



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 338 968**

② Número de solicitud: 200801673

⑤ Int. Cl.:
A01H 4/00 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **23.05.2008**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **13.05.2010**

Fecha de la concesión: **07.04.2011**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **19.04.2011**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
19.04.2011

⑰ Titular/es:
**Universidad de Las Palmas de Gran Canaria
c/ Juan de Quesada, nº 30
35001 Las Palmas de G. Canaria, Las Palmas, ES**

⑱ Inventor/es: **García Jiménez, Pilar y
Robaina Romero, Rafael**

⑳ Agente: **No consta**

㉔ Título: **Método de micropropagación de la especie fanerógama marina *Cymodocea nodosa*.**

㉖ Resumen:

Método de micropropagación de la especie fanerógama marina *Cymodocea nodosa*.

La presente invención trata de un procedimiento que permite la micropropagación de la especie fanerógama marina *Cymodocea nodosa* a partir de varias fuentes de material vegetal (explantos que contienen el embrión recién embebido, tejido embrionario posterior a la germinación, capas de células libres o células libres obtenidas por digestión enzimática de explantos de embrión) extraído de semillas germinadas de la especie seleccionada. Una vez obtenidos los explantos de embrión de la especie seleccionada, en un medio de cultivo acuoso que comprende al menos un componente seleccionado de una lista de elementos en la que se encuentran el amonio o iones de amonio y el fosfato o iones de fosfato, se procede a la desinfección de los mismos para posteriormente llevar a cabo el cultivo, en medio de cultivo acuoso, de explantos de embrión, fragmentos de explantos de embrión o células libres obtenibles mediante digestión enzimática de explantos de embrión. Posteriormente y a partir del cultivo de esta fuente vegetal de la especie seleccionada se obtienen plántulas de la especie seleccionada que pueden utilizarse para distintos fines entre los que se encuentra el establecimiento (sebadales), temporal o permanente, de poblaciones de la especie seleccionada para mejorar la calidad del lecho marino.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Método de micropropagación de la especie fanerógama marina *Cymodocea nodosa*.

5 **Sector de la técnica**

La presente invención hace referencia a un método de micropropagación de la especie fanerógama marina *Cymodocea nodosa*.

10 **Estado de la técnica**

Las fanerógamas son hierbas marinas que crecen sobre el fondo del mar. Se trata de vegetales marinos que presentan la estructura de las plantas superiores, es decir, raíz, tallo rizomatoso y hojas como órganos vegetativos y flores, frutos y semillas para su reproducción.

15 Estas plantas vasculares marinas forman comunidades que definen ecosistemas y cuyo estado de salud se asocia a la calidad de las aguas litorales. Estas plantas contribuyen de forma significativa a la productividad marina suministrando un sustrato adecuado para el asentamiento de microalgas epífitas que contribuyen a la producción de una manera similar.

20 Las hojas de las fanerógamas reducen la velocidad de la corriente y el oleaje, aportando un lugar adecuado para la puesta, la fijación y el desarrollo de un número elevado de invertebrados, especies algales y peces. Paralelamente, las raíces y rizomas estabilizan el sedimento, impidiendo cambios bruscos del mismo por efecto de la erosión, así como, sustentando una flora microbiana de gran importancia en los procesos de mineralización.

25 En los últimos años se ha detectado un grave problema ambiental que afecta a estas especies, y es que las actividades humanas en el litoral amenazan a las comunidades de fanerógamas, lo que lleva a la regresión de estos ecosistemas y al detrimento de la calidad de sus aguas. Estas alteraciones ambientales preocupan a los sectores más implicados en la acción directa sobre el litoral (grandes constructoras) y responsables de estos espacios (Instituciones locales), cuyas herramientas de control o reparación son muy limitadas en estos casos y cualquier intervención para reparar o restaurar estos ecosistemas pasaría por la repoblación de estas áreas.

30 Desde hace algún tiempo se vienen realizando trabajos de transplante a las poblaciones afectadas, con material de poblaciones sanas. Estos trabajos no siempre han producido los resultados esperados, ante la imposibilidad de encontrar una población donadora adecuada, un método de transplante efectivo o sencillamente, la reducida supervivencia de los explantos.

