



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 180 385**

② Número de solicitud: 200001953

⑤ Int. Cl.<sup>7</sup>: A01H 4/00  
A01H 5/00

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **01.08.2000**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.02.2003**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**01.02.2003**

⑦ Solicitante/s:  
**Universidad Politécnica de Madrid  
Ramiro de Maeztu 7  
Vicerrectorado de Investigación  
28040 Madrid, ES  
Instituto Nacional de Investigación Agraria  
Universidad Politécnica de Valencia**

⑧ Inventor/es:  
**Manzanera de la Vega, José Antonio;  
Bueno Pérez, M<sup>a</sup> Angeles;  
Vicente Meana, Oscar y  
Gómez Garay, M<sup>a</sup> Aránzazu**

⑩ Agente: **No consta**

⑮ Título: **Método para la obtención de embriones y plantas haploides de alcornoque.**

⑯ Resumen:

Método para la obtención de embriones y plantas haploides de alcornoque.

La presente invención se basa en una aplicación de la Biotecnología vegetal a la mejora genética del alcornoque (*Quercus Suber* L.), dirigida a la obtención de plantas haploides u homocigóticas puras mediante embriogénesis gamética.

El método consiste en la obtención de embriones haploides de alcornoque a partir de células gaméticas (microsporas o granos de polen), mediante un tratamiento de estrés, para la obtención de plantas homocigóticas puras (líneas puras) aplicables a la mejora genética del alcornoque.

Los embriones gaméticos producidos se tratan con frío, para induir su germinación. Después se pasan a medio para estimular el desarrollo del tallo y obtener la producción de plantas.

Este procedimiento resuelve los problemas de lentitud en la obtención de líneas puras por métodos clásicos de mejora genética.

ES 2 180 385 A1

## DESCRIPCION

Método para la obtención de embriones y plantas haploides de alcornoque.

**Sector de la técnica**

La presente invención se basa en una aplicación de la Biotecnología vegetal a la mejora genética del alcornoque (*Quercus suber* L.), dirigida a la obtención de plantas haploides u homocigóticas puras (líneas puras) mediante embriogénesis gamética.

**Estado de la técnica: Antecedentes**

El alcornoque es una especie vegetal en la cual los largos ciclos reproductivos hacen inviable la obtención de líneas puras por métodos convencionales, tales como retrocruzamientos. Por ello se ha buscado una alternativa válida en la producción de embriones haploides, que es el objeto de la presente invención.

La presente invención expone un método viable para la obtención de embriones y plantas haploides en gran cantidad por embriogénesis gamética. Por otra parte, nunca hasta ahora se había obtenido material haploide de alcornoque por métodos biotecnológicos.

**Explicación o descripción de la invención**

El presente método consiste en la obtención de gran número de embriones haploides de alcornoque a partir de células gaméticas (microsporas o granos de polen), para la obtención de plantas homocigóticas puras (líneas puras) aplicables a la mejora genética del alcornoque.

La reproducción sexual, o propagación por semilla, en un método lento a la hora de obtener nuevos cruces o variedades, más aún si se requieren retrocruzamientos y posterior selección de individuos. Por otra parte, la fructificación del alcornoque es vecera, con una recurrencia de 2 o 3 años, lo que dificulta la mejora genética clásica, ya de por sí lenta, puesto que se necesitan varios años para que las plantas alcancen la madurez sexual.

Las ventajas que presenta este nuevo método permiten la obtención de embriones haploides en una sola generación de forma inmediata, los cuales se pueden utilizar en la obtención de líneas puras. Los requerimientos son mínimos en cuanto al material de partida, al espacio de cultivo y a la potencial reducción de costes. Por otra parte, uno de los principales problemas que se solucionan es la obtención de planta de material seleccionado, adaptado a las condiciones ecológicas del medio.

Método por el cual se toman anteras con polen inmaduro y se cultivan en condiciones asépticas, en medio con sales minerales macronutrientes ( $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ ,  $\text{NO}_3\text{K}$  ó  $\text{NO}_3\text{Na}$ ,  $\text{Cl}_2\text{Ca}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{SO}_4\text{Mg}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KCl}$ , y  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}\cdot \text{H}_2\text{O}$  o  $\text{PO}_4\text{HNa}_2$ ).

