa en cítricos como la naranja marga (*C. aurantifolia*) y la mandarina (*C. limonia*) (Normah & Reed *et al.*, 2011).

Otro de los métodos de conservación “*in vitro*” anteriormente nombrado es la embriogénesis somática. La embriogénesis somática, es un proceso que consiste en inducir embriones a partir de las células de los explantos (hojas, anteras, ovarios etc.) con el objetivo de formar un organismo completo. Por este método se ha conseguido la regeneración completa de *Vitis vinifera*, así como otras especies como *Aloe vera* (Gómez Kosky *et al.*, 1998).

6.3 La crioconservación:

6.3.1 Técnicas y alternativas de crioconservación

Gracias a todo lo explicado anteriormente, hoy disponemos de una gran cantidad de conocimientos, y de procedimientos criogénicos definidos para aplicar en la conservación. La combinación de algunos de estos procedimientos ha generado una mayor variedad de protocolos criogénicos, que resultan más adecuados dependiendo de la especie ya crioconservada utilizando otro protocolo, o incluso pueden garantizar la crioconservación en otras especies que no pudieron sobrevivir. Sin embargo, no es posible diseñar un protocolo criogénico único que funcione adecuadamente para todas las especies ni para una misma forma de cultivo “*in vitro*” (González-Arno *et al.*, 2013).

Todo lo anterior justifica que se hayan elaborado una serie de recomendaciones para la crioconservación de germoplasma vegetal como para la selección de los protocolos o métodos más adecuados para la crioconservación de diferentes formas de las plantas.

En las tablas.3 y .4 se muestran algunas de las recomendaciones para realizar una crioconservación óptima del germoplasma dependiendo de los métodos y protocolos que se apliquen.

Tabla. 3. Recomendaciones de uso de las distintas técnicas de conservación según el tipo de órgano o explanto para seleccionar un método adecuado (+) para su crioconservación. (Fuente: González-Arno, 2010).

Método	Susp. celulares y callos	Ápices	Embriones somáticos/cigóticos	Semillas
1. Protocolos convencionales	+++	+	-	-
2. Encapsulación-deshidratación	-	+++	++	-
3. Vitrificación y protocolos derivados: gota-vitrificación, encapsulación/vitrificación y crio-lámina	-	+++	++	-
4. Precultivo-desección	-	-	++	-
5. Desección	-	-	-	++

Tabla. 4. Algunas recomendaciones adicionales para la conservación adecuada de germoplasma vegetal (Elaboración propia).

Recomendaciones para la crioconservación de germoplasma vegetal	
Selección del material	Protección y crioconservación de germoplasma
La congelación de suspensiones celulares, las células deben tomarse cuando se encuentran en la fase exponencial de crecimiento	Los tratamientos con soluciones crioprotectoras muy concentradas son menos nocivos si se realizan a 0 °C
Para la congelación de callos y estructuras organizadas, el material generalmente se toma 15 días posteriores al último subcultivo en medio fresco	La descongelación rápida generalmente resulta más apropiada, sobre todo si el material no está suficientemente deshidratado
Los embriones cigóticos inmaduros y los somáticos (globular-torpedo-corazón) son más tolerantes a la congelación que a otras fases de desarrollo	La crioconservación de ápices de especies de propagación vegetativa asegura el mantenimiento de la estabilidad genética y la manipulación del material libre de virus; además, puede ser una estrategia apropiada para el saneamiento por crioterapia
El material proveniente de cultivos "in vitro" (ápices aislados de vitroplántas) es más homogéneo y permite estandarizar mejor las condiciones de crioconservación que el material obtenido de plantas in vivo.	Temperaturas muy superiores (por ejemplo, de entre -20 °C y -70 °C) a la temperatura del nitrógeno líquido (-196 °C) con el transcurso del tiempo provocan el deterioro del material biológico almacenado
En el caso de las especies de crecimiento lento (por ejemplo, algunas especies de orquídeas), lo importante es que el material de partida refleje un estado vigoroso.	Luego de la crioconservación, el material debe recuperarse en la oscuridad por al menos una semana, con el fin de evitar la fotooxidación

En el apartado "6.2.3 Posibles alternativas y ejemplos de éxito en otras especies" fueron nombrados los protocolos criogénicos, de estos los más utilizadas en la crioconservación, son la encapsulación-deshidratación, vitrificación y la gota-vitrificación.

La técnica de encapsulación-deshidratación se utilizó por primera vez en 1990 con el objetivo de crioconservar ápices de pera y patata (Fabre & Dereuddre *et al.*, 1990). Más tarde se utilizó para crioconservar ápices de yuca (Benson *et al.*, 1992), café (Mari *et al.*, 1995) y caña de azúcar (González-Arno *et al.*, 1993; Paulet *et al.*, 1993).

En la actualidad, se han probado distintos protocolos de encapsulación-deshidratación para más de 20 especies vegetales, obteniendo unos porcentajes

MÉTODOS DE CONSERVACIÓN DE LA VID MEDIANTE EL CULTIVO IN VITRO

de recuperación elevados después de sumergirles en nitrógeno líquido (González-Arno y Engelmann *et al.*, 2006).

Esta técnica consiste en introducir normalmente ápices o embriones en cubiertas de alginato, exponiéndolas a altas concentraciones de sacarosa y seguidamente desecarlas hasta reducir su contenido de humedad al 20-30%, para finalmente sumergirlas en nitrógeno líquido (Fabre & Dereuddre *et al.*, 1990).

La encapsulación-deshidratación es un método muy simple, se puede manipular una gran cantidad de tejidos encapsulados en cubiertas de alginato y que sustituye el uso de equipos de congelación por la inmersión en nitrógeno líquido, además no es necesario adicionar la solución crioprotectora como en otros protocolos criogénicos (González-Arno & Engelmann *et al.*, 2006).

El método de vitrificación se caracteriza por la fuerte deshidratación que sufre el material biológico al exponerse a mezclas crioprotectoras muy concentradas conocidas con la formulación de PVS.

En los procedimientos criogénicos que se utiliza PVS es necesario definir el tipo de PVS, la duración y la temperatura de la exposición. Para que los tejidos sean más tolerantes a la deshidratación con PVS y a la crioconservación, antes se realiza un tratamiento breve, conocido como tratamiento de carga, en el que se utiliza una mezcla de sacarosa-glicerol (Sakai & Engelmann *et al.*, 2007). El proceso de calentamiento y aclimatación del medio de cultivo se realiza siempre de forma rápida, para evitar una posible recristalización. Para lavar los crioprotectores se utiliza una solución compuestas por sales minerales y sacarosa (Sakai y Engelmann *et al.*, 2007).

En la figura. 4 se indica el procedimiento de crioconservación por vitrificación con todas sus fases.

