

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 355 455**

21 Número de solicitud: 200930686

51 Int. Cl.:
A01H 4/00

(2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **11.09.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **28.03.2011**

Fecha de la concesión: **26.01.2012**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **07.02.2012**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
07.02.2012

73 Titular/es:
**INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES Y
TECNOLOGÍA AGRARIA Y ALIMENTARIA
CTRA. DE LA CORUÑA KM. 7,5
28000 MADRID, ES y
UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**

72 Inventor/es:
**BUENO PÉREZ, MARÍA ANGELES;
SÁNCHEZ QUINTANA, NIEVES;
PINTOS LÓPEZ, BEATRIZ;
NAVARRO CERRILLO, RAFAEL y
JORRÍN NOVO, JESÚS**

74 Agente: **Illescas Taboada, Manuel**

54 Título: **MÉTODO DE OBTENCIÓN DE EMBRIONES HAPLOIDES Y PLANTAS DOBLE-HAPLOIDES DE ENCINA.**

57 Resumen:

Método de obtención de embriones haploides y plantas doble-haploides de encina. La presente invención describe un método de obtención de embriones haploides y plantas doble-haploides, de encina (*Quercus ilex* L) mediante embriogénesis gamética. El método consiste en la inducción de embriogénesis de las células gaméticas de la encina mediante un doble tratamiento de estrés y la obtención de embriones haploides y plantas doble-haploides. El primer tratamiento in vivo de estrés es un tratamiento en frío y se realiza en los amentos recogidos de las propias encinas. El segundo tratamiento in vitro de estrés consiste en un choque térmico al que se somete a las anteras extraídas de dichos amentos. Los embriones haploides pueden diploidizarse obteniéndose embriones doble-haploides, que son sometidos a un tratamiento específico para su maduración, germinación y crecimiento, dando lugar a plantas doble-haploides de encina.

ES 2 355 455 B1

DESCRIPCIÓN

Método de obtención de embriones haploides y plantas doble-haploides de encina.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se basa en una aplicación de la biotecnología vegetal a la mejora genética de la encina (*Quercus ilex* L.), dirigida a la obtención de embriones haploides y plantas doble-haploides homocigóticas puras (líneas puras) de encina mediante embriogénesis gamética.

10 **Antecedentes**

Las especies forestales como la encina (*Q. ilex* L.) están sometidas a largos ciclos reproductivos que impiden la obtención de líneas puras mediante métodos convencionales, tales como retrocruzamientos.

Este hecho dificulta aún más la mejora genética clásica, ya de por sí lenta, puesto que se necesitan varios años para que las plantas alcancen la madurez sexual.

Por este motivo se ha buscado una alternativa válida para obtener líneas puras en una sola generación gracias a la producción de embriones haploides y plantas doble-haploides de encina, mediante embriogénesis gamética, que es el objeto de la presente invención.

En el estado de la técnica no existen evidencias de la obtención de individuos haploides y doble-haploides de encina, ni mediante técnicas de reproducción convencionales, como el retrocruzamiento, ni mediante la aplicación de técnicas novedosas de biotecnología.

En la patente española ES2180385 se describe un método para la obtención de embriones y plantas haploides de alcornoque, mediante técnicas biotecnológicas de inducción de embriogénesis gamética a partir de células gaméticas de alcornoque. La diferencia entre dicha patente y la presente invención, radica en que, aunque la encina y el alcornoque son especies procedentes de la misma familia, para que la embriogénesis gamética pueda producirse en la encina, se ha descubierto sorprendentemente que es necesario someter a las células gaméticas de la encina (microsporas), a un doble pretratamiento de estrés que actúa como señal o estímulo para desencadenar el programa del desarrollo esporofítico en dichas microsporas, o lo que es lo mismo, desencadena el proceso de inducción de embriogénesis gamética en las mismas.

Es conocido en el estado de la técnica que para inducir embriogénesis gamética en las especies forestales en general y como queda detallado particularmente en la patente española mencionada anteriormente, ES218035, se suelen utilizar pretratamientos que se dan *in vivo* o *in vitro* tanto a botones florales enteros como a las propias anteras o a las microsporas y pueden ser tratamientos físicos, fisiológicos y químicos en forma de choque térmico (de frío o de calor), ayuno (ausencia de azúcar o de nitrógeno en el medio) o tratamientos químicos en la escisión de espigas, anteras o microsporas. Una de las diferencias esenciales del método descrito en la invención reside en el doble pretratamiento, *in vivo* e *in vitro*, que es necesario llevar a cabo para que tenga lugar la embriogénesis de las células gaméticas de la encina y así obtener embriones haploides de encina. Por un lado, se realiza un tratamiento *in vivo* con frío, en los amentos recogidos del propio árbol de la encina y por otro lado, se realiza un tratamiento *in vitro* de choque térmico con calor, en las anteras extraídas de los amentos previamente sometidos a estrés, para inducir la embriogénesis gamética y obtener embriones haploides y plantas doble-haploides de encina. Otra diferencia esencial entre la patente española ES218035 y la presente invención radica en que en la patente española se describe un método para la obtención de embriones y plantas haploides, en cambio en la presente invención se describe un método novedoso para la obtención de embriones haploides y plantas doble-haploides, líneas puras, en una sola generación, que no se habían conseguido obtener hasta el momento, ni mediante métodos convencionales de retrocruzamiento, ni mediante la aplicación de novedosos métodos biotecnológicos. La obtención de líneas puras de encina mediante el método descrito en la presente invención, consigue que se disminuya el tiempo y los costes en el desarrollo de nuevos clones, además de proporcionar individuos con material genético "fijado". Con este término se hace referencia a que en las especies agrícolas en general, se pueden obtener líneas puras mediante autofecundación forzada y continuada durante 7 o más años. Durante dicho proceso de autofecundación forzada, la segregación producida a través de los sucesivos cruza-

mientos y selección de individuos, hace que la forma homocigótica para la combinación génica deseada no se "fije" o no se consiga en su totalidad. Sin embargo, mediante el método descrito en la presente invención, al obtenerse el embrión haploide directamente y de una sola vez, su duplicación hace que la homocigosis obtenida esté plenamente "fijada genéticamente".

