



Sociedad  
Española  
de **Ciencias  
Hortícolas**

**91**

**Octubre 2022**



# **ACTA DE HORTICULTURA**

**Comunicaciones Técnicas  
Sociedad Española de  
Ciencias Hortícolas**

## **IV Jornadas del Grupo de Viticultura**

**Editores:**

**Gonzaga Santesteban  
Nazareth Torres**

**26-28 de octubre 2022, Pamplona/Iruña**

## La técnica de microinjerto *in vitro* revela incompatibilidad translocada en heteroinjertos de vid

Sara Tedesco<sup>1</sup>, Patricia Irisarri<sup>2</sup>, Friedrich Kragler<sup>3</sup>, Pedro Fevereço<sup>1,4</sup>, Ana Pina<sup>2,5\*</sup>

<sup>1</sup> Plant Cell Biotechnology Laboratory, Instituto de Tecnología Química e Biológica António Xavier (Green-It Unit), Avenida da República, Estação Agronómica Nacional, 2780-157 Oeiras, Portugal

<sup>2</sup> Applied Metabolome Analysis Laboratory, Max Planck Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, Wissenschaftspark Golm, Am Mühlberg 1, 14476 Potsdam-Golm, Alemania

<sup>3</sup> InnovPlantProtect CoLab, Estrada de Gil Vaz Apartado 72, 7351-901 Elvas, Portugal

<sup>4</sup> Departamento de Ciencia Vegetal, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), Avenida Montañana 930, 50059, Zaragoza, España

<sup>5</sup> Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2 (CITA-Universidad de Zaragoza), Calle Miguel Servet, 177, 50013, Zaragoza, España

\* A. Pina: [apina@cita-aragon.es](mailto:apina@cita-aragon.es)

### Resumen

Actualmente, existe un problema con la longevidad de los viñedos debido a las enfermedades de madera de la vid y los problemas de incompatibilidad de injerto que afectan tanto a viveros como viticultores. Sin embargo, la gran variedad de genotipos que pueden ser injertados produce un amplio número de interacciones diferentes, que reflejan la complejidad del problema de compatibilidad. El objetivo de este trabajo fue evaluar el uso de microinjertos *in vitro* para identificar marcadores fisiológicos que permitan predecir futuras respuestas de incompatibilidad de injerto en vid. Para realizar el trabajo se utilizaron diferentes combinaciones de homo- y heteroinjertos de compatibilidad conocida y se realizó una caracterización histológica e histoquímica (localizando celulosa, almidón, callosa y lignina) de los procesos celulares que tienen lugar durante el desarrollo de la unión a los 28 y 49 días después del injerto. Los resultados histoquímicos mostraron que los heteroinjertos presentaban una disposición celular irregular, una diferenciación vascular más lenta y una persistencia de la capa necrótica en comparación con los homoinjertos. Además, en los heteroinjertos se registró una acumulación de almidón, así como una menor diferenciación de las células del floema, indicando la presencia de síntomas de incompatibilidad translocada. En este estudio, el uso de técnicas *in vitro* demostró ser un método eficaz para la selección precoz de combinaciones de injerto de vid compatibles e incompatibles.

**Palabras clave:** Histoquímica, incompatibilidad de injerto, selección precoz, *V. vinifera* spp.

### INTRODUCCIÓN

La incompatibilidad de injerto puede manifestarse en fallos del crecimiento a corto