35 La micropropagación es la vía de aumentar la producción cuando la capacidad natural de las especies es baja. Esta técnica de propagación asexual *in vitro* de especies vegetales comprende las siguientes fases:

- 40 1) Puesta en cultivo axénico del material vegetal elegido como fuente (Estadio I).
- 2) Establecimiento del método más productivo de propagación en el laboratorio mediante la combinación de medios de cultivo y agentes reguladores del crecimiento vegetal, micropropagación en sí (Estadio II).
- 45 3) Multiplicación y aclimatación de las plantas producidas (Estadio III).
- 4) Plantación de las plantas aclimatadas en el ambiente natural (Estadio IV).

50 La idea de la micropropagación de especies de macrófitos marinos para la restauración de ambientes litorales no es nueva (Jewett-Smith y McMillan, 1990; Koch & Durako, 1991, Jones & Ellender, 1991, Ellender, 1991; Bird *et al.* 1994).

55 Pero, con todo, en relación a los estadios I, II y III y el trabajo sistemático necesario para establecer cultivos, obtener biomasa y aclimatarla, de los trabajos hasta ahora realizados casi ninguno pasan del Estadio I, de forma que no se han definido aún auténticas rutas de micropropagación. Quizá lo más elaborado han sido los trabajos de Koch y Durako (1991) quienes establecieron cultivos *in vitro* de *Ruppia marítima* a partir de explantos obtenidos de rizoma que desinfectaron superficialmente y cultivaron en medio MS (Murashige & Skoog, 1962) en agua de mar. La adición de citoquininas al medio aceleró el crecimiento del rizoma y la emisión de nuevos rizomas, pero no se llegó a la producción de biomasa de forma que podamos considerar permanente. A partir de este trabajo, Bird y colaboradores *et al.* (1993) centraron su esfuerzo en la aclimatación de material producido en cultivo *in vitro*, observando como la salinidad puede afectar a la aclimatación de las plantas y que el enraizamiento no era necesario para asegurar la viabilidad del material obtenido en el laboratorio.

65 En el caso de *Posidonia oceánica*, Loqués y colaboradores, en 1991, establecieron cultivos axénicos a partir de los meristemas que permiten en la naturaleza el crecimiento de los rizomas. La experiencia se prolongó por 4 meses en los que el material en cultivo fue capaz de regenerar hojas. Los protoplastos o células vegetales desprovistas de pared mediante un tratamiento químico enzimático también han sido objetivos de algunos trabajos (Balestri & Cinelli, 1992;

ES 2 338 968 B1

2001). Los protoplastos pueden ser reprogramados *in vitro* e iniciar un programa de desarrollo hasta la formación de una nueva plántula o un embrión. En Posidonia oceánica, los autores mencionados, observaron división celular en muy pocos protoplastos, por lo que los cultivos celulares no progresaron, más allá de la obtención de protoplastos con un buen rendimiento.

5

Como resultado de investigación se ha llegado al convencimiento que debe ser tejido joven, como el que aportan las semillas, el material de partida o, en su defecto, que la vía de propagación nos lleve a la inducción de la embriogénesis *in vitro*:

10

- La posibilidad de usar embriones facilita sobre todo la desinfección y aporta células muy competentes en relación a la señal de los reguladores.

15

- La inducción de un patrón embriogénico *in vitro* puede proveernos con ese tipo de células, pero además permitirnos la producción de semillas artificiales sobre las que aplicar nuestra experiencia de propagación, aclimatación y reimplantación en el mar formando así nuevas manchas (patches), de cuya proliferación y crecimiento parecen depender el destino de las poblaciones amenazadas.