Como solución de micronutrientes se emplea la de MURASHIGE y SKOOG (1962), además se añade hierro quelado en forma de Fe-EDTA, adicionando  $\text{SO}_4\text{Fe}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  (etilendiamino tetraacetato de sodio).

Los cofactores empleados son los siguientes: Acido ascórbico, Acido nicotínico, Pantotenato cálcico, Piridoxina, Tiamina y Glutamina.

Como fuente de carbono se utiliza sacarosa y el pH del medio de cultivo se ajusta entre 5,5 y 5,7. Además, se añade 1% de carbón activo al

medio. La esterilización se realiza en autoclave entre 0,5 y 1 atmósferas (115°C a 120°C) durante 20 minutos.

Después del establecimiento, los cultivos se mantienen en una cámara en oscuridad y temperatura de  $33 \pm 2^\circ\text{C}$  durante  $5 \pm 2$  días. Posteriormente los cultivos se mantienen en una cámara bajo condiciones ambientales de temperatura a  $25^\circ\text{C}$  en oscuridad.

Una vez se produce el fenómeno de embriogénesis gamética, los embriones formados se transfieren a medio de cultivo de igual composición que la descrita pero sin carbón activo.

Los embriones inducidos, una vez alcanzada la madurez, se someten a un tratamiento de ruptura del letargo, consistente en almacenarlos a baja temperatura (2 a  $5^\circ\text{C}$ ) durante dos a diez semanas. A continuación, se trasladan a una cámara a  $25^\circ\text{C}$ , con iluminación, para estimular la germinación. El desarrollo del tallo se mejora añadiendo 6-benciladenina.

Las plantas germinadas se pueden transplantar a envases normales, y se aclimatan en invernadero.

**Modo de realización**

Se toman anteras con polen inmaduro y se cultivan en condiciones asépticas, en medio con la siguiente fórmula de sales minerales macronutrientes:

$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	0,13 a 0,20 g/l
$\text{NO}_3\text{K}$ ó $\text{NO}_3\text{Na}$	0,75 a 1,00 g/l
$\text{Cl}_2\text{Ca}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,12 a 0,15 g/l
$\text{SO}_4\text{Mg}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,25 a 0,31 g/l
$\text{KCl}$	0,30 a 0,95 g/l
$\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}\cdot \text{H}_2\text{O}$	0,09 a 0,15 g/l
$\text{PO}_4\text{HNa}_2$ (opcional)	0,03 g/l

Como solución de micronutrientes, se emplea la de MURASHIGE Y SKOOG (1962):

$\text{BO}_3\text{H}_3$	6,200 mg/l
$\text{SO}_4\text{Mn}\cdot \text{H}_2\text{O}$	16,900 mg/l
$\text{SO}_4\text{Zn}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10,590 mg/l
IK	0,830 mg/l
$\text{MoO}_4\text{Na}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,250 mg/l
$\text{SO}_4\text{Cu}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025 mg/l
$\text{Cl}_2\text{CO}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025 mg/l

Además se añade hierro quelado en forma de Fe-EDTA, adicionando 27,8 mg/l de  $\text{SO}_4\text{Fe}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y 37,3 mg/l de  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  (etilendiamino tetraacetato de sodio).

Los cofactores empleados son los siguientes:

Ácido ascórbico	10 $\mu\text{M}$
Ácido nicotínico	10 $\mu\text{M}$
Pantotenato cálcico	5 $\mu\text{M}$
Piridoxina	5 $\mu\text{M}$
Tiamina	3 $\mu\text{M}$
Glutamina	3 mM

Como fuente de carbono, se utiliza sacarosa (90 mM), carbón activo 1% (p/v), y el pH del medio de cultivo se ajusta entre 5,5 y 5,7. La esterilización se realiza en autoclave entre 0,5 y 1

atmósferas (115°C a 120°C) durante 20 minutos.

Después del establecimiento, los cultivos se mantienen en una cámara en oscuridad y temperatura de  $33 \pm 2^\circ\text{C}$  durante  $5 \pm 2$  días. Posteriormente los cultivos se mantienen en una cámara bajo condiciones ambientales de temperatura a  $25^\circ\text{C}$  en oscuridad.

