

16 JUN



439 198

P.- 60.681

B 72.851/OP.

Incl. Cl.:
<i>A01G</i>

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar PATENTE DE INVENCION

a nombre de PERSONNALITE JURIDIQUE DE LA STATION DES
CULTURES FRUITIERES ET MARAICHERES

entidad belga

establecida en Chaussée de Charleroi, 234, 5800 Gembloux,
Bélgica.

por: "PROCEDIMIENTO PARA MULTIPLICAR DE FORMA ACELERADA
LAS PLANTAS DE FRESA".



La presente invención se refiere a la multiplicación acelerada de plantas de fresa por "micropropagación in vitro", lo que permite obtener varios millones de plantas nuevas cada año, partiendo de un solo pié madre.

Es conocida actualmente la multiplicación de fresas por estolones, lo que permite obtener solamente de 30 a 50 plantas nuevas por pié madre y por año.

Según la presente invención, se pueden obtener millones de plantas nuevas por año partiendo de un solo pié madre, y ello activando las yemas axilares o adventicias, normalmente inactivas, que se hallan en la base de los peciolos de una plántula joven cultivada de forma estéril, con ayuda de una citoquinina incorporada en un medio nutritivo.

Cuando una yema axilar o adventicia se sitúa en un medio nutritivo con incorporación de citoquinina, se produce una proliferación de yemas axilares o adventicias que continúa durante todo el tiempo que la citoquinina siga siendo activa, es decir, aproximadamente de 6 a 8 semanas.

Las yemas de nueva formación así obtenidas se dividen e individualizan, y entonces pueden proliferar a su vez, si se trasplantan a un medio enriquecido con esta citoquinina.



16

Una particularidad de la invención estriba en el hecho de que la proliferación de las yemas se detiene a voluntad por simple supresión de la citoquinina; es decir, que las yemas se organizan como jóvenes plántulas de fresa, con hojas y raíces, que pueden entonces ser plantadas en plena tierra y conducidas como un estolón normal.

En laboratorio, se ha producido primero a la obtención de una joven plántula, cultivada estérilmente, y obtenida de meristemas u otra vía conocida; esta plántula sirve como material de partida, y ha sido trasplantada asépticamente en tubos de ensayo de 25 x 150 mm que contienen 15 ml de una solución nutritiva que contiene los macroelementos de la solución mineral de Knop, los microelementos de Murashige y Skoog, 0,5 mg/l de ácido nicotínico, 0,5 mg/l de piridoxina. HCl, 2,0 mg/l de glicina, 0,1 mg/l de tiamina. HCl, 100,0 mg/l de meso-inosita, 1,0 mg/l de ácido indolilbutírico, 40,0 g/l de glucosa, 8,0 g/l de agar. El pH del medio se ajusta a 5,6 antes de tratar en autoclave. A esta fórmula nutritiva, que ha resultado ser buena en todos los presentes ensayos, es necesario añadir una cierta cantidad de citoquinina, para obtener un desarrollo importante de yemas axilares o adventicias.

En los ensayos, la dosis de 1 mg/l de 6-bencilaminopurina (ó 6-benciladenina) ha resultado eficaz pa



ra todas las variedades de fresa ensayadas. Por debajo de 0,01 mg/l y por encima de 100 mg/l las dosis son ineficaces o tóxicas. Es posible que otras citoquininas puedan activar igualmente a las yemas inactivas.

5 Tras la preparación, las soluciones nutritivas se vierten en un recipiente apropiado (tubos o bocales de esterilizar), y luego se esterilizan en autoclave a 110°C durante 15 minutos. También se puede utilizar para la esterilización una gama de otras temperaturas o
10 tiempos.

 Tras 3 a 4 semanas de residencia en el medio nutritivo estéril, la joven plántula de partida comienza a echar yemas (desarrollo de yemas axilares o adventicias). Esta proliferación de las yemas adventicias o axilares continúa durante al menos 3 a 4 semanas. En este momento, la plántula ha formado una masa de yemas (15 a 30, a veces más) que no desarrollan más que muy poco de hojas y raíces. Por el contrario, se puede dividir esa masa de yemas, individualizar cada una de ellas, siempre en ambiente estéril, y trasplantarlas a un medio nutritivo de nuevo aporte.
15
20

 En ese medio, siempre enriquecido en citoquinina, por ejemplo 6-bencilaminopurina en cantidad de 1 mg/l, según las experiencias, la formación de yemas continuará efectuándose al ritmo de 15 a 30, como media, ca-
25



da 6 a 8 semanas.

La división y el trasplante se pueden efectuar de esa manera con toda la frecuencia necesaria, hasta el momento en que se disponga de la cantidad de material necesaria. En ese momento, las yemas se trasplantan, tras división, al mismo medio nutritivo en el que se precinde, sin embargo, de añadir la citoquinina. De nuevo, es el medio descrito el que ha dado los mejores resultados, pero no hay que decir que se pueden utilizar otras formulaciones.

Lo que interesa es suprimir la citoquinina, o por lo menos disminuir la concentración de citoquinina (según las experiencias hasta menos de 0,1 mg/l de 6-bencilaminopurina). En esas condiciones, las yemas divididas desarrollan hojas y raíces tras aproximadamente 3 semanas.