plazo o en la ruptura del injerto a largo plazo, causando grandes pérdidas económicas a los viveristas y viticultores (Tedesco et al., 2022). Tradicionalmente, la incompatibilidad del injerto se ha clasificado como translocada, si se encuentra asociada con acumulación de almidón, degeneración del floema y defectos en el crecimiento, y localizada, si se caracteriza por una conectividad vascular deficiente y la posterior ruptura del injerto (Mosse, 1962). Diferentes métodos de cultivo *in vitro* han sido utilizados para la evaluación temprana de la compatibilidad de injerto en diferentes especies debido a su fiabilidad, reproducibilidad y rapidez (Pina et al. 2017). Sin embargo, este tipo de técnicas no se han aplicado en vid para la determinación de las reacciones de (in)-compatibilidad patrón-variedad. En este trabajo, se ha utilizado la técnica de microinjerto *in vitro* para identificar marcadores celulares tempranos de incompatibilidad de injerto en vid en combinaciones de comportamiento conocido al injerto usando el portainjerto Ritcher-110 (Renault-Spilmont et al., 2005; Assunção et al., 2019; Tedesco et al., 2020).

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron plantas *in vitro* de *V. vinifera* cv. 'Touriga Nacional', clon 21 y 112 (TN21 y TN112) y cv. 'Syrah', clones 383 y 470 (SY383 y SY470), y el portainjerto 'Ritcher-110' (*V. berlandieri* x *V. rupestris*, 110R). Se analizaron histológicamente homoinjertos de SY470, utilizados como control positivo de compatibilidad, a los 28, 35, 42 y 49 días después del injerto (DAG) y en los mismos tiempos, se evaluó la translocación de diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) sumergido en pecíolos, a través de la unión del homoinjerto de 'Ritcher-110'. Los homo- y heteroinjertos fueron fijados a los 28 y 49 DAG (días después del injerto) para análisis histoquímico y a los 49 DAG se evaluó el éxito de prendimiento del injerto de acuerdo con la formación de raíces y/o al crecimiento de la variedad. Los injertos se cortaron longitudinalmente y se realizaron diferentes tinciones en la zona de unión: calcofluor al 0,07 % para la celulosa, naranja de acridina al 0,01 % para paredes celulares lignificadas, floroglucinol-HCl para ligninas, la reacción de yoduro de potasio con yodo ( $I_2KI$ ) para el almidón, y azul de anilina al 0,1 % para la callosa. Las muestras se observaron utilizando un microscopio óptico y de fluorescencia Olympus BH2-RFCA equipado con un sistema de imagen digital. Se asignaron tres puntuaciones (baja, media y alta) a las combinaciones de injertos en función de su disposición celular, grado de diferenciación e intensidad de la capa necrótica para la tinción con calcofluor, naranja de acridina y fluoroglucinol, respectivamente. Los datos se analizaron mediante la prueba de chi-cuadrado ( $p < 0,05$ ) para evaluar si había relaciones significativas entre las puntuaciones atribuidas y la combinación, tipo de injerto, y tiempo (28 y 49 DAG). Las muestras teñidas con  $I_2KI$  y azul de anilina sirvieron para medir el número de almidón/célula y de callosa/célula, respectivamente. Los datos obtenidos se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis y múltiples comparaciones de tratamientos ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las observaciones al microscopio pusieron de manifiesto la diferenciación de elementos traqueales a partir de los 28 DAG, capaces de translocar CFDA, y que las combinaciones de homoinjertos se establecen a partir de los 35 DAG. Las evaluaciones del éxito de prendimiento del injerto indicaron que TN112 y SY383 funcionaron mejor que TN21 y SY470 cuando se injertaron en 110R. A pesar de que en estudios realizados en campo se describen las combinaciones TN21/110R y SY470/110R como más compatibles