A continuación, los embriones gaméticos o haploides obtenidos se transfieren a medio de cultivo de igual composición que la descrita pero sin carbón activo. Los embriones inducidos, una vez alcanzada la madurez, se someten a un tratamiento de ruptura del letargo, consistente en almacenarlos a baja temperatura ( $2$  a  $5^\circ\text{C}$ ) durante dos a diez semanas. A continuación, se trasladan a una cámara a  $25^\circ\text{C}$ , con iluminación, para estimular la germinación. El desarrollo del tallo se mejora añadiendo 6-benciladenina (BA)  $0,4$  a  $0,5 \mu\text{M}$  al medio de germinación.

Las plantas germinadas se pueden transplantar a envases normales, y se aclimatan en invernadero.

#### Aplicación industrial

La técnica descrita se puede aplicar industrialmente, mediante la organización de un laboratorio donde se pueden efectuar las operaciones anteriormente descritas. Para ello requiere cámaras de flujo laminar, autoclaves, estufas de esterilización y el instrumental de manipulación y envases de cultivo, etc.

Dicho laboratorio debe tener anexo un invernadero con suficiente capacidad, para la aclimatación y acondicionamiento de las plantas producidas. Dicho invernadero debe tener un ambiente de control de humedad ambiental, y otro de endurecimiento. En ambos se debe disponer de un sistema de regulación de la temperatura, instalaciones de riego, etc.

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

## REIVINDICACIONES

1. Método de propagación del alcornoque basado en técnicas biotecnológicas, **caracterizado** por inducir embriones haploides mediante embriogénesis a partir de células gaméticas.

2. Método según reivindicación 1, **caracterizado** por el cultivo de anteras en condiciones asépticas, en medio de cultivo con los minerales  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  (de 0,13 a 0,20 g/l),  $\text{NO}_3\text{K}$  ó  $\text{NO}_3\text{Na}$  (de 0,75 a 1,00 g/l),  $\text{Cl}_2\text{Ca}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (de 0,12 a 0,15 g/l),  $\text{SO}_4\text{Mg}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (de 0,25 a 0,31 g/l),  $\text{KCl}$  (de 0,30 a 0,95 g/l),  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}\cdot \text{H}_2\text{O}$  (de 0,09 a 0,15 g/l),  $\text{PO}_4\text{HNa}_2$  (opcional, 0,03 g/l) y con carbón activo (1%).

3. Método según reivindicaciones 1 y 2 **caracterizado** porque las anteras se someten a un tratamiento de estrés térmico, consistente en mantener una temperatura de  $33 \pm 2^\circ\text{C}$  durante tres

a siete días.

4. Método según reivindicaciones 1, 2 y 3, **caracterizado** porque los embriones haploides inducidos se transfieren a condiciones de maduración, en medio de cultivo de igual composición que la descrita en la reivindicación 2 pero sin carbón activo.

5. Método según reivindicaciones 1 a 4 **caracterizado** porque los embriones haploides maduros se someten a un tratamiento de ruptura del letargo, consistente en almacenarlos a baja temperatura (2 a  $5^\circ\text{C}$ ) durante dos a diez semanas, y a continuación se trasladan a condiciones de germinación en una cámara a  $25^\circ\text{C}$ , con iluminación.

6. Método según reivindicaciones 1 a 5 **caracterizado** por transplantar las plantas germinadas a envases normales de cultivo de plantas, y aclimatarlas en invernadero.

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65



① ES 2 180 385

② N.º solicitud: 200001953

③ Fecha de presentación de la solicitud: **01.08.2000**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.<sup>7</sup>: A01H 4/00, 5/00

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	BUENO, M.A. et al. Stress-induced formation of haploid plants through anther culture in cork oak ( <i>Quercus suber</i> ). <i>Physiologia Plantarum</i> , 1997, 99, 335-341. Páginas 336,337,340.	1
Y		2-6
Y	SOMMER et al. Differentiation of plantlets in longleaf pine ( <i>Pinus palustris</i> , Mill.) tissue cultured in vitro. <i>Bot. Gaz</i> , 1975, 136 (2), 196-200. Página 197, tabla 1.	2-6
A	US 5322789 A (GENOVESI & YINGLING) 21.06.1994	1,2,4

**Categoría de los documentos citados**

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

**Fecha de realización del informe**

23.12.2002

**Examinador**

Fco. J. Haering Pérez

**Página**

1/1