20

El estado de la técnica no refleja ningún documento que pudiera afectar a la novedad de las reivindicaciones ni a la actividad inventiva del contenido del presente documento en cuanto solo recoge aspectos referentes a fases previas a la propagación como puede ser la germinación de semillas, aspecto que no se reivindica en el siguiente documento. A continuación se enumeran los documentos más próximos al estado de la técnica de la presente invención de cuya lectura se observa que no afectan a la novedad de la presente invención:

25

- García-Jiménez Pilar; Navarro Eva P; Santana Cristo H; Luque Ángel; Robaina Rafael R.: "Anatomical and nutritional requirements for induction and sustained growth *in vitro* of *Cymodocea nodosa* (ucría) *ascherson*", Aquatic botany, jan 2006, vol. 84, nr. 1, pg. 79-84, ISSN 0304-3770.

30

- Bird Kimon T; Johnson Jennifer R; Jewett-Smith Jerilyn: "*In vitro* culture of the seagrass *Halophila decipiens*", Aquatic botany, april, 1998, vol. 60, nr. 4, pg. 377-387, ISSN 0304-3770.

35

- Jewett-Smith J; McMillan C.: "Germination and seedling development of *Halophila engelmannii aschers* (hydrocharitaceae) under axenic conditions", Aquatic botany, 1990, vol. 36, nr. 2, pg. 167-178, ISSN 0304-3770.

40

- Balestri Elena; Cinelli Francesco: "Isolation and cell wall regeneration of protoplasts from Posidonia oceánica and *Cymodocea nodosa*" Aquatic botany, july, 2001, vol. 70, nr. 3, pg. 237-242, ISSN 0304-3770.

- Moffler M D; Durako M J.: "Axenic culture of *thalassia testudinum* (hydrocharitaceae)", American journal of botany, 1983, vol. 70, nr. 5 part 2, pg. 88, ISSN 0002-9122, Joint meetings of the botanical society of america and canadian botanical association, grand forks, North Dakota, 7-11 august 1983.

- Patente US 6858430 B1.

Explicación de la invención

45

La presente invención trata de un método que permite la micropropagación de la especie fanerógama marina *Cymodocea nodosa*, que comprende las siguientes etapas:

50

a) Cultivo de semillas de la especie seleccionada en un medio de cultivo acuoso que comprende al menos un componente seleccionado de una lista de elementos en la que se encuentran el amonio o iones de amonio y el fosfato o iones de fosfato.

55

b) Desinfección de los explantos de embrión obtenibles tras la germinación de las semillas de la especie seleccionada.

c) Se procede a:

60

i. Cultivo del explanto obtenible en medio de cultivo acuoso y obtención de plántulas.

ó

ii. Fraccionamiento del explanto obtenible en fragmentos de 1 a 2 mm de longitud y cultivo de estos fragmentos en medio de cultivo acuoso y obtención de plántulas.

ó

65

iii. Digestión enzimática del explanto obtenible desinfectado para la obtención de células libres, y posterior cultivo de las células libres obtenibles en medio de cultivo acuoso y obtención de plántulas.

ES 2 338 968 B1

Es característica así mismo de la invención que para acelerar la germinación de las semillas de la especie seleccionada se disminuye intencionadamente la salinidad del medio de cultivo con una proporción de agua bidestilada hasta 11 psu (practical salinity units).

5 Es característica así mismo de la invención el uso, en el medio de cultivo de las semillas, de una cantidad inicial de amonio entre 60-80 mg, preferiblemente 70 mg, y una cantidad inicial de fosfato entre 5-20 mg, preferiblemente 10 mg.

10 Es característica así mismo de la invención que la fuente de nitrógeno se añade al medio de cultivo de las semillas en forma de cloruro de amonio (NH_4Cl) y la fuente de fósforo en forma de fosfato potásico dibásico (KH_2PO_4).

Es característica así mismo de la invención que el medio de cultivo de los explantos comprende al menos un componente seleccionado de una lista de elementos en la que se encuentran el ácido ascórbico y el ácido cítrico.

15 Es característica así mismo de la invención que el cultivo de los explantos se lleva a cabo con explantos con un hipocotilo de longitud entre 1 y 5 mm de longitud.

De acuerdo con la invención la etapa de digestión enzimática de los explantos, para la obtención de células libres, comprende las siguientes etapas:

- 20
- a) Re esterilización del cotiledón del embrión germinado.
 - b) Plasmólisis parcial del material vegetal.
 - 25 c) Elaboración de una solución enzimática.
 - d) Agitación orbital de la solución enzimática a 35°C y a 50 rpm durante al menos 6 horas.
 - 30 e) Filtración y obtención de células libres con un tamaño de poro entre 40 y 60 micras.