Además, la obtención de individuos haploides y doble-haploides de encina, mediante el método descrito en la presente invención, es ventajoso para la mejora genética de la especie, ya que la obtención de individuos homocigóticos facilitará la identificación de genes y proteínas y su estudio para conseguir individuos mejores genéticamente y mejor adaptados a las condiciones específicas del medio en el cual crezcan. Por otro lado, los individuos haploides y doble-haploides permiten realizar eficazmente estudios de mapeo genético en menor tiempo, centrándose en los caracteres de interés en cada estudio realizado. Los individuos haploides son también esenciales en la manipulación genética que se lleve a cabo en esta especie (transformación y estudios transgénicos).

La encina es una de las especies más importantes del ecosistema forestal, la dehesa, del sur europeo. Es necesaria por tanto su conservación tanto desde el punto de vista medioambiental como para la economía rural. El pastoreo excesivo y el problema de la “seca” (infección debida a determinados hongos que ataca a los árboles produciéndoles la muerte) imposibilitan el relevo generacional en las dehesas. Las dehesas, como es conocido, son zonas preferentes de pastoreo del ganado porcino y los productos porcinos son altamente reconocidos a nivel mundial. La falta de regeneración de las dehesas y el problema de la “seca” pone en riesgo su futuro. En este sentido, la obtención de plantas doble-haploides mediante el método descrito en la presente invención, puede utilizarse en repoblación forestal e intentar paliar los problemas mencionados.

10 Descripción de la invención

Breve descripción de la invención

La presente invención describe un método de obtención de embriones haploides de encina (*Quercus ilex* L.) a partir de células gaméticas (microsporas), mediante embriogénesis gamética y que posteriormente son utilizados para la obtención de plantas doble-haploides homocigóticas puras (líneas puras), aplicables a la mejora genética de la encina.

El método consiste en la inducción de la embriogénesis gamética en las microsporas de la encina mediante un doble tratamiento de estrés, inducido mediante choque térmico. En primer lugar, los amentos recogidos directamente de las encinas son sometidos a un primer tratamiento de estrés *in vivo* en frío, y en segundo lugar, las anteras extraídas de los amentos antes mencionados, son sometidas a otro tratamiento de estrés *in vitro*, mediante choque térmico por calor. Ambos pretratamientos inducen el proceso de embriogénesis de las células gaméticas, microsporas, que se encuentran en el interior de dichas anteras y la obtención de embriones haploides. Los embriones haploides obtenidos pueden diploidizarse dando lugar a embriones doble-haploides a los que se les somete posteriormente a un proceso de maduración, germinación y crecimiento, dando lugar a plantas doble-haploides, líneas puras, de encina. Estas plantas de encina, doble-haploides, son homocigóticas (líneas puras) y pueden utilizarse para la mejora genética de dicha especie.

A efectos de la presente invención se hacen constar los siguientes términos:

- Embriogénesis gamética: proceso mediante el cual las células gaméticas, en la presente invención, microsporas, como resultado de un tratamiento de estrés, cambian su programa de desarrollo gametofítico por un programa esporofítico, dando lugar a la formación de embriones haploides que posteriormente se pueden diploidizar, y obtener plantas doble-haploides.
- Haploides: Individuos con un complemento cromosómico.
- Doble-haploides: Individuos con el mismo complemento cromosómico duplicado, por tanto los genes están en homocigosis y son líneas puras.
- Diploides: Individuos con doble complemento cromosómico diferente uno del otro. Los genes pueden estar en heterocigosis y homocigosis).
- Amento: inflorescencia, preferentemente en forma de espiga colgante, formada por flores unisexuales. En su interior se localizan las anteras.
- Antera: parte del estambre de las flores dónde se almacenan las células gaméticas o microsporas.

50 Descripción detallada de la invención

La invención describe un método para la obtención de embriones haploides y plantas doble-haploides de encina a partir de células gaméticas (microsporas), que son sometidas a un doble tratamiento de estrés, que induce la embriogénesis de dichas células gaméticas, obteniéndose los embriones haploides y posteriormente mediante diploidización de los mismos, las plantas doble-haploides homocigóticas puras (líneas puras). Las plantas doble-haploides de encina obtenidas mediante el método descrito en la presente invención son aplicables a la mejora genética de la encina.

Para la obtención de los embriones haploides y las plantas doble-haploides de encina, se parte de la recogida de pequeñas ramas con amentos del propio árbol de encina seleccionado. Esta recogida se realiza preferentemente durante 15 días en los meses de floración de la encina, que dependerán de la zona geográfica en la que se cultiven las mismas. En la encina, la ventana de inducción de embriogénesis es muy estrecha, puesto que las microsporas deben estar en el estado uninucleado tardío o polen bicelular temprano, para que estas microsporas abandonen su programa de desarrollo gametofítico redireccionando su desarrollo hacia una ruta esporofítica que conlleva la formación de embriones haploides que darán lugar posteriormente a plantas haploides, y este proceso solo se produce durante un tiempo determinado. Como se ha comentado anteriormente, la ventana de la inducción de embriogénesis es muy estrecha, puesto que las microsporas deben estar en el estado uninucleado tardío o polen bicelular temprano, para que estas microsporas abandonen su programa de desarrollo gametofítico redireccionando su desarrollo hacia una

ruta esporofítica que conlleva a la formación de embriones haploides que darán lugar posteriormente a plantas doble-haploides, y este proceso solo se produce durante un tiempo determinado, que como hemos mencionado anteriormente, en la encina tiene como fecha tope el periodo de floración de la misma.