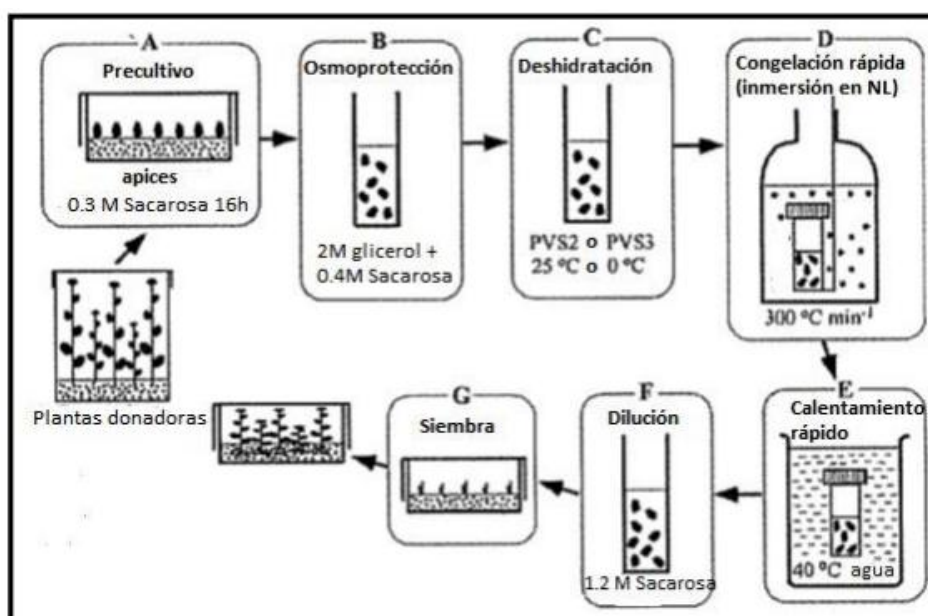


Fig. 4. Esquema representativo del método de crioconservación por vitrificación (Reed *et al.*, 2008).

Por último la gota-vitrificación, es un protocolo que combina las ventajas de los protocolos de gotas con la vitrificación y se diferencia de este procedimiento, en que se logra una velocidad muy rápida de enfriamiento y de calentamiento de las muestras, los tejidos se transfieren a una gota o a un volumen muy reducido de la solución vitrificadora colocada sobre una lámina de papel aluminio, para después sumergirlas en nitrógeno líquido. Esta técnica se considera una de las más prometedora para evitar las limitaciones de cada especie o del genotipo (Wang *et al.*, 2014).

Otros dos protocolos criogénicos que se utilizan menos son la encapsulación-vitrificación y el método de crio-lámina, estos parten de la base de encapsular los tejidos en cubiertas de alginato de calcio, pero con la diferencia de que en el método de encapsulación-vitrificación las cápsulas tienen forma esférica, mientras que en la técnica de la crio-lámina la encapsulación se realiza con una capa fina de alginato que gelifica sobre la superficie de una lámina de papel aluminio (Yamamoto *et al.*, 2011). Una característica común de las dos metodologías es que se logra reducir la duración del protocolo criogénico en comparación con el de la encapsulación-deshidratación (Yamamoto *et al.*, 2012).

6.4 El caso de la vid: perspectiva histórica y de futuro

En la vid, los esfuerzos principales de conservación de recursos genéticos se centran en variedades y clones de *Vitis vinifera*.

Sin embargo, la gran parte de otras especies del género *Vitis* también son importantes debido a que podrían jugar un papel de reserva natural de la diversidad genética en el área geográfica donde están presentes, o porque sus hábitats naturales se encuentran alterados por el hombre. Las formas primitivas silvestres de vid, han ido perdiendo sus hábitats naturales, debido a la acción humana sobre sus áreas de supervivencia. A estas pérdidas se añade otra referente a los cultivares y clones de las formas domesticadas, que ven cómo van siendo sustituidos por grupos con mejores características agronómicas (Boursiquot *et al.*, 1998).

Por estas razones, y para controlar el problema que supone la erosión genética, organismos como la F.A.O y la O.I.V, han reconocido las necesidades de crear colecciones o bancos de genes y vides cultivadas y silvestres (Pérez Ruiz *et al.*, 1990).

Actualmente los bancos genéticos de la vid consisten en colecciones en las cuales cada clon o variedad está representado por un número de 5-10 plantas por cada clon como ocurre en la colección de El Encín. Su puesta en cultivo y el seguimiento de estas colecciones debe realizarse en condiciones extremadamente rigurosas, teniendo en cuenta los factores climáticos o bióticos y su elevado coste (Ibáñez Torres *et al.*, 2004).

Para evitar estos inconvenientes de los bancos de planta viva y en campo y para garantizar un perfecto estado sanitario, de las variedades o de los clones obtenidos por selección genética. Actualmente laboratorios de cultivo "*in vitro*" de plantas como el IRTA está investigando las condiciones adecuadas que

permitan el establecimiento de colecciones “*in vitro*”. Dichas colecciones pueden establecerse empleando distintos métodos, como se explicó en el apartado “6.2.3 Posibles alternativas y ejemplos de éxito en otras especies”, siendo los más utilizados

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

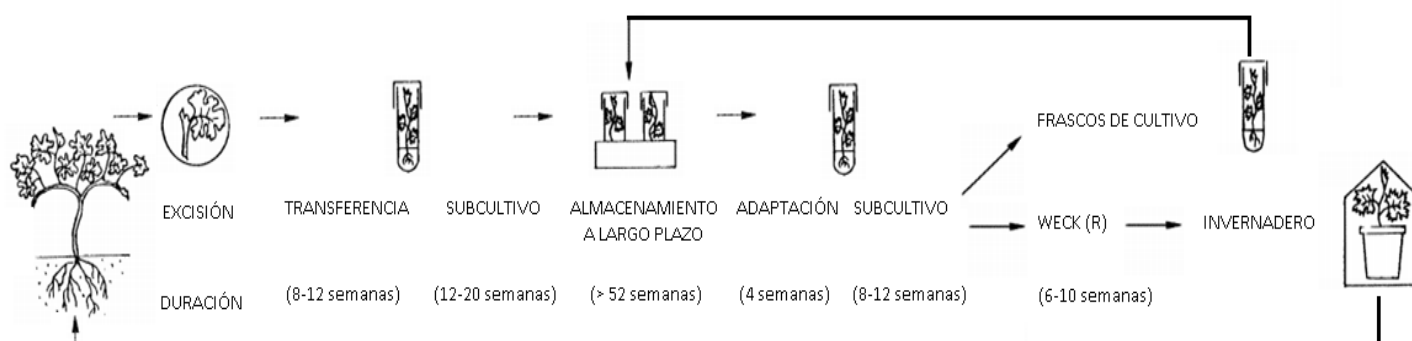


Fig. 5. Protocolos para la conservación “*in vitro*” de la vid mediante el método de limitación del crecimiento vegetal (Fuente:, M. Harst-Langenbucher & G. Alleweldt, 1990).

Efecto de la temperatura:

En el cultivo con limitación del crecimiento de la vid, caben destacar los trabajos en los que se utilizó la baja temperatura como factor limitante del crecimiento. A continuación, se recogen los trabajos más representativos de este tipo de ensayos:

Galzy, en numerosos ensayos (publicados en 1969, 1972 y 1985), conservó clones de *Vitis rupestris* que, cultivados a 9^o C y en oscuridad, que aguantaron durante 250 días sin necesidad de ser subcultivados. Aparentemente, el éxito de esta metodología depende del genotipo, ya que algunas variedades de *Vitis vinifera* no soportaron estas condiciones.