Es característica así mismo de la invención que la solución enzimática comprende al menos un componente seleccionado de una lista de elementos donde se encuentra tejido de explanto y/o celulasa y/o hemicelulasa.

35 Es característica así mismo de la invención que el medio de cultivo de células libres de explanto comprende al menos un componente seleccionado de una lista de elementos donde se encuentran el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y el bencilo amino purina (BAP).

40 **Modo de realización preferente de la invención**

Aunque la invención se describe en términos de una realización específica preferida, será fácilmente evidente para los expertos en esta técnica que se pueden hacer diversas modificaciones, redistribuciones y reemplazos. El alcance de la invención está definido por las reivindicaciones adjuntas a la misma.

45 Primero se llevó a cabo la recogida de semillas de la especie marina *Cymodocea nodosa*.

Estas semillas fueron esterilizadas sumergiéndose durante aproximadamente 10 minutos en una solución de agua salina que contenía un porcentaje de aproximadamente el 10% en volumen de lejía y una gota de detergente comercial Tween 80.

55 Para sembrar las semillas se utilizaron recipientes tipo Magenta®-G7 (Sigma Co.) con arena y agua de mar esterilizada. Primero se diluyó el agua de mar con agua bidestilada hasta conseguir la salinidad adecuada para cada tratamiento y luego se enriqueció con nutrientes y soluciones nutritivas hasta conseguir el medio de cultivo final, esta disminución intencionada de la salinidad del medio de cultivo permitió acelerar la germinación de las semillas.

60 A continuación se esterilizó en un autoclave, a 121°C y aproximadamente 20 minutos, la arena y el agua diluida y enriquecida, dispuestos ya en sus magentas. Las magentas se dejaron reposar durante dos días antes de meter las semillas, para que se igualaran los niveles de fósforo y nitrógeno entre el agua y el sedimento.

65

ES 2 338 968 B1

El medio de cultivo empleado para la siembra de las semillas es el que se muestra a continuación:

5

Elementos Medio de Cultivo	Cantidad
NH ₄ Cl	70 mg
KH ₂ PO ₄	10 mg
Solución de micronutrientes	1 ml
Solución EDTA-Fe	0,5 ml
Solución vitaminas	1 ml
Solución salina	1000 ml

10

15

20

Elementos Solución Micronutrientes	Cantidad
FeSO ₄ .7H ₂ O	50 mg
H ₃ BO ₃	1140 mg
MnSO ₄ .H ₂ O	123 mg
ZnCl ₂	11 mg
COCl ₂	4 mg
Na-EDTA.2H ₂ O	1000 mg

25

30

35

40

Elementos Solución Fe-EDTA	Cantidad
FeSO ₄ .H ₂ O	245 mg
Na-EDTA.2H ₂ O	330 mg

45

50

55

Elementos Solución de vitaminas	Cantidad
Tiamina-HCl	100 mg
Biotina	1 mg
Piridoxina	1 mg
B ₁₂	0,2 mg

60

El nitrógeno y el fósforo son nutrientes esenciales y limitantes del crecimiento de los vegetales en general. En el medio de cultivo empleado el nitrógeno se añadió como cloruro de amonio (NH₄Cl), y el fósforo como fosfato potásico dibásico (KH₂PO₄), ya que son la fuente de nutrientes que mejor asimilan los explantos de *Cymodocea nodosa*.

65

Posteriormente las semillas germinaron obteniéndose explantos de embrión (fragmento de una planta que se escinde y se prepara de forma aséptica para su cultivo en un medio nutritivo) de *Cymodocea nodosa*.

Los explantos de embrión fueron desinfectados superficialmente, para ello primero se lavaron los explantos en una solución esterilizada de agua destilada durante 10 minutos.