5 Los amentos recogidos directamente de los árboles de encina, se someten a un primer pretratamiento de estrés *in vivo* en frío, a una temperatura preferentemente de $4 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 7 ± 2 días. Posteriormente y de manera aséptica, se extraen de los amentos pretratados, las anteras para ser sometidas a otro pretratamiento de estrés *in vitro* en placas Petri, por choque térmico con calor, a una temperatura preferentemente de $33 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 7 ± 2 días en oscuridad y en un medio de cultivo específico que se denomina medio de inducción. Transcurrido dicho tiempo, los cultivos *in vitro* de las anteras son mantenidos en una cámara de cultivo a una temperatura preferentemente de 25°C en oscuridad. Los primeros embriones haploides de encina aparecen aproximadamente entre 1 y 3 meses, tiempo específico de la encina.

15 Los medios de cultivo utilizados en la presente invención, tanto para favorecer la inducción, proliferación, maduración y germinación, ya sea tanto de los embriones haploides, como de los embriones doble-haploides, hasta obtener la planta doble-haploide, están formados por un medio de cultivo basal llamado SM al que se le adicionan determinados componentes específicos para favorecer cada uno de los procesos específicos que se describen en la presente invención, hasta obtener la planta de encina doble-haploide.

20 El medio de cultivo basal, al que hemos llamado SM, está compuesto por:

- Solución de macronutrientes: KCl, $\text{Cl}_2\text{Ca}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, NO_3K ó NO_3Na , $\text{SO}_4\text{Mg}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, y $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}\cdot \text{H}_2\text{O}$ o PO_4HNa_2 .
- 25 • Solución de micronutrientes: solución 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 Na_2EDTA (etilendiamino tetraacetato de sodio).
- Cofactores: Piridoxina, Inositol, Tiamina, Ácido ascórbico, Ácido nicotínico y Glicina.

30 El pH del medio de cultivo se ajusta entre 5,5 y 5,7.

35 El medio de inducción mencionado anteriormente está compuesto por medio de cultivo basal SM además de 90 mM de sacarosa y 1% de carbón activo. La presencia de carbón activo en este medio de inducción es requerida ya que, en los cultivos *in vitro*, la oxidación fenólica que se produce puede ocasionar serios problemas en el establecimiento y supervivencia de los explantes. Cuando los tejidos son dañados, éstos liberan compuestos fenólicos que se manifiestan con un ennegrecimiento del medio de cultivo alrededor del explante y que se puede extender a todo el medio, provocar daños que impidan el crecimiento y hasta la muerte del explante. Para contrarrestar el efecto de la oxidación fenólica, se agregan antioxidantes al medio de cultivo (en la presente invención se utiliza carbón activo), que son inhibidores de las enzimas específicas que participan en esos procesos de oxidación. El carbón activo también es utilizado como adsorbente de compuestos tóxicos de la microatmósfera gaseosa que se produce en las cámaras de cultivo y de los reguladores de crecimiento en exceso que están presentes en dichos medios de cultivo.

45 En este sentido, durante el proceso de extracción de las anteras de los amentos de la encina, aunque se realiza manualmente y con sumo cuidado, siempre provoca algún daño que hace liberar compuestos fenólicos. El carbón activo absorbe todo lo deletéreo y presente en exceso en los cultivos *in vitro* de embriones de encina y además facilita la inducción de los mismos, sin la presencia de dicho carbón activo en el medio la inducción, dicho proceso no se produciría.

50 Los embriones haploides de encina obtenidos mediante el método descrito son transferidos a un medio de cultivo específico llamado medio de proliferación, que como su nombre indica favorece la proliferación y el crecimiento de dichos embriones. Estos embriones haploides son cultivados en una cámara en oscuridad y a una temperatura preferentemente de 25°C . El medio de proliferación está formado por el medio de cultivo basal SM + 500 mg/L de glutamina + 90 mM de sacarosa. La glutamina es un aminoácido utilizado para la proliferación de embriones en cultivo *in vitro* obtenidos mediante embriogénesis gamética, que favorece la proliferación de dichos embriones.

60 Para la obtención de embriones doble-haploides a partir de los embriones haploides se utilizan agentes antimitóticos como por ejemplo la Orizalina o el Amipprofos-metil. La aplicación *in vitro* de agentes antimitóticos hace que se interrumpa la mitosis durante el ciclo celular mediante la inhibición de la formación de microtúbulos, duplicándose así el número de cromosomas y obteniéndose embriones doble-haploides.

65 Posteriormente los embriones doble-haploides obtenidos son transferidos a un medio de cultivo específico llamado medio de maduración, que como su nombre indica favorece la maduración de dichos embriones doble-haploides. Para obtener dichos embriones maduros se mantienen en cultivo en dicho medio de maduración durante un tiempo aproximado de un mes y a una temperatura preferentemente de 25°C y en oscuridad. El medio de maduración, que es igual que el medio de inducción mencionado anteriormente, está formado por el medio de cultivo basal SM + 90 mM de sacarosa + 1% carbón activo. La presencia de carbón activo en este medio tiene la misma función que en el medio de inducción, adsorbe todo lo sobrante, y presente en exceso en el medio de cultivo y además favorece la maduración

del embrión. La incorporación de carbón activo al medio de cultivo, además de producir un aumento de la calidad de los embriones maduros (mayor tamaño y peso), también permite un control eficaz sobre la embriogénesis secundaria, necesaria para que la maduración de los embriones se realice correctamente.