De hecho, los resultados de Barlass y Skene (1983), son contrarios a los de Galzy. En sus ensayos, la especie que peor soportó la conservación a 9^o C fue *Vitis rupestris*, con lo que se llegó a la conclusión de que las temperaturas óptimas de conservación pueden ser características de cada clon.

Otros estudios emblemáticos son los de Blaich (1985), quien conservó plantas de vid a temperaturas cercanas a los 7^o C, por lo que se redujo el crecimiento, pero se recuperó al transferir el cultivo a las condiciones utilizadas por Galzy en sus ensayos.

Pérez-Ruiz (1990), quien conservó plántulas de vid a 5^o C de temperatura y en oscuridad y haciendo subcultivos cada año, obtuvo una viabilidad de casi el 90% de los explantos.

Efecto de los inhibidores químicos del crecimiento:

Otro grupo de investigadores utilizaron inhibidores químicos del crecimiento, como Harst-Langenbucher y Alleweldt que fueron los primeros en usar inhibidores del crecimiento tipo CCC en vid (cloruro de clorocolina). Los cultivos “*in vitro*” de solo unos pocos cultivares mostraron una mejor tasa de supervivencia en condiciones de crecimiento reducido cuando se trataron con CCC. Sin embargo, después de un almacenamiento durante 1 año, estas plantas tratadas con CCC exhibieron una brotación más temprana y un desarrollo de brotes más rápido cuando fueron subcultivadas en medio fresco. En la tabla 5, se muestra la evolución del ensayo realizado por Harst-Langenbucher y Alleweldt.

Tabla 5. Tasa de supervivencia (%) de cultivos de *Vitis riparia* tratados con CCC durante diferentes periodos de almacenamiento respecto a un control no tratado (Fuente: Bourqui & Alleweldt, 1970).

Periodo de almacenamiento (meses)	Tasa de supervivencia (%)	
	Sin tratamiento	CCC
3	100	100
6	71	100
12	36	64

El principal inconveniente que tienen estos métodos es el de llevarlos a la práctica, ya que los resultados en cuanto a los porcentajes de supervivencia de las plantas, dependen mucho de la variedad que se utilice. Otros investigadores consideran que, con este tipo de conservación se puede tener el riesgo de multiplicar plantas que hayan sufrido variaciones morfológicas, y errores de manipulación en los subcultivos. No obstante, Skene (1988) demostró que el nivel alterado de ploidía, también descrito en este tipo de experimentos, no es debido a la conservación a largo plazo, sino por los sucesivos subcultivos (Ibáñez Torres *et al.*, 2004).

Sin embargo, la crioconservación de la vid es atractiva pero desafiante, ya que este tipo de metodología requiere de la adecuación de medios y condiciones de cultivo para evitar causar daños fisiológicos.

Los estudios pioneros fueron realizados por Parfitt y Almehdi en 1983, Ganeshan en 1985 y Ganeshan con la colaboración de Alexander en 1990, quienes informaron de la exitosa crioconservación del polen de la vid, sin embargo este experimento no resuelve el problema de la reproducción sexual. Más tarde en 1989 Ezawa, publicó por primera vez la crioconservación de los meristemos apicales, mucho más interesante por tratarse de órganos vegetativos. Otros trabajos utilizan la misma prometedora técnica: Esensee y Stushnoff en 1990 y Plessis en 1992, siendo esta una de las técnicas más prometedoras.

Unos años más tarde, en 1997, Moukadiri describió con éxito la crioconservación de líneas celulares embriogénicas, con el inconveniente de poder ser aplicada únicamente en variedades de vid que responden perfectamente a la embriogénesis somática. De hecho su principal finalidad es la de poder conservar las suspensiones que resultan difícil de obtener, sin perder su capacidad embriogénica (Ibáñez Torres *et al.*, 2004).

Hasta la fecha se han descrito nuevos procedimientos criogénicos para los meristemas apicales y las líneas de células embriogénicas de vid basados en la vitrificación, como la encapsulación-deshidratación, la vitrificación, la encapsulación-vitrificación y la gota-vitrificación (Engelmann *et al.*, 1997) descritas en el apartado “6.3.1 Técnicas y alternativas de crioconservación” Recientemente, también se ha descrito la crioterapia para la erradicación eficiente de los virus de la vid (Wang *et al.*, 2003; Marković *et al.*, 2015; Pathirana *et al.*, 2015; Bettoni *et al.*, 2016).

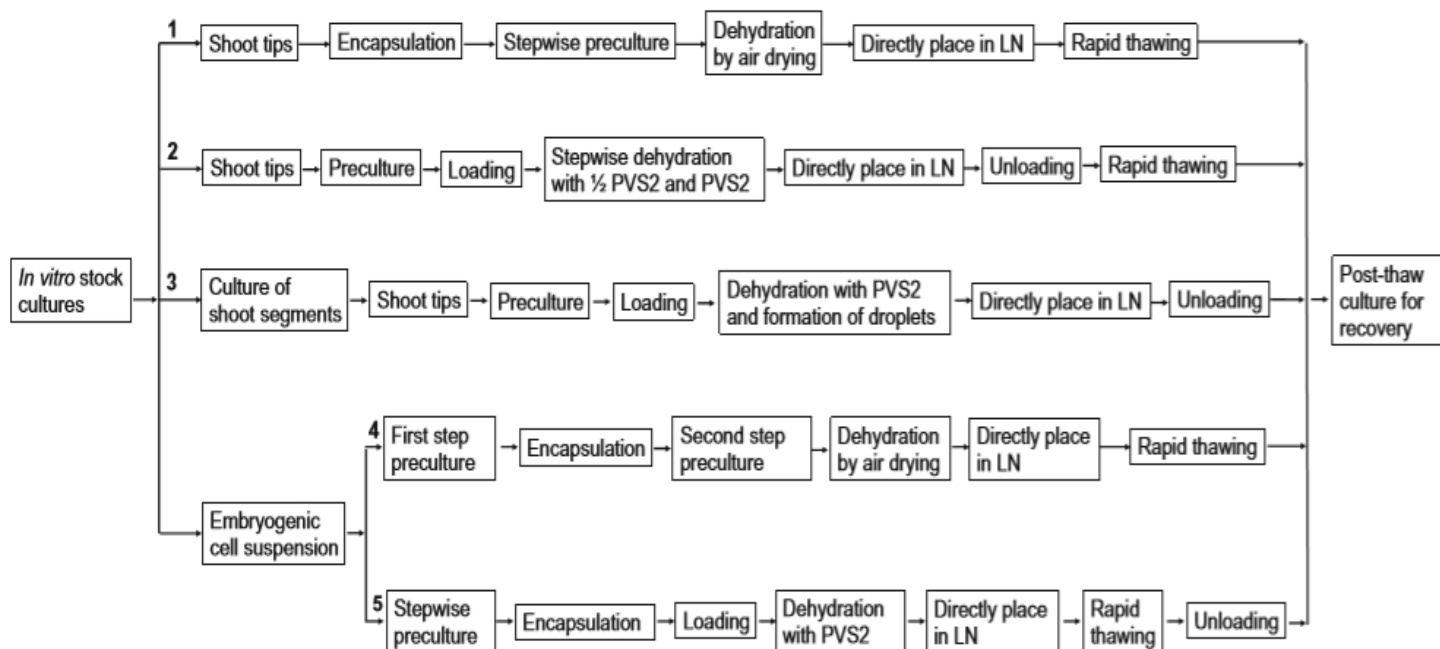


Fig. 6. Procedimientos criogénicos de meristemas apicales y las suspensiones de células embriogénicas en la vid: 1) encapsulación-deshidratación); 2) vitrificación; 3) gota-vitrificación; 4) encapsulación-deshidratación ;5) encapsulación-vitrificación. NL nitrógeno líquido, solución de vitrificación PVS2(Fuente: *in "in vitro" Cellular & Developmental Biology*, 2017).