ES 2 338 968 B1

Posteriormente se llevó a cabo un tratamiento de desinfección de los explantos, durante 10 minutos, en una solución esterilizada de agua destilada que contenía el 2% en volumen de BrK y el 1% de sulfatos lineales de alquilo (LAS). Este procedimiento de lavado y secado se repitió dos veces para después llevar a cabo un tratamiento de secado de los explantos en papel esterilizado previo a la siembra de los mismos.

En esta realización preferente de la invención se cultivaron tanto los explantos de embrión con un hipocotilo de 1 a 5 mm de longitud, como fragmentos de 1 a 2 mm de los mismos, como células libres obtenidas mediante proceso de digestión enzimática.

Para obtener células libres a partir de las semillas germinadas de *Cymodocea Nodosa*, que posteriormente se cultivaron, se llevó a cabo un procedimiento de digestión enzimática que comprendió las siguientes etapas:

- 1) Reesterilización del cotiledón (forma con que aparece la primera hoja en el embrión de las plantas fanerógamas) del embrión germinado.
- 2) Plasmólisis (retracción de la membrana citoplásmica respecto de la pared rígida suprayacente) parcial del material vegetal con la siguiente solución:

Producto	Concentración (mg/l)
KH ₂ PO ₄	27.2
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	1480
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0.025
KNO ₃	101
KI	0.16
MgSO ₄ x 2 H ₂ O	246
Ácido cítrico	100-200
Glicina	10-100
MES buffer	1000
Manitol	13%
pH	5.8

- 3) Elaboración de una solución enzimática que comprendía 100 mg de tejido celular por cada 1 ml de solución. La solución enzimática comprendía los siguientes elementos:

Elementos Solución Enzimática	Cantidad
Celulasa	4% (g/100 ml)
Hemicelulasa	4% (g/100 ml)
Manitol	1 molar
Tejido de explanto	100 mg
Tampón químico	20 mili molar

- 4) Agitación orbital de la solución enzimática a 35°C y 50 rpm, durante 12 horas, para conseguir la digestión del material vegetal.
- 5) Filtración de la solución mediante una malla de nylon esterilizada, recogiendo los productos celulares entre 40 y 60 micras de tamaño de poro.

ES 2 338 968 B1

Para conseguir una disminución de fenoles del medio de cultivo final, dicho medio de cultivo se formuló con una composición definida de Murashigue y Skoog (MSO, 1962) con una serie de aditamentos como sigue a continuación:

Sales minerales	Cantidad (mg/l)
Nitrato de amonio	82,5
Nitrato de potasio	95
Ácido Bórico	1190
Di-hidrógeno fosfatopotásico	34
Iodo potásico	166
Molibdato de sodio	250
Clorato de cobalto di-hidratado	25
Clorato de calcio di-hidratado	88
Sulfato de magnesio hepta-hidratado	74
Sulfato de magnesio tetra-hidratado	4460
Sulfato de cinc hepta-hidratado	1720
Sulfato de cobre penta-hidratado	25
Sal ácido disódica etilen-diamino tetra-acética	7,45
Sulfato ferroso hepta-hidratado	5,57

Azúcares	Cantidad (g/l)
Glucosa	30
Manosa	0,5
Sorbitol	0,5

Ácidos orgánicos	Cantidad (mg/l)
Ácido cítrico	10
Ácido málico	10

ES 2 338 968 B1

Vitaminas	Cantidad (mg/l)
Tiamina Hidroclorada	100
Ácido nicotínico	500
Piridoxina hidroclorada	500
Pantotenato cálcico	250
Biotina	100
Ácido ascórbico	75
Inositol	100

Hormonas	Cantidad (moles)
ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)	10^{-4} M
bencilo amino purina (BAP)	10^{-4} M

Como fin del proceso de micropropagación se llevó a cabo la siembra tanto de los explantos, para los cuáles se escogió una longitud del hipocotilo de 1 a 5 mm, como de fragmentos de explantos, entre 1 y 2 mm, como de células libres en el medio de cultivo anteriormente definido.