5 Una vez conseguidos los embriones doble-haploides maduros, se mantienen en cultivo en medio de maduración durante un mínimo de dos meses a una temperatura preferentemente de $4 \pm 2^\circ\text{C}$, para romper lo que se conoce en el estado de la técnica como periodo de latencia o letargo. En general, la mayoría de las semillas y más si son forestales, tienen un periodo de letargo o latencia hasta que se produce la germinación. Dicho periodo de letargo, generalmente en su medio natural, se suele romper con frío. Los embriones doble-haploides de encina actúan como “semillas” ya
10 que forman raíz, tallo y posteriormente una planta, (aunque su origen biotecnológico es distinto que el de la semilla), de ahí que para que se produzca la germinación de dichos embriones doble-haploides, sea necesario romper dicho letargo o latencia.

Posteriormente, los embriones doble-haploides son transferidos a un medio de germinación, que favorece, como su
15 nombre indica, la germinación de dichos embriones gracias a la presencia en el mismo de hormonas específicas para la inducción del crecimiento del tallo y la formación de la planta doble-haploide de encina. Estas hormonas son la 6-Bencilaminopurina (BAP) y el ácido 3-Indol-butírico (IBA). Para favorecer también dicha germinación, los embriones son cultivados preferentemente a una temperatura de 25°C en presencia de luz (fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad). El medio de germinación está formado por medio de cultivo basal SM+ 30 mM de sacarosa + 0.05 mg/L de BAP +
20 0.1 mg/L de IBA. Las plantas germinadas son aclimatadas en invernaderos.

Mediante el método descrito en la presente invención, las plantas de encina obtenidas no son nuevas variedades vegetales.

25 Así, el primer objeto de la presente invención es un método para la obtención de embriones haploides y/o plantas doble-haploides de encina que comprende:

a) Recogida de amentos de encina durante el periodo de floración del árbol.

30 b) Tratamiento *in vivo* en frío de los amentos recogidos.

c) Extracción aséptica de las anteras del interior de los amentos previamente tratados en el paso anterior.

35 d) Tratamiento *in vitro* mediante cultivo en un medio de inducción de las anteras del paso anterior mediante choque térmico.

e) Mantener en cultivo las anteras del paso anterior hasta la aparición de los embriones haploides.

40 f) Transferir los embriones haploides obtenidos en el paso anterior a un medio de proliferación, y que además comprende los pasos de:

g) Obtener embriones dobles-haploide mediante la aplicación *in vitro* de agentes antimitóticos.

45 h) Transferir los embriones doble-haploides obtenidos en el paso anterior a un medio de maduración

i) Someter al frío a los cultivos de embriones doble-haploides maduros obtenidos en el paso anterior.

50 j) Transferir los embriones doble-haploides del paso anterior a un medio de germinación para obtener plantas doble-haploides.

k) Transferir las plantas doble-haploides obtenidas en el paso anterior a recipientes adecuados para su crecimiento y aclimatación en invernadero.

55 En una realización preferida el método de la invención se caracteriza porque el tratamiento *in vivo* en frío de los amentos se realiza a una temperatura, preferentemente de $4 \pm 2^\circ\text{C}$ y durante un tiempo, preferentemente de 7 ± 2 días.

60 En otra realización preferida el método de la invención se caracteriza porque las células gaméticas presentes en el interior de las anteras, extraídas de los amentos recogidos del árbol de encina, se encuentran en estadio uninucleado tardío o polen bicelular temprano.

En otra realización preferida el método de la invención se caracteriza porque el choque térmico *in vitro* de las anteras se realiza a una temperatura, preferentemente de $33 \pm 2^\circ\text{C}$ durante un tiempo, preferentemente de 7 ± 2 días y preferentemente, en condiciones de oscuridad.

65 En otra realización preferida el método de la invención se caracteriza porque el cultivo en un medio de inducción de las anteras, hasta la aparición de embriones haploides, se realiza a una temperatura, preferentemente de 25°C y durante un tiempo, preferentemente de 1 a 3 meses y preferentemente, en condiciones de oscuridad.

En otra realización preferida el método de la invención se caracteriza porque los embriones haploides obtenidos se cultivan en un medio de proliferación a una temperatura, preferentemente de 25°C y preferentemente, en condiciones de oscuridad.

5 En otra realización preferida el método de la invención se caracteriza porque los embriones doble- haploides se cultivan en medio de maduración durante un tiempo, preferentemente de 1 mes a una temperatura, preferentemente de 25°C y preferentemente, en condiciones de oscuridad.

10 En otra realización preferida el método de la invención se caracteriza porque la temperatura de frío a la que son sometidos los embriones doble-haploides es preferentemente de 2-5°C y durante un tiempo de al menos 2 meses.

En otra realización preferida el método de la invención se caracteriza porque el cultivo de los embriones doble-haploides en medio de germinación se realiza a una temperatura, preferentemente de 25°C y preferentemente en condiciones de luminosidad.

15 En otra realización preferida el método de la invención se caracteriza porque el medio de inducción está formado preferentemente por un medio de cultivo basal SM, carbón activo y una fuente de carbono.

20 En otra realización preferida el método de la invención se caracteriza porque el medio de proliferación está formado preferentemente por un medio de cultivo basal SM, glutamina y una fuente de carbono.

En otra realización preferida el método de la invención se caracteriza porque el medio de maduración está formado preferentemente por un medio de cultivo basal SM, carbón activo y una fuente de carbono.