Crioconservación de polen de vid:

Como ya he mencionado Parfitt & Almehdi (1983) fueron los pioneros en crioconservar con éxito el polen de las variedades Black champa y Queen mediante un proceso de enfriamiento en dos etapas, que también fue utilizado por Ganeshan (1985). En este proceso el polen, primero se congela y después se sumerge en nitrógeno líquido. Por último, se pone a germinar en un medio suplementado con sacarosa. En este protocolo, los porcentajes de germinación oscilaban entre el 54.7 y el 77.3%.

Crioconservación de semillas de vid:

Una de las técnicas más recientes que se han aplicado en la vid fue crioconservación de sus semillas. En 2013 Hassan informó de la crioconservación de semillas de vid recogidas de bayas maduras, que se deshidrataron antes de su inmersión en nitrógeno líquido. Las semillas posteriormente se descongelaron para sembrarlas en un sustrato mixto 1:1 formado de musgo de turba y arena y se mantuvieron en un invernadero para su germinación. En este protocolo las tasas de germinación oscilaban entre un el 50 y el 70% de germinación después de 4 semanas.

Estas dos técnicas de crioconservación son bastantes sencillas, pero no garantizan que la planta final que se produce sea genéticamente igual a la planta madre debido a su elevada heterocigosidad. El uso de meristemos apicales y de yemas latentes tomadas directamente de vides cultivadas en invernaderos o en el campo para su crioconservación evitaría el cultivo de tejidos “*in vitro*” para el establecimiento de cultivos de reservas antes y/o después de la regeneración de las plantas tras la crioconservación, simplificando así los procedimiento de crioconservación (Towill *et al.*, 2004).

Crioconservación de meristemos apicales de la vid:

En los primeros estudios sobre la crioconservación de los meristemos apicales de la vid se utilizó también un proceso de enfriamiento en dos etapas: Ezawa en su estudio en 1989, utilizó meristemos apicales de tres variedades de vid (Buffalo, Campbell early y Delaware) cultivadas en el campo para realizar sus ensayos de crioconservación. Los meristemos se trataron con una solución crioprotectora formada por Dimetilsulfóxido (DMSO) y sacarosa y se congelaron a distintas temperaturas (-20, -30 y -40⁰C), antes de sumergirlos en nitrógeno líquido para su crioconservación. Posteriormente, se descongelaron y se cultivaron para su recuperación y posterior desarrollo. En sus ensayos, recogió meristemos en distintos momentos del año y comprobó que el momento de la recogida afectaba de forma muy importante a su regeneración y desarrollo.

Así, cuando los meristemos se recolectaron en septiembre y se crioconservaron, cerca de la mitad de los meristemos de la variedad “Buffalo” y la mayoría de los de la variedad “Campbell early” congelados a -30⁰C no sobrevivieron y los que sobrevivieron a la congelación a -20 y -30⁰C volvieron a crecer lentamente y fallaron en la regeneración.

Los que fueron recogidos y crioconservados en noviembre, sobrevivieron en mucha mayor medida en ensayos de congelación previa a -20, -30 y -40⁰C: en las tres variedades probadas, los meristemos que se congelaron a -30⁰C se regeneraron rápidamente, mientras que los que se congelaron a -40⁰C sobrevivieron solo 1 mes y no pudieron desarrollarse. En la variedad “Campbell early”, la mayoría de los meristemos formaban solo callo pero sin ningún tipo de alargamiento.

Por último, respecto a los meristemos recogidos y crioconservados en diciembre, los de la variedad "Delaware" produjeron una recuperación similar independientemente de la temperatura de congelación, los de la variedad "Buffalo" congelados a -20°C crecieron lentamente comparados con los congelados a -30 y -40°C que tuvieron la tasa más alta de supervivencia después de 6, 12 y 18 meses; por último, la mayoría de los meristemos de la variedad "Campbell early" congelados previamente a distintas temperaturas solo formaron callos sin ningún tipo de alargamiento.

También la reducción de la humedad antes de la criogenización parece favorecer la supervivencia y regeneración de las plantas: Esensee y Stushnoff (1990) realizaron un proceso de crioconservación de las yemas latentes de las variedades "Valiant" y "Riesling" cultivadas en campo, las que se llevó a cabo una deshidratación parcial, hasta alcanzar un contenido del 18 o 25% de humedad antes de la inmersión en nitrógeno líquido. Con este protocolo algunas yemas crioconservadas de "Valiant" sobrevivieron cuando las muestras se secaron al 25%, mientras que las yemas secadas al 18% sobrevivieron todas. Sin embargo, las yemas de la variedad "Riesling" no sobrevivieron a la deshidratación previa a la crioconservación.

Plessis, en 1991 ensayó un método de encapsulación-deshidratación en dos etapas para la crioconservación de la variedad "Chardonnay": Los meristemos apicales se encapsularon en microesferas y luego se precultivaron por etapas con concentraciones crecientes de sacarosa. Las microesferas precultivadas se deshidrataron y luego se congelaron antes de la inmersión en nitrógeno líquido. Después de recuperar la temperatura inicial, las microesferas se transfieren a un medio básico (MB) para su recuperación. Se obtuvo alrededor de un 24% de supervivencia, resultando la inclusión de DMSO en el medio de precultivo beneficiosa para los porcentajes de supervivencia (Plessis *et al.*, 1993).

Otros ensayos de encapsulación-deshidratación para la crioconservación de meristemos utilizaron distintos agentes desecantes y/o encapsulantes. Wang (2000), aplicó un protocolo sobre el portainjerto "LN33" y la variedad "Superior". Los meristemos se extrajeron de brotes cultivados "*in vitro*" de 4 semanas de antigüedad y se encapsularon en microesferas utilizando una solución de alginato y una de cloruro de calcio. Las microesferas se precultivaron con concentraciones crecientes de sacarosa y luego se deshidrataron hasta un contenido del 15,6 y 17,6% de humedad antes de la inmersión directa en nitrógeno líquido. Después de descongelarse rápidamente los meristemos crioconservados se cultivaron para su regeneración en un medio de recuperación Murashige & Sakai (MS). Con estos parámetros optimizados se obtuvieron un 60 y un 40% de regeneración de los meristemos crioconservados para el portainjerto "LN33" y la variedad "Superior", respectivamente (Wang *et al.*, 2000).

