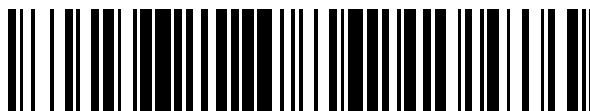


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 353**

51 Int. Cl.:

**A01H 4/00** (2006.01)

**A01H 17/00** (2006.01)

**C12N 15/82** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07794611 .9**

96 Fecha de presentación: **07.05.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2150100**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.02.2010**

54 Título: **Método para la micropropagación de monocotiledóneas basado en cultivos celulares totipotentes continuos**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**11.10.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**11.10.2012**

73 Titular/es:  
**UNIVERSITY OF SOUTH CAROLINA  
109 OSBORNE ADMINISTRATION BLDG.  
COLUMBIA, SOUTH CAROLINA 29208, US**

72 Inventor/es:  
**MÁRTON, Lázló y  
CZAKO, Mihaly**

74 Agente/Representante:  
**de Elizaburu Márquez, Alberto**

ES 2 388 353 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Método para la micropropagación de monocotiledóneas basado en cultivos celulares totipotentes continuos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a nuevos métodos para la micropropagación a gran escala de plantas de la clase *Monocotyledoneae*.

Antecedentes de la invención

10 La regeneración de plantas a partir de células cultivadas de la gran mayoría de especies de monocotiledóneas (principalmente las gramíneas) que se han descrito hasta ahora se consigue de callos iniciados a concentraciones elevadas de una auxina potente, tal como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (Conger, B. V. et al., *Current issues in plant molecular and cellular biology*, págs. 59-68 (1995)). La auxina sintética, el 2,4-D, se considera que es la mejor hormona vegetal para inducir el callo embriogénico. El callo embriogénico se obtiene típicamente de las monocotiledóneas mediante la inducción del cultivo celular primario en un medio que contiene una o más hormonas vegetales de tipo auxina seguido de una etapa de cultivo secundario en menos cantidad de auxina, pero en presencia de una hormona vegetal de tipo citocinina. El potencial embriogénico de los cultivos celulares de las monocotiledóneas disminuye con el tiempo, lo que hace necesario el reinicio del cultivo celular primario (patente de los Estados Unidos n.º 6 153 812 expedida el 28 de noviembre de 2000; Trigiano y Gray, *Plant tissue culture concepts and laboratory exercises*. 2.ª ed., Boca Raton: CRC Press (2000)).

15 Las plantas de la clase *Monocotyledoneae* a menudo son plantas que se dedican a varios usos. La caña común (*Arundo donax*), por ejemplo, se ha utilizado durante 5000 años para construir instrumentos con tubos y es la fuente de caña para los clarinetes y los tubos de los órganos. Incluso con la tecnología moderna de hoy en día, la mayor parte de las cañas para los instrumentos musicales de viento todavía se fabrican de los tallos de *A. donax*.

20 La caña común también se utiliza para el control de la erosión y tiene un gran potencial para uso como cultivo para energía (Szabo, P et al., *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, 36: 179-190 (1996)). Los tallos también se utilizan para las cañas de pesca, bastones para caminar, celosías y esterillas en la construcción de cabañas de adobe. La caña común también es una fuente de celulosa industrial para la fabricación de papel y rayón, y para la producción de otros polisacáridos (Neto, C. P. et al., *Ind. Crops & Prods.*, 6: 51-58 (1997)). Incluso se la ha considerado una fuente de pasta para fabricar papel. Adicionalmente, la caña común también se puede utilizar en los intentos de biorremediación para retirar los contaminantes medioambientales del agua y de superficies terrestres.

25 La caña común es sólo una de las muchas monocotiledóneas que muestran tal multitud de usos. Tanto si se utiliza como decoración, como fuente de energía o como vehículo útil para llevar a cabo procesos industriales, tales plantas de tipo herbáceo son importantes.

30 Los presentes inventores han encontrado que los cultivos de callos inducidos con 2,4-D obtenidos de segmentos nodales de la caña común y de segmentos de inflorescencias inmaduras no consiguen mantener la producción de cultivos celulares embriogénicos ni de embriones incluso después de transferirlos a auxina en baja concentración o sin auxina en combinación con una citocinina, que es lo que se suele poner en práctica (patente de los Estados Unidos n.º 6 153 812 expedida el 28 de noviembre de 2000; Trigiano y Gray, *Plant culture concepts and laboratory exercises*. 2.ª ed., Boca Raton: CRC Press (2000)). El hallazgo de que estos métodos no consiguen producir cultivos embriogénicos lo corroboran Tóth y Mix-Wagner, y Linder y Gallagher, en donde Tóth y Mix-Wagner describieron la formación de callos que se reivindicó que eran embriogénicos, pero sin conseguir la obtención de embriones ni la regeneración vegetal, y Linder y Gallagher anunciaron la antigua regeneración vegetal a partir de callos sin el potencial para la propagación de masa (Tóth y Mix-Wagner, *Sustainable agriculture for food, energy and industry: strategies towards achievement: proceedings of the international conference held in Braunschweig*, Alemania, junio de 1997, N. El Bassam et al., eds. James y James (Science Publishers) Ltd: Londres, págs. 249-253 (1998); Linder y Gallagher, resumen n.º 257, *American Journal of Botany*, 85(6): 89 (1998)). Liu, *J. Plant Physiol.*, 141, 714-720; (1993), describe un tratamiento de conservación en frío de precultivos para la caña de azúcar que mejoró la frecuencia de los callos.

35 Por consiguiente, sería útil disponer de métodos para la micropropagación y la macropropagación a gran escala de *Arundo donax* y de otras plantas monocotiledóneas. Por lo tanto, la presente invención da a conocer un conjunto completo de métodos para producir, propagar, mantener, conservar, transportar y desplegar cultivos celulares embriogénicos continuos, así como cultivos secundarios y terciarios de tejidos totipotentes procedentes de especies vegetales de la clase *Monocotyledoneae* y de las líneas vegetales de élite derivadas de la misma. La tecnología de micropropagación vegetal de la presente invención basada en los cultivos embriogénicos continuos proporciona una eficiencia sin precedentes.

Compendio de la invención

55 La presente invención da a conocer un conjunto completo de métodos para el inicio, micropropagación de masa, mantenimiento, conservación, transporte y/o despliegue de propágulos. La presente invención da a conocer además

5 métodos para mejorar mejora genética somaclonal de la familia de hierbas monocotiledóneas y especies vegetales de junco mediante la tecnología de inducción y mantenimiento del cultivo celular embriogénico continuo que se describe en la presente memoria. Por lo tanto, los métodos de la presente invención pueden proporcionar clones vegetales mejores en cantidades comercialmente viables a escala industrial que se pueden utilizar para muchos propósitos, entre ellos la remediación y las plantaciones para biomasa. Así pues, la presente invención da a conocer adicionalmente métodos para la producción rentable de masa a escala industrial de propágulos listos para que produzcan en el campo plantas monocotiledóneas de la familia de las herbáceas y de los juncos mediante una tecnología basada en un único subcultivo o varios subcultivos a partir de cultivos celulares embriogénicos.

10 Por consiguiente, una realización de la presente invención es un método para incrementar la velocidad de crecimiento de una masa celular embriogénica de un cultivo celular embriogénico totipotente de una familia de hierbas monocotiledóneas o de la planta de junco en operaciones a escala industrial, que comprende:

(a) cultivar un explante de tejido del ápice caulinar de una planta monocotiledónea en un medio primario, en donde el explante se ha tratado previamente a temperatura fría y el medio primario comprende auxina, o auxina y citocinina, para producir un cultivo celular embriogénico totipotente;

15 (b) tratar el cultivo de células embrionarias totipotentes en frío para incrementar la velocidad de crecimiento de la masa del cultivo celular embrionario totipotente continuo en comparación con un control, en donde se trata en frío de 30 días a 325 días y comprende una temperatura en el intervalo de 4°C a 10°C; y

(c) mantener el cultivo celular embriogénico totipotente para cultivarlo posteriormente en el medio primario y/o en un medio secundario, mediante lo cual se produce un cultivo de una planta monocotiledónea que tiene incrementada la velocidad de crecimiento de la masa celular embriogénica con una velocidad de multiplicación de 5x a 8x en comparación con 2x a 3x para un control sin tratamiento con frío.