25 En otra realización preferida el método de la invención se caracteriza porque el medio de germinación está formado preferentemente por un medio de cultivo basal SM, hormonas de crecimiento y una fuente de carbono.

El medio de cultivo basal SM, mencionado anteriormente, está formado por una solución de macronutrientes, una solución de micronutrientes, hierro quelado y cofactores, ajustándose el valor de pH preferentemente entre 5.5-5.7. La solución de macronutrientes utilizada preferentemente comprende: KCl a una concentración preferentemente de entre 0,30 a 0,95 g/L, $\text{Cl}_2\text{Ca}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a una concentración preferentemente de entre 0,12 a 0,15 g/L, $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ a una concentración preferentemente de entre 0,13 a 0,20 g/L, NO_3K ó NO_3Na a una concentración preferentemente de entre 0,75 a 1,00 g/L, $\text{SO}_4\text{Mg}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a una concentración preferentemente de entre 0,20 a 0,31 g/L, $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}\cdot \text{H}_2\text{O}$ a una concentración preferentemente de entre 0,09 a 0,15 g/L y PO_4HNa_2 a una concentración preferentemente de 0,03 g/L. La solución de micronutrientes utilizada preferentemente comprende: BO_3H_3 a una concentración preferentemente de 6,200 mg/L, $\text{SO}_4\text{Mn}\cdot \text{H}_2\text{O}$ a una concentración preferentemente de 16,900 mg/L, $\text{SO}_4\text{Zn}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a una concentración preferentemente de 10,590 mg/L, IK a una concentración preferentemente de 0,830 mg/L, $\text{MoO}_4\text{Na}\cdot 2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a una concentración preferentemente de 0,250 mg/L, $\text{SO}_4\text{CU}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a una concentración preferentemente de 0,025 mg/L y $\text{Cl}_2\text{CO}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a una concentración preferentemente de 0,025 mg/L. El hierro quelado se añade preferentemente en forma de Fe-EDTA. Los cofactores empleados preferentemente son: Piridoxina a una concentración, preferentemente de 5 μM , Tiamina a una concentración, preferentemente de 3 μM , Ácido ascórbico a una concentración, preferentemente de 10 μM , Ácido nicotínico a una concentración, preferentemente de 10 μM , Glicina a una concentración, preferentemente de 10 μM e Inositol a una concentración, preferentemente de 250 μM .

45 La concentración de carbón activo utilizada en los medios de inducción o maduración es preferentemente del 1% (w/v).

La fuente de carbono utilizada en los medio de inducción, proliferación, maduración y germinación es preferentemente sacarosa a una concentración de preferentemente 90 mM (medios de inducción, proliferación y maduración) o 30 mM (medio de germinación).

50 La concentración de glutamina utilizada en el medio de proliferación es preferentemente 500 mg/L.

55 En otra realización preferida el método de la invención se caracteriza porque los agentes antimitóticos se seleccionan preferentemente entre orizalina ó amiprofosmetil y se añaden a una concentración preferentemente de 0.01 mM.

En otra realización preferida el método de la invención se caracteriza porque las hormonas utilizadas son preferentemente ácido 3-Indol-Butírico, que se añade al medio de cultivo a una concentración preferentemente de 0.1 mg/mL y 6-Bencilaminopurina que se añade al medio de cultivo a una concentración preferentemente de 0.05 mg/L.

60 El segundo objeto de la presente invención es el embrión haploide de encina obtenible mediante el método descrito anteriormente.

El tercer objeto de la presente invención es el embrión doble-haploide de encina obtenible mediante el método descrito anteriormente.

65 El cuarto objeto de la presente invención es la planta doble-haploide de encina obtenible mediante el método descrito anteriormente.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos tienen únicamente fines ilustrativos y no pretenden ser, ni deben considerarse, una limitación del alcance de la invención.

5

Ejemplo 1

Obtención de embriones haploides de encina mediante embriogénesis gamética

10

En la época de floración de la encina se recogen directamente del árbol seleccionado pequeñas ramas con amentos durante un periodo de 15 días. Para la realización del presente ejemplo se han utilizado encinas de la zona centro de España y se han recogido los amentos durante un periodo de 15 días, máximo en el mes de Abril, que es el periodo apropiado en la zona centro de España. Como se ha comentado anteriormente, la ventana de la inducción de embriogénesis es muy estrecha, puesto que las microsporas deben estar en el estado uninucleado tardío o polen bicelular temprano para que estas microsporas abandonen su programa de desarrollo gametofítico redireccionando su desarrollo hacia una ruta esporofítica que conlleva a la formación de embriones haploides que darán lugar posteriormente a plantas doble-haploides. Como método de control para asegurar que las microsporas presentes en el interior de las anteras de los amentos recogidos se encuentran en las fases uninuclear tardía o polen bicelular temprano se realiza manualmente un “aplastamiento” de la antera para romperla y posteriormente se tiñe mediante una tinción específica, DAPI (4'-6'-diamidino-2-fenilindol), que permite visualizar los núcleos de las células gaméticas al microscopio de fluorescencia y comprobar que se encuentran en dichas fases. Una vez se ha realizado dicho proceso de control, los amentos recogidos directamente del árbol son sometidos a un pretratamiento *in vivo* en frío a una temperatura de $4 \pm 2^\circ\text{C}$ durante aproximadamente 7 ± 2 días. Posteriormente y en condiciones asépticas, se procede a la extracción manual de las anteras de dichos amentos para establecerlas en cultivo en placas Petri con medio de inducción.