Una a dos semanas más tarde, las jóvenes plantas pueden ser trasplantadas a plena tierra, en un mantillo bastante ligero, de preferencia no estéril, para evitar el enmohecimiento superficial. La radicación es fácil, con la condición de que se mantengan las jóvenes plantas trasplantadas en una atmósfera húmeda (nebulización de niebla, o cajoneras de plástico transparente bastante estancas). De tres a cinco semanas más tarde las plántulas trasplantadas tienen el vigor y la talla de una planta de estolón normal.



Las condiciones de cultivo de la sala de crianza de plantas en multiplicación acelerada son: temperatura constante de 24°C, luz aportada por iluminación artificial (6 tubos TL de 40 W por 1,20 m² de anaquel) suministrada 16 h/día. La humedad relativa del aire no desempeña ningún papel. Estas condiciones pueden variar entre ciertos límites, de 10 a 30°C de temperatura, ya sea constante, ya sea variable entre la noche y el día. La luz puede ser suministrada por todos los tipos de lámparas, con la condición de respetar un umbral mínimo de intensidad (1500 a 2000 lux). Se puede trabajar igualmente en invernadero, pero entonces hace falta un alumbrado de punto si se trabaja en anaqueles superpuestos, para alumbrar las tabletas inferiores.

Los vasos de cultivo son los tubos de cultivo clásicos, principalmente el tubo de 25 x 150 mm, o bicales de esterilizar de medio o tres cuartos de litro, que resultan muy prácticos para la obtención de gran número de plantas en un volumen muy pequeño.

El paso de la formación de yemas a la diferenciación en plántulas jóvenes con hojas y raíces, seguido por retorno a la formación de yemas, ha podido efectuarse numerosas veces sin alteración del material vegetal. Las variedades son enteramente respetadas por este procedimiento de multiplicación acelerada. El regulador del me



canismo es la citoquinina (la 6-bencilaminopurina), en dosis de 0,01 mg/l a 10 mg/l. Se trata por tanto de un procedimiento muy flexible, y con rendimiento muy elevado.

5 La multiplicación en condiciones estériles garantiza al 100% el estado sanitario del material producido.

10 La invención se ha descrito a simple título de ejemplo, y no hay que decir que se pueden realizar numerosas modificaciones en su realización, sin apartarse de su espíritu.

15 La presente solicitud, que corresponde a la presentada en Bélgica, el 19 de Julio de 1.974, bajo el número PV 0/146738, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

20 - REIVINDICACIONES -

25 Los puntos de invención propia y nueva, que



se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

5
10
15
20
25

1ª.- Procedimiento para multiplicar de forma acelerada las plantas de fresa, por "micropropagación in vitro", caracterizado porque las yemas axilares o adventicias, normalmente inactivas, que se hallan en la base de los peciolos de una plántula joven cultivada de forma estéril, se sitúan en un medio nutritivo en presencia de una citoquinina, y tras algunas semanas la joven plántula forma una masa de yemas que, a su vez, se separan y trasplantan a un nuevo medio nutritivo en presencia de citoquinina.

15
20
25

2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque las yemas axilares o adventicias se sitúan de forma estéril en un medio nutritivo en presencia de citoquinina, para formar una plántula con una masa de yemas que tras 6 a 8 semanas se separan, para ser trasplantadas a su vez a un medio nutritivo enriquecido en citoquinina, efectuándose la obtención de plántulas con hojas y raíces disponiendo las yemas obtenidas en un medio nutritivo únicamente, y luego se plantan en plena tierra tras algunas semanas, y se conducen como un estolón normal.

25

3ª.- Procedimiento según las reivindicacio-

8-7-75

- 8 -



nes 1ª y 2ª, caracterizado porque el medio nutritivo está constituido por macroelementos de la solución mineral de Knop, los microelementos de Murashige y Skoog, 0,5 mg/l de ácido nicotínico, 0,5 mg/l de piridoxina. HCl, 2,0 mg/l de glicina, 0,1 mg/l de tiamina. HCl, 100,0 mg/l de meso-
5 -inosita, 1,0 mg/l de ácido indolilbutírico, 40,0 g/l de glucosa, 8,0 g/l de agar, ajustándose el pH del medio a 5,6, antes de la esterilización.

4ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1ª a 3ª, caracterizado porque la cantidad de citoquinina añadida al medio nutritivo está comprendida entre 0,01 mg/l y 100 mg/l.
10

5ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1ª a 4ª, caracterizado porque la citoquinina se añade al medio nutritivo en proporción de 1 mg/l.
15

6ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1ª a 5ª, caracterizado porque la citoquinina es la 6-bencilaminopurina.

7ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1ª a 5ª, caracterizado porque la citoquinina es la 6-benciladenina.
20

8ª.- PROCEDIMIENTO PARA MULTIPLICAR DE FORMA ACELERADA LAS PLANTAS DE FRESA.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, y para los fines que se han especificado.
25



Esta Memoria consta de diez hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 03.M.V.1976

P.A.

Fernando de Elizaburu

Por Poder.

5

26.4.76
AGM.

- 10 -