20 Una realización más da a conocer un método para micropropagar una planta de la familia de la hierbas monocotiledóneas o una planta de junco que comprende las etapas (a), (b) y (c) descritas más arriba y (d) transferir el cultivo celular embriogénico de la etapa (c) a un medio terciario para continuar la multiplicación y producir una plántula con raíz y vástago, por lo que se micropropaga una planta monocotiledónea.

En otras realizaciones más, se da a conocer un método de micropropagación de una planta monocotiledónea que comprende una planta de la familia de las hierbas o de los juncos, que comprende las etapas (a), (b) y (c) descritas más arriba y (d) transferir el cultivo celular embriogénico de la etapa (c) a un medio terciario para continuar la multiplicación y para producir una plántula con raíz y vástago; y (e) transferir la plántula a un medio cuaternario para la aclimatación a condiciones fotosintéticas y sin esterilidad, y la producción de una plántula o planta aclimatada.

Otra realización de la presente invención da a conocer un método para producir una línea vegetal de élite de la familia de las hierbas o de los juncos, que comprende: seleccionar al menos un rasgo de interés del cultivo celular embriogénico totipotente y/o plántula producidos por los métodos de la presente invención, en donde al menos un rasgo de interés es un resultado de la variación somaclonal del cultivo celular embriogénico o de la introducción de al menos una secuencia nucleotídica heteróloga en el genoma de una célula del cultivo celular embriogénico; y cultivar el cultivo celular embriogénico totipotente que comprende al menos un rasgo de interés para producir una línea de planta de élite.

Una realización más da a conocer un método en el que se establece la asociación entre una planta y un microorganismo, comprendiendo dicho método el cocultivo de al menos una plántula producida por los métodos de la presente invención con al menos una especie microbiana en un medio cuaternario para establecer una asociación entre la planta y el microorganismo.

La presente invención da a conocer adicionalmente métodos dirigidos a la fitorremediación. En una realización, la fitorremediación comprende el establecimiento de una serie de plantas producidas por los métodos de la presente invención y que poseen las mismas características genéticas en un medio líquido, y poner en contacto la raíz de las plantas con un contaminante medioambiental en el medio líquido, lo que ocasiona que el contaminante medioambiental sea retirado del medio líquido.

En otras realizaciones, la fitorremediación comprende el establecimiento de una serie de plantas generadas con los métodos de la presente invención y que poseen las mismas características genéticas en una superficie terrestre, y la puesta en contacto de las raíces de las plantas con un contaminante medioambiental en la superficie terrestre, lo que ocasiona que el contaminante medioambiental sea retirado de la superficie terrestre.

Además se describe un tejido totipotente o un tejido totipotente transgénico de una planta monocotiledónea que se produce por los métodos descritos en la presente memoria.

### **Breve descripción de las figuras**

En la figura 1 se muestra un cultivo celular embriogénico totipotente continuo de *Arundo donax*. La figura 1A muestra la primera etapa de la embriogénesis en un medio de cultivo secundario, la división celular asimétrica; la figura 1B

muestra las células en división activa y con mucho citoplasma en un cultivo celular embriogénico en un medio de cultivo secundario; y las figuras 1C y 1D muestran el embrión no cigótico de un cultivo celular en el medio de cultivo secundario.

5 En la figura 2 se muestran las etapas de la propagación a escala industrial. La etapa 1 es el inicio del cultivo celular embriogénico en el medio de cultivo primario (I). El cultivo celular embriogénico se puede propagar en el medio de cultivo primario con o sin el tratamiento intermitente con frío. La etapa 2 es la transferencia al medio de cultivo secundario (II) en donde el cultivo celular se puede propagar con o sin el tratamiento intermitente con frío. La etapa 3 muestra la transferencia del medio de cultivo secundario al terciario (III). La etapa 4 ilustra una vía alternativa en la que el cultivo celular del medio de cultivo primario se transfiere directamente al medio de cultivo cuaternario (IV). La etapa 5 es la aclimatación de los cultivos al medio de cultivo cuaternario. La etapa 6 es la transferencia de las plantas al suelo.

15 En la figura 3 se muestran las etapas del cultivo *in vitro*, la multiplicación y la regeneración de *Arundo donax* mediante un cultivo celular embriogénico totipotente continuo. La figura 3A muestra la formación del cultivo celular embriogénico en segmentos de inflorescencias inmaduras; la figura 3B muestra el cultivo celular embriogénico totipotente continuo en el medio de cultivo secundario; la figura 3C muestra los embriones no cigóticos unipolares que se forman en el cultivo celular embriogénico totipotente continuo en el medio de cultivo secundario; la figura 3D muestra plantas regeneradas del cultivo celular embriogénico y que se multiplican en el medio de cultivo terciario líquido; la figura 3E muestra las plantas transferidas a macetas desde el medio de cultivo cuaternario; y la figura 3F muestra el porte de una planta de tres meses de *A. donax* formada a partir de plantas clonadas *in vitro*.

20 En la figura 4 se muestran las etapas del cultivo *in vitro*, la multiplicación y la regeneración de *Miscanthus x giganteus* mediante el cultivo celular embriogénico totipotente continuo. Las figuras 4A y 4B muestran el cultivo celular embriogénico totipotente continuo en el medio de cultivo secundario; las figuras 4C y 4D muestran las plantas que se regeneran a partir de cultivos celulares embriogénicos en el medio de cultivo terciario en la oscuridad; y la figura 4E muestra las plantas en el medio de cultivo terciario expuesto a la luz.

25 En la figura 5 se dan a conocer ejemplos de diferentes especies de monocotiledóneas producidas con los métodos descritos en la presente memoria. En la figura 5A aparece *Miscanthus floridulus* en la etapa de cultivo secundario; en la figura 5B aparece *Thysanolaena maxima* en la etapa de cultivo secundario; en la figura 5C aparece *Scirpus validus* en la etapa de aclimatación; en la figura 5D aparece *Scirpus californicus* en la etapa de cultivo terciario.

30 La figura 6 muestra la selección de transformantes resistentes a antibióticos cuatro semanas después de la transferencia génica, mediada por *Agrobacterium*, a los segmentos transversales de la inflorescencia inmadura de *Arundo donax* (explantos). La transformación se lleva a cabo mediante el cocultivo del callo embriogénico con *Agrobacterium tumefaciens* que lleva el plásmido pMSF3022. La figura 6A muestra los explantes de control muertos con 10 mg/l de fosfotricina (antibiótico/herbicida); la figura 6B muestra el desarrollo de los callos embriogénicos en ausencia del antibiótico/herbicida en el caso de los explantes de control; la figura 6C muestra que los explantes cocultivados y transformados resistentes al antibiótico son capaces de desarrollar callos embriogénicos en presencia de 10 mg/l de fosfotricina; y la figura 6D muestra el desarrollo de callos embriogénicos en el caso de los explantes transformados y cocultivados resistentes al antibiótico en ausencia del antibiótico/herbicida.

35 En la figura 7 se muestran las diferencias en la dispersión de la variabilidad genética de la actividad deshalogenasa sobre el xenobiótico halogenado 2,4,6-triclorofenol (TCP). La figura 7A muestra la dispersión de los clones vegetativos, obtenidos mediante la propagación convencional en viveros, con respecto a la actividad deshalogenasa; la figura 7B muestra la dispersión de los somaclones obtenidos de los cultivos celulares embriogénicos; la figura 7C muestra la dispersión de los somaclones obtenidos de los cultivos celulares embriogénicos expuestos al TCP; y la figura 7D presenta los datos representados como cuartiles.