25

El medio de inducción está compuesto por el medio de cultivo basal SM + 1% de carbón activo + 90 mM de sacarosa. La esterilización de dicho medio de cultivo se realiza en autoclave entre 0,5 y 1 atmósferas ($115-120^\circ\text{C}$) durante 20 minutos. El medio basal SM específico está formado por:

30

Sales minerales macronutrientes:

35

KCl 0,30 a 0,95 g/l

$\text{Cl}_2\text{Ca}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,12 a 0,15 g/l

$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 0,13 a 0,20 g/l

40

NO_3K ó NO_3Na 0,75 a 1,00 g/l

$\text{SO}_4\text{Mg}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,20 a 0,31 g/l

$\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}\cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,09 a 0,15 g/l

45

PO_4HNa_2 (opcional) 0,03 g/l

50

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

BO_3H_3 6,200 mg/l

$\text{SO}_4\text{Mn}\cdot \text{H}_2\text{O}$ 16,900 mg/l

55

$\text{SO}_4\text{Zn}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10,590 mg/l

IK 0,830 mg/l

60

$\text{MoO}_4\text{Na}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 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

65

Además también posee 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 Na_2EDTA (etilendiamino tetraacetato de sodio).

Cofactores: empleándose preferentemente los siguientes:

Piridoxina	5 μ M
Tiamina	3 μ M
Acido ascórbico	10 μ M
Acido nicotínico	10 μ M
Glicina	10 μ M
Inositol	250 μ M

Una vez establecido dicho cultivo, se aplica un segundo pretratamiento de estrés *in vitro* a dichas anteras que consiste en un choque térmico a una temperatura de $33 \pm 2^\circ\text{C}$ durante aproximadamente 7 ± 2 días en oscuridad.

Posteriormente, estos cultivos se mantienen en una cámara de cultivo a una temperatura de 25°C en condiciones de oscuridad. Los primeros embriones haploides aparecen entre aproximadamente los meses 1 y 3 de cultivo, tiempo específico de aparición de los embriones de encina.

Los embriones haploides de encina formados, para continuar con su crecimiento óptimo, son transferidos a medio de proliferación, continuando su crecimiento en dicho medio en las mismas condiciones que las mencionadas anteriormente, en una cámara de cultivo a una temperatura de 25°C en condiciones de oscuridad. EL medio de proliferación está compuesto por medio de cultivo basal SM + 500 mM de glutamina + 90 mM de sacarosa.

Ejemplo 2

Obtención de embriones doble-haploides de encina

Una vez obtenidos los embriones haploides de encina y mantenidos en cultivo en medio de proliferación según se describe en el Ejemplo 1, dichos embriones son sometidos a un tratamiento *in vitro* con agentes antimitóticos, haciendo que se interrumpan los procesos de mitosis producidos durante el ciclo celular en dichos embriones, duplicándose así el número de cromosomas y obteniéndose embriones doble-haploides de encina, que darán lugar a plantas doble haploides de encina. Los agentes antimitóticos utilizados son Orizalina ó Amiprofos-metil, pudiéndose utilizar cualquier otro conocido en el estado de la técnica, y son añadidos al medio de proliferación en el cual crecen los embriones haploides, a una concentración de 0.01 mM.

Posteriormente los embriones doble-haploides se transfieren a un medio de maduración y se mantienen en cultivo a una temperatura preferentemente de 25°C en condiciones de oscuridad durante aproximadamente un mes. El medio de maduración en el cual crecen dichos embriones doble- haploides es similar al medio de inducción de los embriones haploides, compuesto por medio de cultivo basal SM + 1% de carbón activo + 90 mM de sacarosa.

Ejemplo 3

Obtención de plantas doble-haploides de encina

Los embriones doble-haploides de encina maduros obtenidos según se describe en el Ejemplo 2, son sometidos en el propio medio de maduración, durante 2 meses, a una temperatura preferentemente de $4 \pm 2^\circ\text{C}$ para romper la latencia de los mismos y comenzar el proceso de germinación.

Transcurrido dicho periodo de tiempo, los embriones doble-haploides son transferidos a medio de germinación y se mantienen en cultivo a una temperatura preferentemente de 25°C en presencia de luz con un fotoperiodo de 16 h de luz, 8 h de oscuridad, para estimular la germinación de los mismos y obtener las plantas doble-haploides, líneas puras, de encina. El medio de germinación está formado por medio de cultivo basal SM + 30 mM de sacarosa + 0.05 mg/L BAP + 0.1 mg/L IBA. La presencia en el medio de germinación de las hormonas mencionadas favorece el crecimiento del tallo y la formación de la planta doble-haploide de encina.

Las plantas doble-haploides germinadas de encina, se pueden transplantar a envases o recipientes específicos para que continúen su crecimiento y aclimatación en invernaderos.

REIVINDICACIONES

1. Método para la obtención de embriones haploides de encina que comprende:

5 a) Recogida de amentos de encina durante el periodo de floración del árbol.

b) Tratamiento *in vivo* en frío, de los amentos recogidos.

10 c) Extracción aséptica de las anteras del interior de los amentos previamente tratados en el paso anterior.

d) Tratamiento *in vitro* mediante cultivo en un medio de inducción de las anteras del paso anterior, por choque térmico.

15 e) Mantener en cultivo las anteras del paso anterior hasta la aparición de los embriones haploides.

f) Transferir los embriones haploides obtenidos en el paso anterior a un medio de proliferación.

20 2. Método para la obtención de embriones doble-haploides que consiste en llevar a cabo el método de la reivindicación 1 y, adicionalmente, someter a los embriones haploides obtenidos en la etapa f) a los siguientes pasos:

g) Cultivar en un medio de proliferación al que se añaden agentes antimitóticos los embriones haploides obtenidos en la etapa f)

25 h) Transferir los embriones doble-haploides obtenidos en el paso anterior a un medio de maduración y cultivarlos.