ES 2 338 968 B1

REIVINDICACIONES

1. Método de micropropagación de *Cymodocea nodosa*, que comprende las siguientes etapas:

- 5
- a) Cultivo de semillas de la especie seleccionada en un medio de cultivo acuoso que comprende al menos un componente seleccionado de una lista de elementos en la que se encuentran el amonio o iones de amonio y el fosfato o iones de fosfato.
- 10
- b) Desinfección de los explantos de embrión obtenibles tras la germinación de las semillas de la especie seleccionada.
- c) Se procede a:
- 15
- i. Cultivo del explanto obtenible en medio de cultivo acuoso y obtención de plántulas.
ó
- ii. Fraccionamiento del explanto obtenible en fragmentos de 1 a 2 mm de longitud y cultivo de estos fragmentos en medio de cultivo acuoso y obtención de plántulas.
20
ó
- iii. Digestión enzimática del explanto obtenible desinfectado para la obtención de células libres, y posterior cultivo de las células libres obtenibles en medio de cultivo acuoso y obtención de plántulas.
25

2. Método según reivindicación 1, **caracterizado** porque el material empleado para el cultivo es una especie seleccionada de un grupo de género *Cymodocea*.

30 3. Método según reivindicación 1, **caracterizado** porque la cantidad inicial de amonio en el medio de cultivo de las semillas está entre 60-80 mg, preferiblemente 70 mg.

35 4. Método según reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque la cantidad inicial de fosfato en el medio de cultivo de las semillas está entre 5-20 mg, preferiblemente 10 mg.

5. Método según reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque la fuente de nitrógeno se añade al medio de cultivo de las semillas en forma de cloruro de amonio (NH₄Cl).

40 6. Método según reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque la fuente de fósforo se añade al medio de cultivo de las semillas en forma de fosfato potásico dibásico (KH₂PO₄).

45 7. Método según reivindicación 1, **caracterizado** porque para acelerar la germinación de las semillas de la especie seleccionada se disminuye intencionadamente la salinidad del medio de cultivo con una proporción de agua bidestilada hasta 11 psu (practical salinity units).

8. Método según reivindicación 1, **caracterizado** porque el medio de cultivo de los explantos comprende al menos un componente seleccionado de una lista de elementos en la que se encuentran el ácido ascórbico y el ácido cítrico.

50 9. Método según reivindicación 1, **caracterizado** porque el cultivo de los explantos se lleva a cabo con explantos con un hipocotilo de longitud entre 1 y 5 mm de longitud.

10. Método según reivindicación 1, **caracterizado** porque la etapa de digestión enzimática de los explantos, para la obtención de células libres, comprende las siguientes etapas:

- 55
- a) Re esterilización del cotiledón del embrión germinado.
- b) Plasmólisis parcial del material vegetal.
- 60
- c) Elaboración de una solución enzimática.
- d) Agitación orbital de la solución enzimática a 35°C y a 50 rpm durante al menos 6 horas.
- e) Filtración y obtención de células libres con un tamaño de poro entre 40 y 60 micras.

65 11. Método según reivindicación 10, **caracterizado** porque la solución enzimática comprende al menos un componente seleccionado de una lista de elementos donde se encuentra tejido de explanto y/o celulosa y/o hemicelulosa.

ES 2 338 968 B1

12. Método según reivindicación 1, **caracterizado** porque el medio de cultivo de células libres de explanto comprende al menos un componente seleccionado de una lista de elementos donde se encuentran el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y el bencilo amino purina (BAP).