40 En la figura 8 se muestra un ejemplo de un ensayo de degradación de micropelícula. La raíz de *Arundo donax* colonizada por bacterias (*Pseudomonas cepaica*) tiene su entorno transparente porque se ha digerido la película de aceite.

### **Descripción detallada**

45 La presente invención pasará a describirse a continuación con más detalle con referencia a los dibujos y la especificación acompañantes, en los cual se muestran las realizaciones preferentes de la invención. Sin embargo, esta invención puede realizarse de diferentes formas y no se interpretará que esté limitada a las realizaciones expuestas en la presente memoria.

50 A menos que se defina de otra manera, todos los términos científicos y técnicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que suele conocer el experto en la técnica a la que pertenece la invención. La terminología utilizada para la descripción de la invención en la presente memoria tiene el único propósito de describir realizaciones particulares y no se pretende que limite la invención. Tal y como se utiliza en la descripción de la invención y en las reivindicaciones expuestas en la presente memoria, las formas singulares «un», «una», «la» y «el» pretenden incluir las formas plurales también, a menos que el contexto indique claramente otra cosa. Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «y/o» incluye todas y cada una de las combinaciones de uno

o varios de los elementos asociados que se recogen.

Además, la terminología «aproximadamente» o «unos», tal y como se utiliza en la presente memoria cuando se hace referencia a un valor medible, tal como una cantidad de un compuesto o de un agente de esta invención, dosis, tiempo, temperatura y similares, significa que engloba variaciones de  $\pm 20\%$ ,  $\pm 10\%$ ,  $\pm 5\%$ ,  $\pm 1\%$ ,  $\pm 0,5\%$  o incluso  $\pm 0,1\%$  de la cantidad especificada.

## Definiciones

Tal y como se utiliza en la presente memoria, «auxina» se refiere a cualquier compuesto con auxina o actividad de tipo auxina. «Actividad de tipo auxina» se refiere a la actividad típica observada en una planta como resultado del tratamiento con una auxina. Así pues, un compuesto con actividad de tipo auxina favorece la formación de masas de células desorganizadas en los explantes, mantiene la proliferación celular por sí sola o en presencia de citocinina, y/o induce el desarrollo de raíces en esquejes de brotes.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, «tratamiento previo en frío» se refiere al tratamiento de los explantes con frío antes de introducirlos en el cultivo celular.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, «tratamiento frío» o «con frío» se refiere a la incubación en frío de los cultivos celulares embriogénicos consolidados.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, «citocinina» se refiere a cualquier compuesto con actividad citocinina o actividad de tipo citocinina. «Actividad de tipo citocinina» se refiere a la actividad típica observada en una planta como resultado del tratamiento con una citocinina. Así pues, un compuesto con actividad de tipo citocinina promueve la regeneración de vástagos a partir de cultivos de células y/o mantiene la proliferación de las células en presencia de auxina.

«Embrión» se define como la primera etapa pluricelular reconocible de un individuo.

«Cultivos embriogénicos» tal y como se utiliza en la presente memoria se refiere a los cultivos que producen embriones somáticos o estructuras derivadas de embriones que son capaces de diferenciarse posteriormente y formar una plántula.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la frase «incremento de la tolerancia a una condición medioambiental» significa la capacidad de una planta para resistir una condición medioambiental perjudicial que normalmente sería dañina o perjudicial para una planta de tipo silvestre de la misma especie.

«Plántula» tal y como se utiliza en la presente memoria se refiere a una planta joven o pequeña con raíz y vástago. En algunas realizaciones de la presente invención, las plántulas tienen de 0,5 a 10 cm de altura.

«Cultivo celular embriogénico totipotente primario» tal y como se utiliza en la presente memoria se refiere a una masa desorganizada de células indiferenciadas en división activa que son capaces de diferenciarse en estructuras embriogénicas no cigóticas, embriones y estructuras derivadas de embriones que pueden diferenciarse posteriormente y formar unas plántulas.

«Propágulo», tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a las plantas y a las plántulas que se utilizan para propagar una planta y que están listas para ser trasplantadas al suelo o a otro medio de plantación.

«Rehabilitar» o «rehabilitación» y otros términos similares que se utilizan en la presente memoria se refieren a la transferencia de los cultivos, que han estado en conservación, al medio nuevo.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «subcultivo» o «pase» se refiere a la transferencia de las células de un recipiente de cultivo a otro; esto suele implicar la subdivisión de un cultivo celular en proliferación. Por lo tanto, «subcultivo» es el proceso mediante el cual el tejido o el explante se subdivide y a continuación se transfiere al medio de cultivo nuevo.

«Cultivo celular embriogénico totipotente continuo» tal y como se utiliza en la presente memoria se refiere a una mezcla de células indiferenciadas en división activa desorganizada y de células que se están diferenciando en estructuras embriogénicas no cigóticas, embriones y estructuras derivadas de embriones que durante años pueden además diferenciarse y formar plántulas.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, «totipotente» significa que tiene capacidad ilimitada para producir cualquier tipo de célula. Las células totipotentes tienen la capacidad de convertirse (o «especializarse») en todos y cada uno de los tejidos y órganos que están presentes en la planta completamente desarrollada. Por lo tanto, las células totipotentes tienen la capacidad de regenerarse en plantas completas.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, «xenobiótico» se refiere a una sustancia química u otro compuesto que no es un componente normal de un organismo que está expuesto a él; una sustancia química que es extraña al sistema biológico.

Se debe entender que, aunque la terminología «primario», «secundario», etc., se puede utilizar en la presente memoria para describir varias etapas y/o medios de cultivo, estas etapas y/o medios de cultivo no deben verse limitados por esta terminología. Esta terminología sólo se utiliza para diferenciar una etapa o medio de cultivo de otra etapa o medio de cultivo. Por lo tanto, una etapa o medio de cultivo «primario», explicado más abajo, también se podría denominar una etapa o medio de cultivo «secundario» sin alejarse de las enseñanzas de la presente invención.

La presente invención da a conocer nuevos métodos para el inicio, la micropropagación de masa, el mantenimiento, la conservación, el transporte y/o el despliegue de propágulos así como para realzar la mejora genética somaclonal de determinadas especies de plantas. Además se describen los métodos para obtener clones de plantas en cantidades comercialmente viables a escala industrial para, entre otros usos, la remediación y las plantaciones para biomasa. Estos métodos utilizan la tecnología de inducción y mantenimiento de cultivos celulares embriogénicos continuos que, según conocen los inventores, proporcionan el primer cultivo celular embriogénico continuo de monocotiledóneas tales como la caña común, *Thysanolaena maxima*, *Miscanthus* y las especies de juncos.

El cultivo celular embriogénico continuo utilizado por los presentes métodos es totipotente sin limitaciones. Durante la proliferación, cada célula es una unidad de multiplicación y puede sufrir la embriogénesis de forma independiente, lo que permite la selección a nivel celular para el crecimiento diferencial en condiciones selectivas. En cambio, en los cultivos en los que los embriones somáticos o varios primordios caulinares se inducen directamente de un explante en una suspensión o en un cultivo secundario semisólido (p. ej., patente de los EE.UU. n.º 7 052 912 (a partir de aquí se denominará «la patente '912»)), la cantidad de unidades totipotentes es muy escasa (esto es, el número de individuos) en comparación con el cultivo celular embriogénico totipotente descrito en la presente memoria, en el que cada célula es un individuo en potencia. En la patente '912, la multiplicación, que se genera a partir de la formación secundaria de embriones o de meristemas caulinares adventicios que comprenden cientos o miles de células, está limitado a un ritmo mucho más lento porque las plantas individuales regeneradas no se originan en el plano celular a partir de células independientes. Esto no sólo afecta al posible número de plantas independientes, sino también a la eficacia para la clasificación de las líneas nuevas o de élite para la mejora genética.