30 3. Método para la obtención de plantas doble-haploides que consiste en llevar a cabo el método de la reivindicación 2 y, adicionalmente, someter a los embriones doble-haploides obtenidos en la etapa h) a los siguientes pasos:

i) Someter a frío los cultivos de embriones doble-haploides maduros obtenidos en la etapa h).

35 j) Transferir los embriones doble-haploides del paso anterior a un medio de germinación y cultivarlos hasta que germinen como plantas doble-haploides.

k) Transferir las plantas doble-haploides obtenidas en el paso anterior a recipientes adecuados para su crecimiento y aclimatación en invernadero.

40 4. Método según la reivindicación 1 **caracterizado** porque el tratamiento *in vivo* en frío, de los amentos se realiza a una temperatura de $4 \pm 2^\circ\text{C}$ y durante un tiempo de 7 ± 2 días.

45 5. Método según la reivindicación 1 **caracterizado** porque las células gaméticas presentes en el interior de las anteras extraídas previamente de los amentos recogidos del árbol de encina, se encuentran en estadio uninucleado tardío o polen bicelular temprano.

6. Método según la reivindicación 1 **caracterizado** porque el el tratamiento *in vitro*, mediante choque térmico de las anteras se realiza a una temperatura de $33 \pm 2^\circ\text{C}$ durante un tiempo de 7 ± 2 días y en condiciones de oscuridad.

50 7. Método según la reivindicación 1 **caracterizado** porque el cultivo en un medio de inducción de las anteras, hasta la aparición de embriones haploides, se realiza a una temperatura de 25°C y durante un tiempo de 1 a 3 meses y en condiciones de oscuridad.

55 8. Método según la reivindicación 1 **caracterizado** porque los embriones haploides obtenidos se cultivan en un medio de proliferación a una temperatura de 25°C y en condiciones de oscuridad.

9. Método según la reivindicación 2 **caracterizado** porque los embriones doble-haploides se cultivan en medio de maduración durante un tiempo de 1 mes a una temperatura de 25°C y en condiciones de oscuridad.

60 10. Método según la reivindicación 3 **caracterizado** porque la temperatura de frío a la que son sometidos los embriones doble-haploides es de $2 \text{ a } 5^\circ\text{C}$ y durante un tiempo de al menos 2 meses.

11. Método según la reivindicación 3 **caracterizado** porque el cultivo de los embriones doble-haploides en medio de germinación se realiza a una temperatura de 25°C y en condiciones de luminosidad.

65 12. Método según la reivindicación 1 **caracterizado** porque el medio de inducción está formado por un medio de cultivo basal SM, carbón activo y una fuente de carbono.

13. Método según las reivindicaciones 1 o 2 **caracterizado** porque el medio de proliferación está formado por un medio de cultivo basal SM, glutamina y una fuente de carbono.
14. Método según la reivindicación 2 **caracterizado** porque el medio de maduración está formado por un medio de cultivo basal SM, carbón activo y una fuente de carbono.
15. Método según la reivindicación 3 **caracterizado** porque el medio de germinación está formado por un medio de cultivo basal SM, hormonas de crecimiento y una fuente de carbono.
16. Método según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15 **caracterizado** porque el medio de cultivo basal SM está formado por una solución de macronutrientes, una solución de micronutrientes, hierro quelado y cofactores, ajustándose el valor de pH entre 5.5-5.7.
17. Método según la reivindicación 16 **caracterizado** porque la solución de macronutrientes utilizada comprende: KCl a una concentración de entre 0,30 a 0,95 g/L, $\text{Cl}_2\text{Ca}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a una concentración de entre 0,12 a 0,15 g/L, $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ a una concentración de entre 0,13 a 0,20 g/L, NO_3K ó NO_3Na a una concentración de entre 0,75 a 1,00 g/L, $\text{SO}_4\text{Mg}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a una concentración de entre 0,20 a 0,31 g/L, $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}\cdot \text{H}_2\text{O}$ a una concentración de entre 0,09 a 0,15 g/L y PO_4HNa_2 a una concentración de 0,03 g/L.
18. Método según la reivindicación 16 **caracterizado** porque la solución de micronutrientes utilizada comprende: BO_3H_3 a una concentración de 6,200 mg/L, $\text{SO}_4\text{Mn}\cdot \text{H}_2\text{O}$ a una concentración de 16,900 mg/L, $\text{SO}_4\text{Zn}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a una concentración de 10,590 mg/L, IK a una concentración de 0,830 mg/L, $\text{MoO}_4\text{Na}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a una concentración de 0,250 mg/L, $\text{SO}_4\text{Cu}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a una concentración de 0,025 mg/L y $\text{Cl}_2\text{CO}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a una concentración de 0,025 mg/L.
19. Método según la reivindicación 16 **caracterizado** porque el hierro quelado se añade en forma de Fe-EDTA.
20. Método según la reivindicación 16 **caracterizado** porque los cofactores empleados son: Piridoxina a una concentración de 5 μM , Tiamina a una concentración de 3 μM , Ácido ascórbico a una concentración de 10 μM , Ácido nicotínico a una concentración de 10 μM , Glicina a una concentración de 10 μM e Inositol a una concentración de 250 μM .
21. Método según cualquiera de las reivindicaciones 12 o 14 **caracterizado** porque el carbón activo se utiliza en una proporción de 1% (w/v).
22. Método según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14 **caracterizado** porque como fuente de carbono se utiliza sacarosa a una concentración de 90 mM.
23. Método según la reivindicación 15 **caracterizado** porque como fuente de carbono se utiliza sacarosa a una concentración de 30 mM.
24. Método según la reivindicación 13 **caracterizado** porque la concentración de glutamina utilizada es 500 mM.
25. Método según la reivindicación 2 **caracterizado** porque los agentes antimetabólicos se seleccionan entre orizalina ó amiprofosmetil y se añaden a una concentración de 0.01 mM.
26. Método según la reivindicación 15 **caracterizado** porque las hormonas utilizadas son ácido 3-Indol-Butírico y 6-Bencilaminopurina
27. Método según la reivindicación 26 **caracterizado** porque el ácido 3 Indol-Butírico se añade a una concentración en el medio de cultivo de 0.1 mg/L y la 6-Bencilaminopurina se añade a una concentración en el medio de cultivo de 0.05 mg/L.
28. Embrión haploide de encina obtenible mediante el método descrito en la reivindicación 1, 4 a 8, 12, 13, 16 a 22 y 24.
29. Embrión doble-haploide de encina obtenible mediante el método descrito en las reivindicaciones 2, 9, 13, 14, 16 a 22, 24 y 25.
30. Planta doble-haploide de encina obtenible mediante el método descrito en las reivindicaciones 3, 10, 11, 15 a 20, 23, 26 y 27.