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 338 968

② N° de solicitud: 200801673

③ Fecha de presentación de la solicitud: **23.05.2008**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **A01H 4/00** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	GARCÍA-JIMÉNEZ, et al. Anatomical and nutritional requirements for induction and sustained growth of <i>Cymodocea nodosa</i> (Ucria) Archerson. Aquatic Botany, 2006, vol. 84, páginas 79-84.	1-12
Y	BIRD, K. et al. In vitro culture of the seagrass <i>Halophila decipiens</i> . Aquatic Botany, 1998, vol. 60, páginas 377-387.	1-12
A	CAYE, G. y MEINESZ, A. Experimental study of seed germination in the seagrass <i>Cymodocea nodosa</i> . Aquatic Botany, 1986, vol. 26, páginas 79-87.	7
A	BALESTRI, E y CINELLI, F. Isolation and cell wall regeneration of protoplasts from <i>Posidonia oceanica</i> and <i>Cymodocea nodosa</i> . Aquatic Botany, 2001, vol. 70, páginas 237-242.	1,10-11
A	ORTH R. et al. A review of issues on seagrass dormancy and germination: implications for conservation and restoration. Marine Ecology Progress series, 2000, vol. 200, páginas 277-288.	1
A	AILSTOCK S. y SHAFER, D. 2006. Applications and limitations of micropropagation for the production of underwater grasses. ERDT/TN SAV-06-1. [en línea] Recuperado de Internet. [recuperado el 29.04.2010] <url: www.http://el.erd.usace.army.mil/elpubs/pdf/sav06-1.pdf.	
A	PAHWAR, F. Acclimatation and establishment of micropropagation plants. Digitalverlag GmbH, 2005.[en línea] Recuperado de Internet.[recuperado el 29.04.2010] <url:http://www.chemlin.de/publications/documents/acclimatization_and_establishment_of_micropropagation_plants.pdf	8,12

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 nº:

Fecha de realización del informe
30.04.2010

Examinador
A. Polo Díez

Página
1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A01H

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, BIOSIS, HCAPLUS, INTERNET

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 30.04.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-12	SÍ
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SÍ
	Reivindicaciones 1-12	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	García-Jimenez et al.	2006
D02	Bird et al.	1998
D03	Caye y Meisnesz	1986
D04	Balestri y Cinelli	2001
D05	Orth et al.	2000
D06	Ailstock y Shafer	2006
D07	Panhwar	2005

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La invención (reivindicación independiente 1) se refiere a un método de micropropagación de la fanerógama marina *Cymodea nodosa*, que comprende las etapas de:

- cultivar una semilla de la planta en un medio acuoso que comprende al menos un componente seleccionado de una lista de elementos en la que se encuentra el amonio o iones amonio y el fosfato o iones fosfato.
- desinfectar los explantos obtenidos tras la germinación de la semilla y
- obtener una plántula, bien cultivando el explanto en un medio acuoso hasta la obtención de una plántula, bien fragmentando el explanto y cultivando estos fragmentos en un medio acuoso, o bien realizando una digestión enzimática del explanto para obtener células libres que luego se cultiven para dar lugar a la plántula.

Las reivindicaciones dependientes 2 a la 12 dan algunos detalles del método reivindicado.

NOVEDAD (art. 6 de la Ley de Patentes)

Ningún documento de los citados en el estado de la técnica propone un método para obtener plántulas de *Cymodea nodosa* que comprenda las mismas etapas de la solicitud, por lo que se considera que las reivindicaciones 1 a 12 cumplen el requisito de novedad.

ACTIVIDAD INVENTIVA (art. 8 de la Ley de Patentes)

El documento D1 divulga un método de micropropagación para la misma especie, *Cymodocea nodosa*, por lo que se considera este documento el más cercano del estado de la técnica. En D1 se parte de explantos de la fanerógama, éstos se esterilizan y se cultivan "in vitro" en medio acuoso con diferentes fuentes de nitrógeno y fósforo como nutrientes, determinándose que el amonio y el fosfato inorgánico son las fuentes preferidas por los explantos para su crecimiento. La diferencia de la invención con respecto a D1 es que en la invención se parte de semillas para obtener los explantos. La ventaja de utilizar semillas como fuente para obtener los explantos es que éstas se pueden desinfectar con más facilidad que otros tejidos (descripción, página 4). El problema a resolver por la invención es desarrollar un método de micropropagación de esta especie de fanerógama alternativo en el que sea más fácil la esterilización del material de partida. La utilización de semillas para comenzar los cultivos "in vitro" de fanerógamas es ya conocida en el estado de la técnica (ver D2 y D5). Precisamente, en D2 se lleva a cabo la micropropagación de una fanerógama marina de otra especie, la *Halophila decipiens*, partiendo de semillas esterilizadas. Las semillas de esta especie rodeadas de una cubierta dura, al igual que lo están las de *Cymodocea nodosa*, son especialmente apropiadas para llevar a cabo este procedimiento (ver D2, apartado 2.1). En D2 se estudian también las necesidades en cuanto a fuentes de nitrógeno, vitaminas, reguladores de crecimiento que tienen tanto las semillas al geminar como los explantos.