Los métodos de inducción de cultivos celulares embriogénicos de la presente invención se desarrollaron para un grupo heterogéneo de especies de monocotiledóneas, entre ellas *Arundo donax*. El método se basa en parte en que los inventores de la presente invención descubrieron el efecto inductor del crecimiento embriogénico que ofrecía el tratamiento previo en frío de los ápices caulinares que contenían inflorescencias inmaduras. Aunque no se desea la vinculación con ninguna teoría concreta de la invención, parece que el tratamiento previo con frío no sólo induce cambios fisiológicos que ocasionan la retención e incremento de la capacidad para inducir cultivos celulares embriogénicos, sino que también retrasa la senescencia y abre una ventana más amplia para procesar el material vegetal. La invención se basa además en el descubrimiento inesperado de que la transferencia desde los medios que proporcionan una combinación de auxinas y citocininas a unos medios que proporcionan sólo citocinina, tal como la citocinina sintética tidiazurón, favorece el alargamiento caulinar y la formación de la raíz.

El cultivo celular embriogénico continuo se compone de células en división que son capaces de producir embriones unipolares. En presencia de luz, los embriones unipolares germinan con precocidad y forman varios meristemas apicales y primordios caulinares. En el medio terciario, el alargamiento parcial caulinar viene acompañado por el enraizamiento. Por lo tanto, los métodos de la presente invención son adecuados no sólo para el mantenimiento y micropropagación continuos de líneas de cultivo de células totipotentes, sino también para el mantenimiento continuo de líneas de cultivo para regeneración.

### Inicio y producción

La presente invención da a conocer un método para producir y mantener un cultivo celular embriogénico totipotente de una planta monocotiledónea, que comprende: (a) cultivar un explante de un tejido de un ápice caulinar de una planta monocotiledónea en un medio primario, en donde el explante se ha tratado previamente con frío y el medio primario comprende auxina, o auxina y citocinina, para producir un cultivo celular embriogénico totipotente; (b) tratar el cultivo celular embrionario totipotente con frío; y (c) mantener el cultivo celular embriogénico totipotente mediante otro cultivo en el medio primario y/o en un medio secundario, por lo que se produce y mantiene un cultivo celular embriogénico totipotente de una planta monocotiledónea.

En algunas realizaciones, el cultivo celular totipotente que se genera en la etapa de cultivo primario se mantiene en el mismo medio y en las mismas condiciones para continuar la generación de tejido totipotente. En algunas realizaciones, el cultivo de células totipotentes que se genera en la etapa de cultivo primario se transfiere a un medio secundario para la proliferación continua del cultivo de células totipotentes. En la figura 1 se dan a conocer los ejemplos de crecimiento de *A. donax* en medio de cultivo secundario.

En otras realizaciones, el cultivo celular totipotente se somete a tratamiento con frío en medio secundario para incrementar el ritmo de crecimiento. En otro aspecto de la invención se da a conocer un método para la micropropagación de una planta monocotiledónea, en donde el cultivo celular totipotente se transfiere del medio secundario al medio terciario y se deja que forme vástagos parcialmente alargados con raíces (plántulas). Las plántulas resultantes se pueden cultivar más en un medio cuaternario sin hormonas ni vitaminas ni azúcares para el

posterior crecimiento y aclimatación a condiciones fotosintéticas y no estériles, mediante lo que se genera una plántula o planta aclimatada. Las plántulas se pueden transferir del medio cuaternario al suelo para otra aclimatación. Alternativamente, las plántulas se pueden transferir directamente al suelo desde el medio terciario para producir una plántula o planta aclimatada de la presente invención. Después de la aclimatación, las plántulas o plantas se pueden transplantar a cualquier lugar deseado. En la figura 2 se presenta una realización representativa de los métodos de micropropagación de la presente invención.

El ápice caulinar de la presente invención incluye, pero sin limitarse a ello, una inflorescencia, una inflorescencia inmadura y una infrutescencia inmadura que comprende flores de maduras a inmaduras y frutos inmaduros. El explante o ápice caulinar de tejido vivo de una planta monocotiledónea se puede obtener de cualquier fuente, entre ellas, pero sin limitarse a ellas, plantas monocotiledóneas silvestres, plantas monocotiledóneas cultivadas (de invernadero y crecidas en el campo) y plantas monocotiledóneas regeneradas de explantes mediante los métodos de la presente invención. Una planta monocotiledónea de la presente invención incluye, pero sin limitarse a ellas, *Arundo* spp., *Thysanolaena* spp., *Miscanthus* spp., y *Scirpus* spp., y combinaciones de las mismas. Por lo tanto, una planta monocotiledónea de la presente invención incluye, pero sin limitarse a ellas, caña común (*Arundo donax*), el bambú capim *Thysanolaena maxima*, los pastos plateados (*Miscanthus x giganteus* y *Miscanthus floridulus*), y los juncos (*Scirpus californicus* y *Scirpus validus*).

En el caso de las monocotiledóneas de la familia de las hierbas, en particular la caña común (*Arundo donax*), *Thysanolaena maxima*, y los pastos plateados (*Miscanthus x giganteus* y *Miscanthus floridulus*), el explante puede ser una inflorescencia inmadura. En una realización particular, el explante se obtiene de los ápices caulinares en prefloración en los que encierran completamente la inflorescencia inmadura en desarrollo que aún no ha emergido está completamente encerrada en vainas foliares. En realizaciones concretas, una inflorescencia inmadura encerrada por la vaina foliar muestra un rendimiento más alto de tejido regenerable que otras fuentes de tejidos de hierbas.

Un explante obtenido de una planta de junco vivo, en particular, *Scirpus californicus* y *Scirpus validus*, se obtiene, por ejemplo, de los vástagos al comienzo de la floración (p. ej., sin flores abiertas o mayormente con flores sin abrir, flores abiertas y frutos en desarrollo; también se denomina una inflorescencia o infrutescencia inmadura). En el caso del junco, en realizaciones particulares, la inflorescencia o infrutescencia inmadura muestra un rendimiento más alto de tejido regenerable que otras fuentes de tejidos del junco.

En un método de ejemplo para preparar el explante de una planta monocotiledónea viva de la familia de hierbas para cultivo, en particular la caña común o los pastos plateados, se despojan cuidadosamente de todo excepto de las vainas foliares terminales para no exponer la inflorescencia. En un método de ejemplo para preparar el explante para cultivo de una planta monocotiledónea viva de tipo junco, en particular *Scirpus californicus* y *Scirpus validus*, se podan las ramas de la inflorescencia o de la infrutescencia. Otros métodos para preparar explantes serán evidentes para los expertos en la técnica.

Se puede desinfectar o esterilizar la superficie de los ápices caulinares de las hierbas y los juncos. Un método de ejemplo de esterilización de la superficie es la inmersión de los ápices caulinares en una solución de lejía comercial diluida 5 veces que contiene etanol al 10% v/v y un tensioactivo, por ejemplo, Tween 80 al 0,1%, durante 15 minutos. A continuación, los ápices caulinares se enjuagan tres veces con agua estéril antes de darles uso. Tal esterilización reduce o elimina la contaminación microbiana medioambiental. La inflorescencia de la hierba se extrae entonces de todas las vainas foliares en condiciones asépticas y se corta o pica en trozos transversales. Después de la esterilización, la inflorescencia del junco se corta o pica en trozos transversales en condiciones asépticas. Se puede utilizar cualquier hoja de bisturí, cuchillo o escalpelo afilado para cortar la inflorescencia. Al cortar en condiciones asépticas una inflorescencia inmadura que contiene una serie de regiones meristemáticas en trozos transversales, se induce la formación de tejido regenerable.