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200930686

②② Fecha de presentación de la solicitud: 11.09.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **A01H4/00** (01.01.2006)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	JAIN S.M. et al. Protocols for micropropagation of woody trees and fruits. 2007. Páginas 163-172. (Recuperado el 02.02.2011). Recuperado de internet: http://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=ZwhVViy0sCUC&oi=fnd&pg=PA163&dq=Antimitotic+agents+increase+the+production+of+doubled-haploid+embryos+from+cork+oak+anther+culture&ots=KF8t_OUBi6&sig=yTk0m_odaHmN06Z8PxSGOmRDcZM#v=onepage&q&f=false	1-16,19,21,23-30
A	ES 2180385 A1 (UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID) 01.02.2003	1-30
A	PINTOS B. et al. Antimitotic agents increase the production of doubled-haploid embryos from cork oak anther culture. 2007. <i>Journal of Plant Physiology</i> . Vol. 164. Páginas 1595-1604.	1-30

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

03.02.2011

Examinador

I. Rueda Molins

Página

1/4

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, WPI, TXT

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 03.02.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-30	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 17, 18, 20, 22	SI
	Reivindicaciones 1-16, 19, 21, 23-30	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 se publica.

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	JAIN S.M. et al. Protocols for micropropagation of woody trees and fruits. Páginas 163-172. (Recuperado el 02.02.2011). Recuperado de internet: http://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=ZwhWViy0sCUC&oi=fnd&pg=PA163&dq=Antimitotic+agents+increase+the+production+of+doubled-haploid+embryos+from+cork+oak+anther+culture&ots=KF8t_OUBi6&sig=yTk0m_odaHmN06Z8PxSGOmRDcZM#v=onepage&q&f=false	2007
D02	ES 2180385 A1 (UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID)	01.02.2003
D03	PINTOS B. et al. Antimitotic agents increase the production of doubled-haploid embryos from cork oak anther culture. <i>Journal of Plant Physiology</i> . Vol. 164. Páginas 1595-1604.	2007

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 solicitud de patente divulga un método para la obtención de embriones haploides, embriones doble-haploides y plantas doble-haploides de encina (*Quercus ilex* L.).

El documento D01, que es el que refleja el estado de la técnica más cercano, muestra un método para la obtención de embriones haploides, embriones doble-haploides y plantas doble-haploides de alcornoque (*Quercus suber* L.).

1. NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Artículos 6 y 8 LP 11/1986)

En las reivindicaciones 1-30 de la solicitud de patente se reivindica un método para la obtención de embriones haploides, embriones doble-haploides y plantas doble-haploides de *Quercus ilex* L. De entre las diferentes etapas que comprende este método, en la descripción de la solicitud de patente (en las páginas 1 y 2), se resalta la importancia de las etapas relacionadas con el doble pretratamiento, *in vivo* e *in vitro* que comprende dicho método. Es más, en los antecedentes descritos en la solicitud de patente (página 1) se cita el documento ES 2180385, que refleja un método para la obtención de embriones y plantas haploides de *Quercus suber* L. que no comprende un doble pretratamiento *in vivo* e *in vitro*, por lo que la aplicación del mismo método a la especie *Quercus ilex* L. no produciría un resultado satisfactorio, tal y como se refleja en la página 1 de la solicitud de patente.

El documento D01, que es el que refleja el estado de la técnica más cercano, muestra (en las páginas 163-172) un método para la obtención de embriones haploides, embriones doble-haploides y plantas doble-haploides de *Quercus suber* L. Dicho método comprende etapas relacionadas con el doble pretratamiento *in vivo* e *in vitro*, es más, todas las etapas que comprende dicho método son coincidentes con las etapas que comprende el método reivindicado en la solicitud de patente.

Es decir, las diferencias entre la solicitud de patente y el documento D01 residen en que un mismo método de obtención de embriones haploides, embriones doble-haploides y plantas doble-haploides es empleado en *Quercus suber* L., en el caso del documento D01 y en *Quercus ilex* L., en el caso de la solicitud de patente. Puesto que *Q. ilex* L. y *Q. suber* L. son especies vegetales cercanas, pertenecientes al mismo género, resultaría evidente para un experto en la materia la aplicación del mismo método de obtención de embriones para ambas especies vegetales. Por tanto, las reivindicaciones 1-16, 19, 21, 23-30 presentan novedad, pero no actividad inventiva según lo establecido en los Artículos 6 y 8 LP 11/1986.