que las formadas por TN112/110R y SY383/110R (Assunção et al., 2019, Renault-Spilmont et al., 2005), esta diferencia podría ser debida al origen del material vegetal. La tinción con calcofluor reveló una relación significativa entre las combinaciones de injerto y su disposición celular (Tabla 1). En este sentido, la baja organización celular que se encuentra en SY470/110R se correlaciona con su menor tasa de prendimiento del injerto. Los homoinjertos mostraron una relación significativa con el grado de diferenciación celular entre los tiempos estudiados, observándose una mayor diferenciación vascular a los 49 que a los 28 DAG (Tabla 1), mientras que, en los heteroinjertos, la diferenciación vascular se retrasó significativamente, como ocurre en otras especies (Pina et al., 2017; Tedesco et al., 2022). Estos resultados fueron respaldados con la observación de callosa en la zona de unión, donde los homoinjertos se enriquecieron más que los heteroinjertos en callosa en ambos tiempos de estudio, sugiriendo que la regeneración del floema se ve afectada en los heteroinjertos (Tabla 2). En cuanto a la tinción con floroglucinol, se observó una mayor tinción de la capa necrótica en los heteroinjertos que en los homoinjertos a los 49 DAG (Tabla 1), sin indicios de una completa disolución de la capa necrótica en los heteroinjertos que presentaban más tinción a los 49 que a los 28 DAG (Tabla 1). Los resultados obtenidos también revelaron que todos los heteroinjertos estaban significativamente más enriquecidos en almidón que los homoinjertos a los 28 y 49 DAG (Tabla 2) y que los heteroinjertos con menor tasa de prendimiento del injerto (SY470/110R y TN21/110R) fueron los únicos estadísticamente más enriquecidos en almidón a los 49 DAG en comparación con sus respectivos homoinjertos (SY470/SY470 y TN21/TN21) (Tabla 2). En conclusión, se ha demostrado la presencia de incompatibilidad translocada en los heteroinjertos de vid, como se sugirió previamente (Bouquet, 1980), ya que éstos presentaban una disposición celular irregular, una diferenciación vascular más lenta, una persistencia de la capa necrótica, una acumulación de almidón y menor diferenciación de las células del floema. Por lo tanto, las técnicas *in vitro*, y en particular las tinciones de almidón y celulosa pudieron identificar las combinaciones con menor éxito del injerto, y demostraron ser un método eficaz para la detección temprana de incompatibilidad en injertos de vid. Sin embargo, se necesita trabajo adicional para dilucidar cuáles son en cada caso las causas de esta incompatibilidad, lo que podría explicar por qué los niveles de compatibilidad para la misma combinación varían entre los injertos *in vitro* y en el campo.

## AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por la Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), número de subvención PD/BD/128399/2017 y por el Gobierno de Aragón—Fondo Social Europeo, Unión Europea (Grupo Consolidado A12).

## REFERENCIAS

- Assunção, M., Santos, C., Brazão, J., Eiras-Dias, J.E., Feveiro, P., 2019. Understanding the molecular mechanisms underlying graft success in grapevine. *BMC Plant Biol.* 19, 1–17.
- Bouquet, A., 1980. Differences observed in the graft compatibility between some cultivars of Muscadine grape (*Vitis rotundifolia* Michx.) and European grape (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon). *Vitis* 19, 99–104.
- Mosse, B., 1962. Graft-incompatibility in fruit trees with particular reference to its underlying causes. CAB, Farnham.
- Pina, A., Cookson, S. J., Calatayud, A., Trinchera, A., Errea, P. 2017. “Physiological and



molecular mechanisms underlying graft compatibility,” in *Vegetable Grafting Principles and Practices*, eds G. Colla, F. P. érez-Alfocea, and D. Schwarz (Wallingford: CABI), 132–154.

Renault-Spilmont, A.S.; Grenan, S.; Boursiquot, J.M., 2005. Syrah decline. *Progrés Agric. Vitic.* 122, 15–16.

Tedesco, S., Pina, A., Feveiro, P., Kragler, F., 2020. A Phenotypic Search on Graft Compatibility in Grapevine. *Agronomy* 10, 706.

Tedesco, S., Feveiro, P., Kragler, F., Pina, A., 2022. Plant grafting and graft incompatibility: A review from the grapevine perspective. *Sci. Hortic.* 299, 111019.

Tabla 1. Asociaciones significativas según la prueba de chi-cuadrado para las puntuaciones atribuidas a la disposición celular, diferenciación vascular y la intensidad de la capa necrótica en respuesta a la combinación, tipo de injerto, y días después del injerto (DAG). El valor estadístico de la prueba se informa en asociaciones significativas, con nivel de significación indicado por \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ ; ns: diferencia no significativa.