Respecto a la vitrificación, los primeros en establecer un protocolo para la crioconservación de los meristemos de vid fueron Matsumoto y Sakai en el año 2000 y 2001. En su protocolo, los meristemos extraídos de plantas cultivadas "*in*

vitro” durante 4 y 5 meses, se precultivaron con sacarosa y luego se cargaron a una solución concentrada de sacarosa y glicerol, seguida de dos exposiciones a la PVS2 de distinta fuerza. Los meristemos se deshidrataron y se sumergieron en nitrógeno líquido para su crioconservación, después se descongelaron y se cultivaron para su regeneración en un medio de recuperación MS de fuerza media complementado con benciladenina (BA), este procedimiento se realizó en otras diez variedades de vid obteniéndose una regeneración media del 64%.

En lo que se refiere a la encapsulación-vitrificación, el primero en establecer un método para la crioconservación de meristemos apicales de vid fue Benelli en el 2003. En este protocolo, los brotes del portainjerto “Kober 5BB” se endurecieron en frío a una temperatura de 4°C y se extrajeron sus meristemos apicales. Posteriormente, estos se encapsularon en microesferas de alginato de sodio y, a continuación se expusieron a PVS2. Después de la crioconservación, los meristemos contenidos en microesferas se descongelaron y se cultivaron en medio específico para su regeneración, aunque las tasas de recuperación de estos fueron bajas (Benelli *et al.*, 2003).

Otra de las técnicas que se está utilizando en la crioconservación de los meristemos de vid es la gota-vitrificación. Hasta la fecha, se ha aplicado la gota-vitrificación en una serie de variedades de uva de mesa y de vinificación, portainjertos (Marković *et al.*, 2013-2015; Pathirana *et al.*, 2016; Bi *et al.*, 2018) y en germoplasma de vid silvestre (Carimi *et al.*, 2016; Bi *et al.*, 2017).

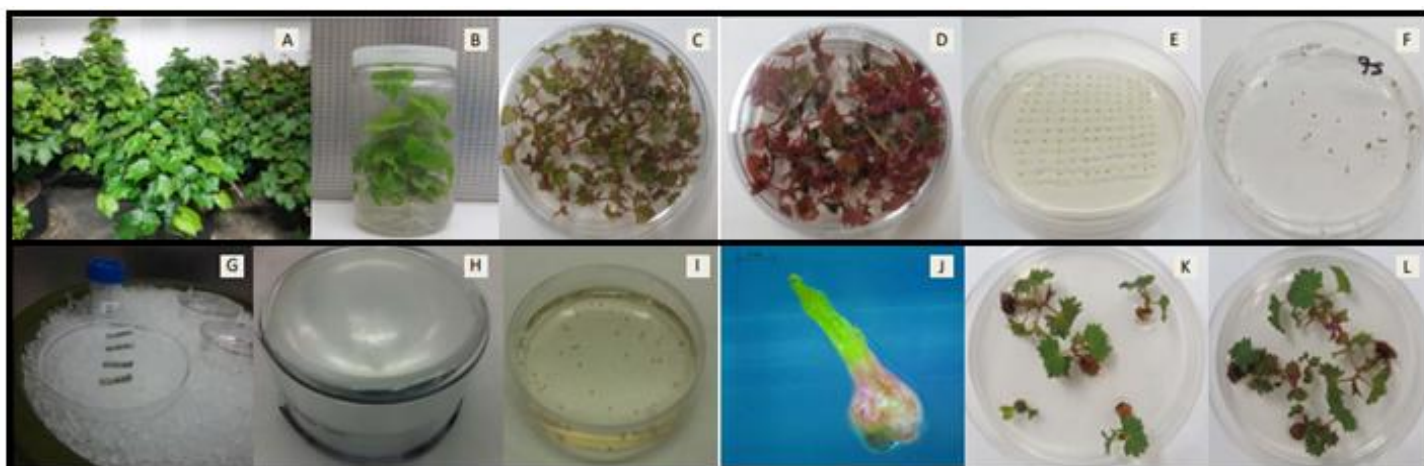


Fig. 7. Gota-vitrificación para los meristemos apicales de vides presentes en la cámara de crecimiento (A, C) o in vitro (B, D). Los meristemos apicales se incubaron en el medio de precultivo (E), la solución de carga y PVS2 de fuerza media a 22°C (F), seguido de PVS2 de fuerza completa a 0°C antes de colocarlas en tiras de papel de aluminio con unas gotas de PVS2 (G). A continuación se sumergieron en NL (H). Después de 1 h los meristemos apicales se calentaron en la solución de descarga a 22°C (I) y luego se transfirieron al medio de recuperación. Los meristemos apicales de 'Chardonnay' expuestos al NL se recuperaron durante 15 días (J) y 2 meses (K) y sin exposición al NL después de 2 meses de la regeneración (L) (Fuente: *Successful cryopreservation of Vitis vinifera 'Chardonnay' from both in vitro and growth chamber source plants, Acta horticulturae*, 2019).

Hassan y Haggag, informaron en 2013 de un protocolo de gota-vitrificación para la crioconservación de meristemos apicales de dos variedades de vid (Bez El-Anza y Black Matrouh). En su estudio, los meristemos se recogieron de vides cultivadas en invernaderos, primero se desinfectaron y luego se cultivaron en la oscuridad para identificar su estado sanitario. Los meristemos apicales se cargaron en una solución concentrada de sacarosa y glicerol seguidos a una primera exposición a PVS2 de fuerza media y luego a otra de PVS2 de fuerza completa. Después de la deshidratación con PVS2 y colocarlas en tiras de papel de aluminio para sumergirlas en nitrógeno líquido se descongelaron transfiriéndolas a una solución de descarga y se cultivaron para su regeneración. Se obtuvieron unas tasas de supervivencia del 47% para la variedad “Ben El-Anza” y un 40% para “Black Matrouh”.

Crioconservación de tejidos embriogénicos somáticos:

Por otro lado, en la crioconservación de la vid, también se han utilizado los tejidos embriogénicos somáticos. El primero en realizar estudios fue Dussert en el 1991. Su estudio consistía en un enfriamiento en dos etapas, se establecieron suspensiones celulares embriogénicas (SCE) a partir del callo que había sido inducido en el portainjerto “41B”. Las SCE se mezclaron con un medio que contenía maltosa y DMSO y se incubaron. En un proceso de enfriamiento en dos etapas las suspensiones celulares tratadas se congelaron previamente seguido de la inmersión en nitrógeno líquido. Después de una rápida descongelación, las SCE crioconservadas fueron cultivadas en un medio líquido para su recuperación.

El enfriamiento en dos etapas dio como resultado una tasa de recuperación del 63%, mientras que la congelación rápida no produjo ninguna recuperación, la adición de ácido naftalenacético (ANA) en el medio de subcultivo mejoró las tasa de regeneración de las SCE crioconservadas y permitió aplicar el protocolo a otras tres variedades de vid (Dussert *et al.*, 1992).

Wang en el 2002, describió la encapsulación-deshidratación para la crioconservación de las SCE de la variedad “Red globe”. El callo embriogénico se mantuvo en un medio sólido de mantenimiento compuesto por un medio NN (Nitsch & Nitsch *et al.*, 1969). Las SCE se precultivaron con distintas concentraciones de sacarosa y se encapsularon en microesferas.