En algunas realizaciones, los explantes se tratan previamente con frío. Tal tratamiento previo del explante con frío da lugar a un rendimiento más alto de tejido regenerable que los explantes que se utilizan inmediatamente después de cortarlos o los que se conservan a temperatura ambiente. La duración del tratamiento previo con frío puede ser de 1 día a aproximadamente 120 días. Por lo tanto, el tratamiento con frío puede ser de un día, una semana, dos semanas, tres semanas, un mes, dos meses, tres meses y cuatro meses, y similares. En otras realizaciones, el tratamiento previo en frío puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 105, 110, 115, o 120 días y similares. En consecuencia, el tratamiento previo con frío puede ser de aproximadamente un día a unos 14 días, de un día a unos 30 días, de un día a unos 45 días, de un día a unos 60 días, de un día a unos 90 días, o de un día a unos 105 días, y similares. En otras realizaciones, el tratamiento previo con frío puede ser de aproximadamente 7 días a unos 14 días, de aproximadamente 7 días a unos 30 días, de aproximadamente 14 días a unos 30 días, de aproximadamente 14 días a unos 45 días, de aproximadamente 14 días a unos 60 días, de aproximadamente 30 días a unos 45 días, de aproximadamente 30 días a unos 60 días, de aproximadamente 30 días a unos 90 días, de aproximadamente 45 días a unos 60 días, de aproximadamente 45 días a unos 90 días, de aproximadamente 45 días a unos 120 días, de aproximadamente 60 días a unos 90 días, de 60 días a unos 120 días, o de aproximadamente 90 días a unos 120

días, de aproximadamente 90 días a unos 180 días, y similares. En una realización particular, el tratamiento previo con frío tiene una duración de 14 días (dos semanas).

En las realizaciones representativas, la temperatura del tratamiento previo puede estar en un intervalo de unos 0 °C a unos 10 °C. Por lo tanto, la temperatura del tratamiento previo puede ser de unos 0 °C, 1 °C, 2 °C, 3 °C, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C, 8 °C, 9 °C, o 10 °C o cualquier combinación de las mismas. En otras realizaciones, la temperatura del tratamiento previo puede estar en un margen de 0 °C a unos 5 °C, de aproximadamente 0 °C a unos 8 °C, de aproximadamente 2 °C a unos 10 °C, de aproximadamente 2 °C a unos 8 °C, de aproximadamente 2 °C a unos 5 °C, de aproximadamente 3 °C a unos 5 °C, de aproximadamente 3 °C a unos 7 °C, de aproximadamente 3 °C a unos 10 °C, de aproximadamente 5 °C a unos 8 °C, de aproximadamente 5 °C a unos 10 °C, o de aproximadamente 7 °C a unos 10 °C, de aproximadamente 8 °C a unos 10 °C, y similares. En otra realización, la temperatura del tratamiento previo es de 5 °C. En algunas realizaciones, el tratamiento previo a temperatura fría se realiza en presencia de luz. En una realización específica, el tratamiento previo se hace en presencia de luz tenue. La luz tenue tal y como se utiliza en la presente memoria es de una intensidad de luz de menos de  $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

En determinadas realizaciones, los trozos de cortar en pedacitos la inflorescencia o la infrutescencia se cultivan en una etapa de cultivo primario, en la que se genera el tejido totipotente. En algunas realizaciones, el cultivo primario se lleva a cabo a oscuras y, óptimamente, a aproximadamente la temperatura ambiente. En otras realizaciones, la etapa de cultivo primario se lleva a cabo con luz y a aproximadamente la temperatura ambiente. Los inventores han encontrado que los cultivos incrementan el ritmo de multiplicación y son más longevos cuando se mantenían en la oscuridad en comparación con los cultivos mantenidos con luz.

La etapa del cultivo primario se puede llevar a cabo en cualquier intervalo de tiempo y a cualquier temperatura suficiente para que genere el cultivo del tejido embriónico totipotente. En las realizaciones representativas, la duración de la etapa del cultivo primario es de aproximadamente una semana a varios meses. Por lo tanto, la duración de la etapa del cultivo primario puede ser de aproximadamente una semana, dos semanas, tres semanas, un mes, dos meses, tres meses y cuatro meses y similares. En algunas realizaciones la duración de la etapa del cultivo primario es unos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 105, 110, 115 o 120 días y similares. En una realización, la duración del cultivo primario es de aproximadamente cuatro semanas. Aún en otras realizaciones, la duración de la etapa del cultivo primario es de aproximadamente una semana a unas tres semanas, de aproximadamente una semana a unas cuatro semanas, de aproximadamente una semana a unas cinco semanas, de aproximadamente una semana a unas seis semanas, de aproximadamente una semana a unas siete semanas, de aproximadamente una semana a unas ocho semanas, de aproximadamente una semana a unas diez semanas, de aproximadamente una semana a unas doce semanas, de aproximadamente una semana a unas catorce semanas o de aproximadamente una semana a unas dieciséis semanas, de una semana a unas dieciocho semanas, y similares.

La temperatura para la etapa del cultivo primario no es crítica y puede ser cualquier temperatura adecuada para producir un cultivo celular embriogénico totipotente. Por consiguiente, la temperatura para la etapa del cultivo primario puede estar en un margen de aproximadamente 15 °C a unos 35 °C. Así pues, la temperatura para la etapa del cultivo primario es unos 15 °C, 16 °C, 17 °C, 18 °C, 19 °C, 20 °C, 21 °C, 22 °C, 23 °C, 24 °C, 25 °C, 26 °C, 27 °C, 28 °C, 29 °C, 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, o cualquier combinación de las mismas. En algunas realizaciones, el margen de temperaturas para la etapa del cultivo primario es de aproximadamente 15 °C a unos 20 °C, de aproximadamente 15 °C a unos 25 °C, de aproximadamente 15 °C a unos 30 °C, de aproximadamente 20 °C a unos 25 °C, de aproximadamente 20 °C a unos 30 °C, de aproximadamente 20 °C a unos 35 °C o de aproximadamente 25 °C a unos 30 °C, y similares. En otra realización, el margen de temperaturas para la etapa de cultivo primario es de aproximadamente 26 °C a unos 28 °C. Aún en otra realización, el margen de temperaturas para la etapa de cultivo primario es de aproximadamente 25 °C.

La presente invención da a conocer adicionalmente un método para tratar con frío un cultivo celular embriogénico totipotente, comprendiendo dicho método incubar el cultivo celular embriogénico totipotente de la etapa (a) de la reivindicación 1 y exponer el cultivo celular a al menos un tratamiento con frío. En las realizaciones representativas, los cultivos de células totipotentes de la etapa (a) se incuban en placas de cultivo selladas individualmente. Las placas de cultivo de la presente invención incluyen cualquier tipo de placa, matraz y/o botella, y similares, en los cuales se pueden hacer crecer las células del cultivo de tejidos. Éstos incluyen, pero sin limitarse a ellos, placas de Petri, matraces para cultivo de tejidos, matraces Erlenmeyer, placas de microtitulación y placas multipocillo para cultivo celular. En algunas realizaciones, las placas de cultivo se pueden sellar con selladores que incluyen, pero sin limitarse a ellos, películas de plástico para comida, película de parafina, envolturas de palé y similares.

En algunas realizaciones, el tratamiento con frío del cultivo celular embriogénico totipotente se produce en la oscuridad. En otras realizaciones, el tratamiento con frío puede producirse con luz o con luz intermitente. La intensidad de la luz puede ser tenue (menos de  $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Tal y como el experto en la técnica entenderá, incluso en los cultivos que crecieron en la oscuridad, puede haber exposición a la luz al subcultivar, o si no al manipular, los cultivos.



En otros aspectos de la presente invención, el tratamiento con frío comprende el tratamiento a una temperatura en un intervalo de aproximadamente 4 °C a unos 10 °C, de aproximadamente 4 °C a unos 8 °C, de aproximadamente 4 °C a unos 6 °C, de aproximadamente 5 °C a unos 8 °C, de aproximadamente 5 °C a unos 10 °C, de aproximadamente 6 °C a unos 10 °C, de aproximadamente 6 °C a unos 8 °C, de aproximadamente 7 °C a unos 10 °C, de aproximadamente 8 °C a unos 10 °C y similares. Por consiguiente, el tratamiento con frío comprende el tratamiento a una temperatura de unos 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C, 8 °C, 9 °C, 10 °C, o cualquier combinación de las mismas.