Un experto en la materia que quisiera desarrollar un método de micropropagación de *Cymodocea nodosa* alternativo, emplearía como material de partida, en vez de los explantos un material de más fácil esterilización como las semillas de *Cymodea* siguiendo las enseñanzas del documento D2. Para germinar las semillas, probaría diversos medios existentes de cultivos marinos con diferentes fuentes de N y P y entre otros, sería obvio probar el amonio y el fosfato como fuentes de nutrientes, ya que han sido especialmente adecuados en el cultivo de explantos en esta misma especie (ver documento D1).

Hoja adicional

Se considera, por ello, que la reivindicación independiente 1 no tiene actividad inventiva cuando se tiene en cuenta lo divulgado en los documentos D1 y D2.

Las reivindicaciones dependientes 2 a 12 no aportan ninguna característica que en combinación con las características de las reivindicaciones de las que dependen le otorgue actividad inventiva a la invención:

Los componentes de los medios de cultivo de las reivindicaciones 5, 6, 8 y 12, ya han sido previamente utilizados en los documentos D1 y D2 o son compuestos habitualmente utilizados en el cultivo in vitro de planta (ver D7).

También es conocido que el descenso de la salinidad (reivindicación 7) produce un aumento en el porcentaje de la germinación en esta especie de fanerógama en concreto (ver documento D3).

La alternativa objeto de las reivindicaciones 10 y 11 para obtener plántulas a partir células obtenidas del explanto de la semilla por digestión enzimática ha sido descrita de manera muy similar para esta misma especie en el documento D4.

En lo que respecta a las reivindicaciones 2, 3, 4, 9, se considera que son elecciones arbitrarias que un experto en la materia podría realizar sin ejercer actividad inventiva y que no han demostrado tener ningún efecto técnico sobre la invención.

Por tanto, se considera que tal y como están redactadas las reivindicaciones, éstas carecen de actividad inventiva.

A este respecto, se considera que una modificación de la redacción de las reivindicaciones, podría solventar el problema de falta de actividad inventiva. Según el documento D6, en el que ya se divulga la posibilidad de obtener explantos a partir de semillas, entre otros orígenes, se hace referencia a la dificultad de encontrar el medio adecuado tanto para la propagación como para el crecimiento in vitro de los explantos de cada especie. El documento D2 también pone de manifiesto que las necesidades en cuanto a fuentes de nitrógeno y fósforo pueden ser muy diferentes incluso en especies de fanerógamas del mismo género. En el caso de la solicitud parece que la invención radica en haber seleccionado el medio adecuado para la germinación de las semillas de esta especie, por lo que una nueva redacción de la reivindicación 1 en la que el método de micropropagación incluyera el medio de cultivo o los componentes esenciales del mismo podría tener actividad inventiva. Además, esta nueva redacción de la reivindicación estaría más acorde con lo que se ha divulgado en la invención, donde únicamente se ha probado un medio muy concreto, no habiéndose demostrado que un medio que contenga otras compuestos u otras combinaciones de fosfato y amonio o que los contenga en otra cantidad sea adecuado para la germinación.

Puesto que la novedad y actividad de la invención parece radicar en los medios utilizados en el método de propagación, es conveniente que tanto los componentes como las cantidades de los mismos queden muy claras. En este sentido, la redacción de las reivindicaciones 1, 8, 11 y 12 cuando se hace referencia a los componentes de la composición, es confusa. La expresión "comprende al menos un componente seleccionado de una lista de elementos donde se encuentran A y B" no queda clara, ya no se sabe si en el medio de cultivo debe haber sólo A o sólo B, es decir vale cualquiera de ellos, o deben encontrarse los dos. Incluso se podría entender que se puede elegir otro componente, por ejemplo C, de una lista en la que figuraran A y B y otros componentes más. También se debe expresar las cantidades de las reivindicaciones 3 y 4 referidas a la cantidad de medio de cultivo y no como valores absolutos.