Wang (2002), descubrió que las células crioconservadas regeneraban los embriones mucho antes y producían muchos más embriones en diversas etapas de desarrollo que las células del control, lo que indica que la exposición al nitrógeno líquido puede tener efectos selectivos en las células con mayor capacidad de diferenciación morfológica. De hecho, el análisis histológico demostró que sólo las células con características meristemáticas en indiferenciadas podían sobrevivir tras la crioconservación, mientras que todas las células diferenciadas morían o resultaban gravemente dañadas tras la exposición al nitrógeno líquido (Aguilar *et al.*, 1993; Häggman *et al.*, 1998; Mikula *et al.*, 2011).

Recientemente, la encapsulación-deshidratación descrita por Wang se extendió con éxito en la crioconservación de SCE de varias variedades de vid incluidas la "Albariño" y la "Tempranillo" con una recuperación del 19 y 27% respectivamente (González-Benito *et al.*, 2009), la variedad "Riesling" con aproximadamente un 60% y el portainjerto "110 Richter" con un 78% de recuperación (Ben-Amar *et al.*, 2013). Los embriones somáticos desarrollados en las SCE crioconservadas proliferaron y pudieron iniciar embriones secundarios después de cuatro semanas de transferencia en el mismo medio fresco, estos embriones secundarios se desarrollaron más, maduraron y finalmente se convirtieron en plantas enteras que eran morfológicamente y estructuralmente idénticas a las plantas madres.

Miaja en el 2004, informó de un protocolo de vitrificación para la crioconservación de embriones somáticos de dos variedades de vid (Brachetto y Müller-Thurgau), en su estudio los embriones somáticos se cultivaron en un medio NN y se cargaron en una solución concentrada que contenía sacarosa y glicerol. Las muestras se expusieron a PVS2 de fuerza completa antes de la inmersión en nitrógeno líquido. Tras una rápida descongelación los embriones crioconservados se cultivaron primero en un medio NN que contenía sacarosa y luego se transfirieron a otro medio NN complementado con ácido abscísico (ABA) y sacarosa, obteniéndose una tasa de recuperación de aproximadamente el 41% para la variedad "Brachetto" y del 79% en la variedad "Müller-Thurgau".

Cuando se intentó adoptar el protocolo de encapsulación-deshidratación para la crioconservación de embriones somáticos de otras especies de *Vitis*, se observaron bajas tasas de supervivencias, debido a esto, Wang en el 2004 describió la encapsulación-vitrificación para la crioconservación de SCE.

Las SCE se precultivaron con concentraciones crecientes de sacarosa, luego se suspendieron en un medio sólido de mantenimiento NN y se encapsularon en microesferas seguidas de una exposición de estas a PVS2 antes de la inmersión directa en nitrógeno líquido, la descongelación y el subcultivo fueron los mismos que los que descritos por Wang en el 2002.

Este protocolo de encapsulación-vitrificación se aplicó con éxito a dos portainjertos (110 Richter y 41B) y cuatro variedades de vid incluidas las uvas de mesa y vinificación con tasas de recuperación entre el 42 y el 48%.

Por último, otra técnica de conservación que se utiliza en vid es la embriogénesis somática, esta es la vía común de regeneración adventicia en vid y se utiliza en este cultivo con distintos fines como la selección de variación somoclinal en medios con distintos tipos de agentes estresantes o la introducción de genes por transformación genética (Saporta *et al.*, 2016).

Mullins y Srinivasan (1976) fueron los pioneros en usar la embriogénesis somática para la regeneración de plantas de vid sanas a partir de plantas infectadas de virus, posteriormente, se ha demostrado su eficiencia eliminando varios virus como los del grupo GLR (Grapevine Leafroll) y nepovirus, como el ArMV y el GFLV (Gambino *et al.*, 2009).

Tabla. 6. Tabla resumen de los procesos criogénicos con más éxito en distintas especies de *Vitis* (Fuente : *in In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 2017). Los número indican los medios de cultivo utilizados, los números entre paréntesis representan los porcentajes de supervivencia obtenidos en el estudio. De= Desecación, Drop-Vitri= Gota-vitrificación, En-Dehy= encapsulación-deshidratación, TSC= enfriamiento en dos etapas, Vitri= vitrificación, En-vitri= encapsulación-vitrificación, SET= tejido embriogénico somático, ECS= suspensión celular embriogénica, SE= embrión somático

Explant	Cryogenic procedure	Species, no. genotypes tested	Recovery, viability or germination (%) [#]	Reference
Pollen	TSC	<i>V. vinifera</i> , 21	24.8 (7.4–53.9)	Parfitt and Almehdī 1983
		<i>V. vinifera</i> , 5	54.7–77.3	Ganeshan 1985
		<i>V. vinifera</i> , 2	Not specified	Ganeshan and Alexander 1990
Shoot tips	TSC	<i>V. labrusca</i> , 3	96.7 (90–100)	Ezawa <i>et al.</i> 1989
		<i>V. vinifera</i> , 1	0	Esensee and Stushnoff 1990
	DE (directly immersed in LN)	<i>V. riparia</i> , 2	Some (not specified)-100	
		<i>V. amurensis</i> × <i>V. riparia</i> , 1	Some (not specified)	
	En-Dehy + TSC	<i>V. vinifera</i> , 4	29 (15–40)	Zhao <i>et al.</i> 2001
		<i>V. vinifera</i> , 4	36	Zhai <i>et al.</i> 2003
	En-Dehy	Data not available	Data not available	Plessis <i>et al.</i> 1991
		<i>V. vinifera</i> , 1	30	Plessis <i>et al.</i> 1993
		<i>V. vinifera</i> , 2	49 (40–58)	Wang <i>et al.</i> 2000
		<i>V. vinifera</i> , 1	63	Wang <i>et al.</i> 2003a
		<i>V. vinifera</i> , 1	62	Wang <i>et al.</i> 2003b
		<i>V. vinifera</i> , 1	59	Bayati <i>et al.</i> 2011
		<i>V. vinifera</i> , 1	37	Marković <i>et al.</i> 2013b
	En-Vitri	<i>V. berlandieri</i> × <i>V. riparia</i> , 1	Low (not specified)	Benelli <i>et al.</i> 2003
	Vitri	<i>V. vinifera</i> , 7	65.5 (33.3–86.7)	Matsumoto and Sakai 2003
		<i>V. berlandi</i> × <i>V. riparia</i> , 2	46.7 (30.0–63.3)	
		<i>V. mourvedre</i> × <i>V. rupestris</i> , 1	75	
		<i>V. coigneae</i> , 1	75	
		<i>V. vinifera</i> , 1	45	Wang <i>et al.</i> 2003a
		<i>V. vinifera</i> , 1	50	Wang <i>et al.</i> 2003b
<i>V. vinifera</i> , 1		55	Shatnawi <i>et al.</i> 2011	
<i>V. berlandieri</i> × <i>V. riparia</i> , 1		0	Ganino <i>et al.</i> 2012	
<i>V. vinifera</i> , 2		43 (40–46)	Hassan and Haggag 2013	
<i>V. vinifera</i> , 1		57	Lazo-Javalera <i>et al.</i> 2015	
<i>V. vinifera</i> , 1		55	Shatnawi <i>et al.</i> 2011	
<i>V. vinifera</i> , 1		45	Marković <i>et al.</i> 2012	
<i>V. vinifera</i> , 1		50	Marković <i>et al.</i> 2013b	
<i>V. vinifera</i> , 1		30	Marković <i>et al.</i> 2013a	
<i>V. vinifera</i> , 1		46	Marković <i>et al.</i> 2014a, b	
<i>V. vinifera</i> , 12		Not specified	Toprak <i>et al.</i> 2014	
<i>V. vinifera</i> , 9		23.1 (0–70)	Marković <i>et al.</i> 2015	
<i>V. vinifera</i> , 4	34.8 (24–45)	Pathirana <i>et al.</i> 2016		
SET	ECSs	<i>V. riparia</i> × <i>V. rupestris</i> , 1	26	
		<i>V. vinifera</i> × <i>V. berlandieri</i> , 1	6	
	TSC	<i>V. vinifera</i> , 6	50 (40–76)	Bi 2017
		<i>V. pseudoreticulata</i> , 2	30 (10–50)	
	En-Dehy + TSC	<i>V. vinifera</i> × <i>V. berlandieri</i> , 1	60	Dussert <i>et al.</i> 1991
		<i>V. vinifera</i> × <i>V. berlandieri</i> , 1	58	Dussert <i>et al.</i> 1992
	En-Dehy	<i>V. vinifera</i> , 1	50	
		<i>V. berlandieri</i> × <i>V. rupestris</i> , 1	25	Ben-Amar <i>et al.</i> 2013
	En-Dehy	<i>V. vinifera</i> , 2	17.5 (5–20)	
		<i>V. vinifera</i> , 1	78	Wang <i>et al.</i> 2002
EN-Vitri	<i>V. vinifera</i> , 2	23 (19–27)	González-Benito <i>et al.</i> 2009	
	<i>V. berlandieri</i> × <i>V. rupestris</i> , 1	78	Ben-Amar <i>et al.</i> 2013	
	<i>V. vinifera</i> , 2	51.5 (43–60)		
	<i>V. berlandieri</i> × <i>V. rupestris</i> , 1	76	Wang <i>et al.</i> 2004	
SEs	Vitri	<i>V. vinifera</i> , 4	61.8 (46–82)	
		<i>V. vinifera</i> × <i>V. berlandieri</i> , 1	42	
		<i>V. vinifera</i> , 3	48 (44–52)	Vasanth and Vivier 2011
Seeds	En-Dehy	<i>V. vinifera</i> , 2	60 (41–79)	Miaja <i>et al.</i> 2004
		<i>V. vinifera</i> , 2	55 (52–58)	Miaja <i>et al.</i> 2004
Seeds	DE (directly immersed in LN)	<i>V. vinifera</i> , 3	60 (50–70)	Hassan <i>et al.</i> 2013