La duración del tratamiento con frío puede ser de 30 a 325 días. Así pues, la duración del tratamiento con frío puede ser de 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300 días, 310 días, 320 días. En otras realizaciones, la duración del tratamiento con frío puede ser de 30 días a 45 días, de 30 días a 90 días, de 30 días a 120 días, de 30 días a 150 días, de 30 días a 175 días, de 30 días a 200 días, de 30 días a 225 días, de 30 días a 250 días, de 30 días a 275 días, de 30 días a 300 días, de 30 días a 325 días, de 45 días a 60 días, de 45 días a 90 días, de 45 días a 120 días, de 45 días a 150 días, de 45 días a 200 días, de 45 días a 250 días, de 45 días a 300 días, de 45 días a 320 días, de 90 días a 120 días, de 90 días a 150 días, de 90 días a 175 días, de 90 días a 200 días, de 90 días a de 220 días, de 90 días a 250 días, de 90 días a 300 días, de 120 días a 180 días, de 120 días a 250 días, de 180 días a 250 días.

En otras realizaciones, el cultivo celular embriogénico totipotente se trata con frío durante hasta 180 días sin subcultivo. En una realización más, el cultivo celular embriogénico totipotente se trata con frío durante hasta 180 días con al menos un subcultivo.

Se encontró inesperadamente que los tratamientos con frío de los explantes y de los cultivos consolidados incrementaban la velocidad del crecimiento de la masa celular embriogénica a un ritmo de multiplicación de 5x a 8x en comparación con 2x a 3x observado sin el tratamiento en frío. Este incremento considerable de la eficacia tiene importancia comercial porque la mayoría de las operaciones a escala industrial están limitadas por el ritmo de multiplicación. El efecto positivo observado de los tratamientos con frío fue un hallazgo particularmente sorprendente dado que muchas de las plantas de la presente invención son especies sensibles al frío.

Un medio que es útil para la etapa del cultivo primario (a saber, el medio primario) puede ser cualquier medio basal utilizado para el cultivo del tejido vegetal. Tales medios los conocen bien los expertos en la técnica. En una realización, el medio primario se complementa con al menos una hormona vegetal (a saber, regulador del crecimiento de la planta). Los ejemplos de hormonas vegetales adecuadas incluyen auxinas y citocininas. Las auxinas de la presente invención incluyen no sólo la auxina sino también cualquier compuesto con actividad de tipo auxina. Por consiguiente, las auxinas de la presente invención incluyen, pero sin limitarse a ellos, el ácido 2,4-diclorofenoxiacético, el picloram y el ácido indolbutírico, y combinaciones de los mismos. Las citocininas de la presente invención incluyen no sólo la citocinina, sino también cualquier compuesto con actividad de tipo citocinina. Por consiguiente, las citocininas de la presente invención incluyen, pero sin limitarse a ellos, tidiazurón, zeatina, benciladenina, cinetina, hemisulfato de adenina y dimetilaliladenina, y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el medio primario se complementa con al menos una auxina y al menos una citocinina.

En las realizaciones representativas, el medio primario también comprende una fuente de carbono, que puede ser cualquier fuente de carbono adecuada para el cultivo de tejidos vegetales. Los expertos en la técnica conocen tales fuentes de carbono (Slater et al. *Plant Biotechnology, the Genetic Manipulation of Plants*, Oxford University Press, 368 págs., (2003)) e incluyen, pero sin limitarse a ellos, azúcares tales como sacarosa, glucosa, maltosa, galactosa y sorbitol, y similares. En la presente invención, la fuente de carbono preferente es la sacarosa.

En una realización de la presente invención, el medio primario se prepara añadiendo a agua estéril: (a) sales basales (Sigma Fine Chemicals, St. Louis, Mo.) de MS (Murashige y Skoog, 1975) a 4,3 g/l; (b) 3 ml de solución de sales de Miller (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> al 6%, p/v); (c) mio-inositol a 100 mg/l; (d) 2 ml de Vitamix (Marton y Browse, *Plant Cell Reports*, 10: 235-239 (1991)); (e) sacarosa a 30 g/l; (f) complementado con los reguladores del crecimiento vegetal: (i) hemisulfato de adenina a 80 mg/l; (ii) picloram a 0,12 mg/l; (iii) ácido indol-3-butírico a 1,0 mg/l; (iv) ácido 2,4-diclorofenoxiacético a 0,5 mg/l; (v) dimetilaliladenina a 0,5 mg/l; (vi) zeatina a 0,5 mg/l; y (vii) tidiazurón a 3 mg/l.

En algunas realizaciones, el medio se solidifica con un gelificante. Los gelificantes de la presente invención incluyen, pero sin limitarse a ellos, goma gellan, PHYTAGEL<sup>TM</sup>, GELCARIN<sup>®</sup>, GELRITE<sup>®</sup>, goma gellan de pureza para alimento, agarosa y similares. El gelificante utilizado para solidificar el medio primario se puede utilizar a las concentraciones convencionales. En una realización, el medio se solidifica con PHYTAGEL<sup>TM</sup> a 2 g/l.

En una realización adicional de la presente invención, la auxina del medio primario es el ácido 2,4-diclorofenoxiacético, que está presente a una concentración de unos 0,2 mg/l, y la citocinina del medio primario es el tidiazurón, que está presente a una concentración de unos 0,02 mg/l.

En otras realizaciones de la presente invención, el pH del medio para la etapa del cultivo primario se ajusta a 5,6-5,8

antes de esterilizar el medio. En otra realización, el pH del medio para la etapa de cultivo primario se ajusta a 5,8 antes de esterilizar el medio. En una realización, el medio se esteriliza en un autoclave u olla a presión durante 25 a 35 minutos a una temperatura de aproximadamente 105 °C a unos 121 °C. En otra realización, la temperatura a la que se esteriliza el medio es de aproximadamente 109 °C.

5 El medio tibio se puede verter en una placa de cultivo estéril y dejarse enfriar hasta la temperatura ambiente. El material del explante picado a trozos se puede distribuir por la superficie del medio gelificado, y la placa de cultivo se cubre con una tapa y se sella para conservar la esterilidad. La placa de cultivo se puede sellar con una tira de película tal como una película de plástico para alimentos, película de parafina, envoltura de palé y similares. La placa cubierta y sellada se puede colocar después en un lugar adecuado para mantener la temperatura, como se explicó más arriba.

Aún en otras realizaciones de la presente invención, el tejido que se cultiva se mantiene en la oscuridad durante la etapa de cultivo primario. En otras realizaciones, el tejido se puede mantener con luz durante la etapa de cultivo primario. La exposición a la luz incluye, pero sin limitarse a ellas, la iluminación continua y la iluminación intermitente. La iluminación puede incluir luz natural (p. ej., invernadero) o luz artificial. La luz artificial puede ser una mezcla de tubos fluorescentes de blanco frío y de luz incandescente. Si se emplea la iluminación artificial continua, la intensidad puede estar en un intervalo de unos 30  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a unos 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , o más.

Durante la etapa del cultivo primario, el cultivo celular embriogénico totipotente se forma a partir del tejido de explante cortado a trozos, que se puede subcultivar y mantener adicionalmente en el medio de cultivo primario o secundario. Algunos sectores del cultivo celular pueden dar lugar a embriones unipolares que forman varios meristemas apicales caulinares sin un alargamiento caulinar significativo. En este punto, el cultivo comprende tanto sectores de cultivo del tejido como de cultivo de células totipotentes (también denominados en la presente memoria cultivo de tejido regenerable o totipotente). Los sectores del cultivo de tejido totipotente se pueden transferir a un medio de cultivo primario recién preparado para el mantenimiento continuo o se pueden transferir al medio de cultivo secundario para la propagación continua. Alternativamente, los sectores de cultivo de tejido totipotente se pueden transferir al medio terciario con luz para inducir el reverdecimiento y el enraizamiento y la propagación posterior, o se pueden transferir al medio cuaternario sin hormonas, pero con luz, para el desarrollo de los sistemas radicales y el alargamiento caulinar completo. Por lo tanto, el tejido totipotente se puede utilizar como una fuente regenerable de material genético para el mantenimiento y la propagación continuos. La figura 3A muestra a *Arundo donax* en la etapa de cultivo primario.