Parámetro	Combinación		Homo- vs. Hetero		DAG	
	28 DAG	49 DAG	28 DAG	49 DAG	Homo-	Heteroinjerto
Disposición celular ( <i>calcoflúor</i> )	29.018 *	ns	ns	ns	ns	ns
Diferenciación vascular ( <i>naranja de acridina</i> )	ns	ns	ns	ns	6 *	ns
Capa necrótica ( <i>floroglucinol</i> )	ns	ns	ns	15.406 ***	ns	7.224 *



Tabla 2. Valores medios  $\pm$  error estándar (SE) de almidón por célula y de callosa por célula a los 28 y 49 DAG, por combinación, tipo de injerto, y días después del injerto (DAG). Las diferencias significativas según la prueba de Kruskal-Wallis se indican mediante \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ , letras diferentes indican diferencias significativas. ns: ninguna diferencia significativa.

		<i>I<sub>2</sub>KI - almidón/célula</i>		<i>Azul de anilina - calosa/célula</i>	
		<b>28 DAG</b>	<b>49 DAG</b>	<b>28 DAG</b>	<b>49 DAG</b>
<b>Combinación</b>	<b>Efecto</b>	***	***	*	*
	110R/110R	81.6 $\pm$ 1.6 ab	82.2 $\pm$ 1.2 ab	90.1 $\pm$ 0.3 ab	77.6 $\pm$ 0.3 abcd
	TN21/TN21	45.8 $\pm$ 2.0 bc	52.3 $\pm$ 0.2 b	67.0 $\pm$ 0.3 ab	96.6 $\pm$ 0.2 a
	TN112/TN112	21.3 $\pm$ 0.1 c	49.1 $\pm$ 0.1 b	72.7 $\pm$ 0.1 ab	90.0 $\pm$ 0.3 ab
	SY383/SY383	101.9 $\pm$ 1.8 a	55.4 $\pm$ 0.4 b	80.7 $\pm$ 0.3 ab	93.1 $\pm$ 0.2 ab
	SY470/SY470	87.3 $\pm$ 2.0 ab	53.6 $\pm$ 0.4 b	105.2 $\pm$ 0.2 a	85.1 $\pm$ 0.3 abc
	TN21/110R	70.9 $\pm$ 1.1 ab	101.0 $\pm$ 2.5 a	73.3 $\pm$ 0.2 ab	61.1 $\pm$ 0.2 cd
	TN112/110R	91.2 $\pm$ 1.2 a	80.9 $\pm$ 1.4 ab	73.0 $\pm$ 0.2 ab	53.5 $\pm$ 0.1 d
	SY383/110R	92.5 $\pm$ 2.3 a	88.4 $\pm$ 3.3 ab	52.2 $\pm$ 0.1 b	67.3 $\pm$ 0.1 bcd
	SY470/110R	93.4 $\pm$ 2.2 a	97.8 $\pm$ 2.4 a	65.2 $\pm$ 0.2 ab	70.1 $\pm$ 0.4 abcd
<b>Tipo</b>	<b>Efecto</b>	**	***	*	***
	Homoinjerto	66.3 $\pm$ 1.8 b	59.5 $\pm$ 0.7 b	80.6 $\pm$ 0.2 a	88.5 $\pm$ 0.2 a
	Heteroinjerto	87.0 $\pm$ 1.9 a	91.6 $\pm$ 2.5 a	65.6 $\pm$ 0.2 b	63.1 $\pm$ 0.2 b
<b>Tiempo</b>	<b>Efecto</b>	***		ns	
	28 DAG	174.7 $\pm$ 1.9 a		146.7 $\pm$ 0.2	
	49 DAG	124.8 $\pm$ 2.0 b		153.2 $\pm$ 0.2	