7. CONCLUSIÓN

El cultivo “*in vitro*” ha contribuido mucho a la conservación y manipulación del germoplasma gracias a la gama de técnicas desarrolladas a lo largo de su historia. Se pueden adoptar diversos procedimientos caso por caso par numerosas especies, desde el almacenamiento hasta la crioconservación, mediante estrategias tanto tradicionales como biotecnológicas, pasando por la semillas o los tejidos vivos.

El éxito de la técnica depende en gran medida de la especie y sus características fisiológicas y también del control adecuado de las condiciones ambientales, éstas tienen un gran efecto tanto en la calidad de la conservación “*in vitro*” como en la micropropagación, así pues, deben adoptarse las condiciones de conservación del germoplasma que mejor se ajusten al objetivo previsto.

La crioconservación se ha considerado durante mucho tiempo un medio ideal para la conservación a largo plazo del germoplasma vegetal y recientemente se han establecidos protocolos según las necesidades de cada especies.

Aunque se han logrado algunos procesos en los últimos tres decenios, los estudios sobre la conservación de la vid están menos avanzados que en los cultivos de tubérculos, otros cultivos frutales y plantas ornamentales.

Como ya se ha descrito en los apartados anteriores, hay una serie de factores que influyen en el éxito de la conservación *in vitro* de las plantas. En la vid los principales son: i) las especies y genotipos implicados, ii) los cultivos y la procedencia de los explantos “*in vitro*”, iii) que se lleven a cabo los precultivos, la deshidratación, los diferentes procedimientos criogénicos, la duración de la crioconservación y el medio de subcultivo.

La falta de protocolos de crioconservación independientes de la especie o el genotipo ha sido un factor que ha limitado el establecimiento de protocolos de conservación *in vitro*. Así pues, un objetivo clave de la crioconservación es romper ese impedimento para ayudar a obtener protocolos adecuados para cada situación, especialmente para las especies en las que aún no se han estudiado.

8. BIBLIOGRAFÍA

Álvarez, C.V.; Souza, J. & Itten, B. (2000). *La biodiversidad y la gente*. CETAAR (Centro de Estudios Regionales sobre Tecnologías Apropriadadas de la Argentina).

Ayuso, P.; Peña-Iglesias, S. 1978. *Microinjerto de meristemas: una nueva y prometedora técnica para regenerar vides enfermas por virus*. VI Conferencia Internacional sobre Virus y Virosis de la vid. ICVG VIth Meeting 1976. Cordoba.

Bacchetta G., (2008). *Germplasm image analysis of Astragalus maritimus and A. verrucosus (subgen. Trimeniaeus)*. Jardín Botánico de Madrid.

Barlass, M.; Skene, K.G.M. 1978. “*in vitro*” propagation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) from fragmented shoot apices.

Becerril, J. M., M. J. Niclós, J. M. Becerril, M. P. Vega, F. N. Viñals y M. J. Niclós (2010). "Los recursos fitogenéticos en la mejora genética vegetal." En: *Mejora Genética y Recursos Fitogenéticos: Nuevos Avances en la Conservación y Utilización de los Recursos Fitogenéticos*.

Ben-Amar, A., Daldoul, S., Allel, D., Reustle, G., Milik, A. (2013). *Reliable encapsulation-based cryopreservation protocol for safe storage and recovery of grapevine embryogenic cell cultures*. *Sci Hortic*.

Bettoni, J.C., Costa, M.D., Gardin, J.P.P, Kretzshmar, A.A., Pathirana, R. (2016). *Cryotherapy: a new technique to obtain grapevine plants free of viruses*.

Bhojwani, S. S. y P. K. Dantu (2013). "Conservation of phytodiversity." En: *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*, S:S. Bhojwani y P. K. Dantu (eds). Springer, India.

Bi, W.L. (2017). *Cryopreservation of shoot tips of grapevine (Vitis spp.) and cryotherapy for eradication of grapevine leafroll-associated virus 3*. PhD tesis, Northwest A&F University, Yangling, China.

Blaich, R. 1985. *Recherches sur les cultures de méristèmes et d'organes de vigne "in vitro" en vue de la sélection et de la conservation de génotypes*. Bull. O.I.V.

Carimi, F., Carra, A., Panis, B., Pathirana, R. (2016) *Strategies for conservation of endangered wild grapevine (Vitis vinifera L. subsp. sylvestris (C.C.Gmel) Hegi)*. *Acta Hortic*.

Chu, Z.F.; Wen, J.; Yang, Y.P & Meng, Y. (2018). *Genome size variation and evolution in the grape family Vitaceae*. *J. of System. and Evol.*

Clemente, M., (1999). "in vitro" Culture (IVC) and Plant Conservation. En: *A Colour Atlas of Plant Propagation and Conservation*. Bowes, B.G. (ed.), Manson Publishing, London.