### 30 **Micropropagación, llevar a gran escala y conservación**

El cultivo celular embriogénico totipotente obtenido en la etapa de cultivo primario de la presente invención se puede mantener indefinidamente en el medio de cultivo primario con pases regulares al medio nuevo. En otras realizaciones, el cultivo celular embriogénico totipotente obtenido en la etapa de cultivo primario se transfiere a un medio de cultivo secundario para obtener un cultivo celular embriogénico más disgregable, que también se puede mantener indefinidamente en el medio secundario con pases regulares a medio nuevo. La figura 3B muestra un cultivo celular embriogénico totipotente de *A. donax* en el medio de cultivo secundario. La figura 3C muestra la formación de embriones no cigóticos unipolares de *A. donax* en el medio de cultivo secundario. Los cultivos celulares embriogénicos totipotentes continuos de *Miscanthus x giganteus* en los medios de cultivo secundario se muestran en las figuras 4A y 4B. La figura 5 da a conocer más ejemplos de diferentes especies de monocotiledóneas producidas mediante los métodos descritos en la presente memoria (*Miscanthus floridulus* (figura 5A); *Thysanolaena maxima* (figura 5B); *Scirpus validus* (figura 5C); *Scirpus californicus* (figura 5D)).

En algunas realizaciones, los cultivos celulares embriogénicos totipotentes se mantienen en los medios de cultivo primario o en el medio de cultivo secundario a oscuras. En otras realizaciones, los cultivos celulares embriogénicos totipotentes se mantienen en los medios de cultivo primario o en el medio de cultivo secundario con luz. Cuando los cultivos se hacen crecer en presencia de luz, la luz puede ser continua o intermitente. La iluminación puede además incluir luz natural (p. ej., invernadero) o luz artificial. La luz artificial puede ser una mezcla de tubos fluorescentes de blanco frío y de luz incandescente. La intensidad de la luz utilizada para cultivar el tejido en los medios secundarios puede estar en un intervalo de aproximadamente 30  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a unos 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  o más. Adicionalmente, la intensidad de la luz puede ser tenue (menos de 30  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). El experto en la técnica reconocería que incluso en el caso de los cultivos crecidos en la oscuridad, podrían quedar expuestos a la luz cuando se subcultivan, o si no se manipulan, los cultivos.

Por consiguiente, la presente invención da a conocer un método en el cual, después de finalizar la etapa del cultivo primario, el tejido totipotente se cultiva en una etapa de cultivo secundario durante el cual continúa la multiplicación. Un medio que es útil para la etapa del cultivo secundario (a saber, el medio secundario) puede ser cualquier medio basal utilizado para el cultivo de tejidos vegetales. Los expertos en la técnica conocen bien tales medios. En una realización, el medio secundario se complementa con al menos una hormona vegetal (p. ej., regulador del crecimiento de la planta). Los ejemplos de las hormonas vegetales adecuadas incluyen auxinas y citocininas.

Las auxinas de la presente invención incluyen no sólo auxina, sino también cualquier compuesto con actividad de tipo auxina. Por lo tanto, las auxinas utilizadas con los medios secundarios incluyen, pero sin limitarse a ellos, ácido

2,4-diclorofenoxiacético, picloram y ácido indolbutírico, y combinaciones de los mismos. Las citocininas de la presente invención incluyen no sólo la citocinina, sino también cualquier compuesto con actividad de tipo citocinina. Por consiguiente, las citocininas a utilizar con los medios secundarios incluyen, pero sin limitarse a ellos, tidiazurón, zeatina, benciladenina, cinetina, hemisulfato de adenina y dimetilaliladenina, y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el medio secundario se complementa con al menos una auxina y al menos una citocinina.

El medio secundario también comprende una fuente de carbono, que puede ser cualquier fuente de carbono adecuada para el cultivo de tejidos. Los expertos en la técnica conocen tales fuentes de carbono (Slater et al., *Plant Biotechnology, the Genetic Manipulation of Plants*, Oxford University Press, 368 págs., (2003)) e incluyen, pero sin limitarse a ellos, azúcares tales como sacarosa, glucosa, maltosa, galactosa y sorbitol, y los similares. En algunas realizaciones de la presente invención, la fuente de carbono es sacarosa.

En una realización de la presente invención, el medio secundario se prepara añadiendo a agua estéril: (a) sales basales (Sigma Fine Chemicals, San Luís, Mo.) de MS (Murashige y Skoog, 1975) a 4,3 g/l; (b) 3 ml de solución de sales de Miller (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> al 6%, p/v); (c) mioinositol a 100 mg/l; (d) 2 ml de Vitamix (Marton y Browse, *Plant Cell Reports*, 10: 235-239 (1991)); (e) sacarosa a 30 g/l; (f) complementado con los reguladores del crecimiento de la planta: (i) hemisulfato de adenina a 400 µM; (ii) ácido 2,4-diclorofenoxiacético a 0,2 mg/l; (iii) tidiazurón a 0,1 µM. En algunas realizaciones, el medio se solidifica con un gelificante. Los gelificantes de la presente invención se describen más arriba. En una realización, el medio secundario se solidifica con PHYTAGEL™ a 2 g/l.

En algunas realizaciones de la presente invención, el pH del medio para la etapa de cultivo secundario se ajusta a 5,6-5,8 antes de esterilizar el medio. En otra realización, el pH del medio para la etapa del cultivo secundario se ajusta a 5,8 antes de esterilizar el medio. El medio se esteriliza en un autoclave u olla a presión durante 25 a 35 minutos a una temperatura de aproximadamente 105 °C a unos 121 °C. En algunas realizaciones, la temperatura a la que se esteriliza el medio es de unos 109 °C.

La temperatura para la etapa del cultivo secundario no es crítica y puede ser cualquier temperatura adecuada para mantener la proliferación del cultivo de células totipotentes. En las realizaciones representativas, la temperatura para la etapa del cultivo secundario se encuentra en un margen de aproximadamente 15 °C a unos 35 °C. Así pues, la temperatura para la etapa de cultivo secundario es unos 15 °C, 16 °C, 17 °C, 18 °C, 19 °C, 20 °C, 21 °C, 22 °C, 23 °C, 24 °C, 25 °C, 26 °C, 27 °C, 28 °C, 29 °C, 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C o cualquier combinación de las mismas. En algunas realizaciones, el margen de temperaturas para la etapa de cultivo secundario es de aproximadamente 15 °C a unos 20 °C, de aproximadamente 15 °C a unos 25 °C, de aproximadamente 15 °C a unos 30 °C, de aproximadamente 20 °C a unos 25 °C, de aproximadamente 20 °C a unos 30 °C, de aproximadamente 20 °C a unos 35 °C o de aproximadamente 25 °C a unos 30 °C, y similares. En otra realización, el margen de temperaturas para la etapa del cultivo secundario es de aproximadamente 26 °C a unos 28 °C. Aún en otra realización, el margen de temperaturas para la etapa del cultivo secundario es de aproximadamente 25 °C. Las figuras 1A a 1C y las figuras 3B a 3C muestran a *Arundo donax* en la etapa de cultivo secundario. En las figuras 4A y 4B se representa a *Miscanthus x giganteus* en la etapa de cultivo secundario, mientras que *Miscanthus floridulus* en la etapa de cultivo secundario se muestra en la figura 5A. La figura 5B ilustra a *Thysanolaena maxima* en la etapa de cultivo secundario.