Engelmann, F. (1997). "in vitro" conservation methods. In: Callow JA, FordLloyd BV, Newbury HJ (eds) *Biotechnology and plant genetic resources: conservation and use, Biotechnology in Agriculture Series*.

Engelmann, F. (2011). *Use of biotechnologies for the conservation of plant Biodiversity*. "in vitro" Cell. Dev. Biol-Plant.

Fraga, H., Malheiro, A.C., Mountinho-Pereira, J. & Santos, J.A. (2013). *An overview of climate change impacts on European viticulture*. *Food and Energy Security*.

Galzy, R. (1964). *Observations sur les variations de l'état sanitaire à l'intérieur d'un clone de Vitis rupestris court-noué*.

Hairai, D. & Sakai (1999). *Cryopreservation of "in vitro" grown meristems of potato (Solanum tuberosum L.) by encapsulation-vitrification*. *Potato Res.*

Hall, A., Matthews, A.J. and Holzapfel, B.P. (2016). *Potential effect of atmospheric warming on grapevine phenology and post-harvest heat accumulation across a range of climates*. *Int. J. Biometeorol.*

Hannah, L., Roehrdanz, P., Ikegami, M., Shepard, A., Shaw, M., Tabo, G., Zhi, L., Marquet, P. and Hijmans, R. (2013). *Climate change, wine, and conservation*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.

Iriondo Alegría, J.M^a. (2001). *Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas (Revisión) Dpto. Biología Vegetal, E.U.I.T. Agrícola, Universidad Politécnica de Madrid.*

Jona, R.; Webb, J.K. (1978). *Callus and axillary-bud culture of Vitis vinifera "Sylvaner riesling".*

Jones, G.V., White, M.A., Cooper, O.R. and Storchmann, K. (2005). *Climate change and global wine quality. Climatic Change.*

Kovalchuk, I., Y. Lyudvikova, M. Volgina y B. M. Reed (2009). "Medium, container and genotype all influence "in vitro" cold storage of apple germplasm." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.*

Laucou, V.; Launay, A.; Bacilieri, R.; Lacombe, T.; Adam-Blondon, A.F. (2018). *Extended diversity analysis of cultivated grapevine Vitis vinifera with 10K genoma-wide SNPs.*

Lisek, A. y T. Orlikowska (2004). "in vitro" storage of strawberry and raspberry in calcium-alginate beads at 4 C." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.*

Marković, Z., Preiner, D., Stupic, D.S., Andabaka, Z., Simon, S., Voncina, D., Maletic, E., Kontic, J.K., Chatelet, P., Engelmann, F. (2015). *Cryopreservation and cryotherapy of grapevine (Vitis vinifera L.).*

Matsumoto, T., Sakai, A. (2003) *Cryopreservation of axillary shoot tips of "in vitro"-grown grape (Vitis) by a two-step Vitrification protocol.*

Mohan, S. (2011). *Prospects "in vitro" conservation of date palm genetic diversity for sustainable production. Emir. J. Food Agric.*

Myles, S.; Boyko, A.R.; Owens, C.L.; Brown, P.J.; Grassi, F.; Aradhya, M.K. (2011). *Genetic structure and domestication history of the grape. Proceedings of the National Academy of Sciences.*

Ozudogru, E., A. Previati y M. Lambardi (2010). "in vitro" conservation and cryopreservation of ornamental plants." *En: Protocols for "in vitro" propagation of Ornamental Plants, S.M. Jain y S.J. Ochatt (eds).*

Pathirana, R., McLachlan, A., Hedderley, D., Carra, A., Carimi, F., Panis, B. (2015). *Removal of leafroll viruses from infected grape vine plants by droplet Vitrification.*

Pence, V., (1999). *The Application of Biotechnology for the Conservation of Endangered Plants. En: Plant Conservation Biotechnology. Benson, E. (ed.). Taylor & Francis, London.*

Pierik, R. L. M., (1990). *Cultivo "in vitro" de las plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa.*

Plessis, P., Leddet, C., Dereuddre, J. (1993). *Cryopreservation of Vitis vinifera L. cv. Chardonnay shoot tips by encapsulation-dehydration: effect of pretreatment, cooling and postculture conditions.*

Preece, J. y West, T. (2009). "Microshoot encapsulation for cold storage, acclimatization, and clean up from arthropod infestations." *Acta Horticulturae.*

Rajasekaran, K.; Mullins, M.G. (1979). *Embryos and plantlets from cultured anthers of hybrid grapevines.*

Reed, B.M. (2008). *Plant cryopreservation: a practical guide*. Springer, New York Sakai, A., Kobayashi, S., Oiyama, I. (1990). *Cryopreservation of nucellar cells of navel Orange (Citrus sinensis Osb. var. Brasiliensis Tanaka) by Vitrification*.

Resco, P., Iglesias, A., Bardají, I. and Sotés, V. (2016). *Exploring adaptation choices for grapevine regions in Spain. Reg. Environ.*

Smith, P.G. (1944) *Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments (2nd Edn)*. Academic Press.

Towill, L.E., Forsline, P.L., Walters, C., Waddell, J.W., Laufmann, J. (2004) *Cryopreservation of Malus germplasm using a winter vegetative buds method: results from 1915 accessions*.

Van Leeuwen, C. and Destrac-Irvine, A. (2017). *Modified grape composition under climate change conditions requires adaptations in the vineyard*.

Velasco, R.; Zharkikh, A.; Troggio, M.; Dustin, A.C.; Cestaro, A.; Pruss, D.; Pindo, M.; Lisa, M.F. (2007). *A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety*.

Wang, B.S.P., Charest, P.J., Downie, B., (1993). *Ex - Situ Storage of Seeds, Pollen and In-Vitro Cultures of Perennial Woody Plant Species*. FAO Forestry Paper 113. UN Food and Agriculture Organization, Roma.

Wang, B., Li, J.W., Zhang, Z.B., Wang, R.R., Ma, Y.L., Blystad, D.R., Keller, E.R.J., Wang, Q.C. (2014). *Three Vitrification-based cryopreservation procedures cause different cryo-injuries to potato shoot tips while all maintain genetic integrity in regenerants*

Withers, L.A., (1985). *Long-term storage of "in vitro" cultures*. En: *"in vitro" Techniques, Propagation and Long-Term Storage*. Schafer-Menuhr, A. (ed.), Martinus Nijhoff & Dr. Junk Pub., Dordrecht, pp.

Wyse Jackson, P.S. & Sutherland, L.A. (2000) (1St edition) *International Agenda for Botanic Gardens in Conservation*. Botanic Gardens Conservation International, U.K.

Xia, J., H. Zhao, W. Liu, L. Li y. He (2009). *"Role of cytokinin and salicylic acid in plant growth at low temperatures."* *Plant Growth Regulation*.

Xu, X. & Lu, J. (2004). *Cytogenetic study of interspecific hybrids between Vitis rotundifolia an Vitis vinifera*. *Acta horticulturae*.

Zinelabidine, L.H.; Cunha, J.; Eiras-Dias, J.E.; Cabello, F.; Martínez-Zapater, J.M. & Ibáñez, J. (2015). *Pedigree analysis of the Spanish grapevine cultivar "Heben"*.