El cultivo celular totipotente se puede mantener y propagar indefinidamente en el medio secundario. De modo similar al cultivo de células totipotentes mantenido en el medio primario, la velocidad de multiplicación del cultivo de células totipotentes mantenido en el medio secundario se incrementa por el tratamiento con una temperatura fría. Por consiguiente, en determinadas realizaciones, los métodos para el tratamiento con frío del cultivo de células totipotentes en el medio secundario son los mismos que se han dado a conocer más arriba para el cultivo de células totipotentes en el medio primario. De acuerdo con las realizaciones particulares de la presente invención, se prefiere el medio secundario para el mantenimiento y el tratamiento con frío del cultivo de células totipotentes.

En otras realizaciones de la presente invención, los tratamientos con frío se incorporan en el ciclo de micropropagación. En consecuencia, en una realización se da a conocer un ciclo de micropropagación para el cultivo celular embriogénico en donde el ciclo de micropropagación (intervalos del subcultivo) es de 2 a 6 semanas en la oscuridad a la temperatura ambiente con intercalación de un tratamiento con frío en la oscuridad a 4-10 °C. En las realizaciones representativas, el tratamiento con frío comprende tratar el cultivo celular embriogénico con una temperatura fría durante un periodo en un intervalo de aproximadamente un mes a aproximadamente diez meses, o más. Así pues, el tratamiento con frío puede ser de aproximadamente uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce meses, y similares. En las realizaciones particulares, el tratamiento con frío puede ser de aproximadamente una semana, dos semanas, tres semanas, cuatro semanas, cinco semanas, seis semanas, siete semanas u ocho semanas, y similares. En más realizaciones, el tratamiento con frío puede ser de unos 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 145, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 305, 310, 315, 320, 330, 335, 340, 345, 350, 355, 360, 365 días, o cualquier combinación de los mismos. En más realizaciones, el tratamiento con frío

5 puede estar en un margen de aproximadamente 2 semanas a unas 6 semanas, de aproximadamente 2 semanas a unas 8 semanas, de aproximadamente 2 semanas a unas 10 semanas, de aproximadamente 2 semanas a unas 12 semanas, de aproximadamente 2 semanas a unas 14 semanas, de aproximadamente 2 semanas a unas 16 semanas, de aproximadamente 4 semanas a unas 8 semanas, de aproximadamente 4 semanas a unas 12 semanas, de aproximadamente 4 semanas a unas 16 semanas, de aproximadamente 4 semanas a unas 20 semanas, de aproximadamente 4 semanas a unas 24 semanas, de aproximadamente dos meses a unos cuatro meses, de aproximadamente dos meses a unos seis meses, de aproximadamente dos meses a unos ocho meses, de aproximadamente dos meses a unos diez meses, de aproximadamente dos meses a unos doce meses, de aproximadamente cuatro meses a unos seis meses, de aproximadamente cuatro meses a unos ocho meses, de aproximadamente cuatro meses a unos diez meses, de aproximadamente cuatro meses a unos doce meses, de aproximadamente seis meses a unos ocho meses; de aproximadamente seis meses a unos diez meses, de aproximadamente seis meses a unos doce meses o de aproximadamente seis meses a unos catorce meses, y similares. En una realización particular, el tratamiento con frío se encuentra en un margen de aproximadamente 4 semanas a unas 6 semanas. El ciclo de micropropagación es útil con cualquiera de los medios en los cuales se mantiene y propaga el cultivo de células totipotentes.

10 La presente invención da a conocer adicionalmente un método de tratamiento con frío a largo plazo o prolongado (a saber, conservación en frío) de los cultivos celulares embriogénicos consolidados en el medio secundario. Así pues, la presente invención da a conocer adicionalmente un método en el que el cultivo celular embriogénico totipotente se puede conservar a largo plazo a temperatura fría. Por consiguiente, los cultivos que producen un exceso de la masa mínima requerida para el mantenimiento se pueden mantener y conservar a una temperatura fría para acumular reservas. En algunas realizaciones, la conservación en frío se produce en la oscuridad. En otras realizaciones, los cultivos celulares se conservan a temperatura fría con luz. En las realizaciones particulares, los cultivos se pueden mantener en el medio gastado. Tal y como se describió previamente, los inventores han encontrado que los cultivos mantenidos en la oscuridad mientras están en conservación con frío incrementan la velocidad de multiplicación e incrementan la longevidad en comparación con los mantenidos con luz. La duración y la temperatura de la conservación prolongada o a largo plazo en frío son las mismas que se describen más arriba para los tratamientos con frío de los cultivos de las células embriogénicas totipotentes.

20 En otras realizaciones, el cultivo celular embriogénico totipotente, que se conserva a largo plazo a temperatura fría, se subcultiva durante la conservación. En otras realizaciones, el cultivo celular embriogénico totipotente, que se conserva a largo plazo a una temperatura fría, no se subcultiva durante la conservación. Los cultivos que se mantienen en conservación durante un tiempo prolongado o a largo plazo necesitan ser «rehabilitados». La rehabilitación se refiere a la transferencia de los cultivos conservados a medio nuevo. En algunas realizaciones, cuando los cultivos se despertaron de la conservación, el subcultivo o transferencia a medio nuevo se realiza cada dos a seis semanas. En otras realizaciones, el subcultivo se puede producir aproximadamente cada cuatro a seis semanas, aproximadamente cada una a ocho semanas o aproximadamente cada dos a ocho semanas, y similares. En más realizaciones, el subcultivo se produce aproximadamente cada semana, aproximadamente cada dos semanas, aproximadamente cada tres semanas, aproximadamente cada cuatro semanas, aproximadamente cada cinco semanas, aproximadamente cada seis semanas, aproximadamente cada ocho semanas, y similares. Una vez que los cultivos se despiertan de la conservación, el subcultivo se suele realizar de forma regular.

#### 40 **Micropropagación como cultivos pluricaulinares**

Después de finalizar la etapa del cultivo secundario en el medio secundario, el tejido totipotente se puede transferir a un medio terciario en el cual continúa la multiplicación y se inducen las plántulas completas. Por consiguiente, de acuerdo con las realizaciones de la presente invención, se da a conocer un método en el que el cultivo de células embrionarias totipotentes se transfiere desde el medio secundario a un medio terciario para que continúe la multiplicación del cultivo celular y para que se produzca una plántula con raíz y vástago. La figura 3D muestra las plantas de *A. donax* regeneradas del cultivo celular embriogénico y que se multiplican en el medio de cultivo terciario. Los ejemplos de las plantas de *Miscanthus x giganteus* regeneradas del cultivo celular embriogénico en el medio terciario se dan muestran en las figuras 4C, 4D y 4E. La figura 5D muestra las plantas de *Scirpus californicus* regeneradas del cultivo celular embriogénico en medio terciario.

50 Un medio que es útil para la etapa del cultivo terciario (a saber, medio terciario) puede ser cualquier medio basal utilizado para el cultivo de tejidos vegetales. Los expertos en la técnica conocen bien tales medios. En una realización, el medio terciario se complementa con al menos una hormona vegetal (p. ej., regulador del crecimiento de la planta). Los ejemplos de hormonas vegetales adecuadas para el medio terciario incluyen citocininas y compuestos con actividad de tipo citocinina. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la única hormona presente en el medio terciario es la citocinina. Las citocininas útiles en la presente invención incluyen, pero sin limitarse a ellos, tidiazurón, zeatina, benciladenina, cinetina, hemisulfato de adenina y dimetilaliladenina, y combinaciones de los mismos. En una realización, el medio terciario se complementa con tidiazurón. La presente invención da a conocer adicionalmente un método en el que el medio terciario se complementa con la hormona vegetal a una concentración que es menor que la utilizada en el medio primario.

60 Los inventores observan que el uso de la citocinina sintética, el tidiazurón, en la presente invención dio lugar a un efecto sorprendente. Tal y como se explicó previamente, el callo embriogénico se obtiene típicamente de

monocotiledóneas por inducción del cultivo celular primario en un medio que contiene una o más auxinas u hormonas vegetales de tipo auxina seguido de una etapa de cultivo secundario a una concentración más baja de auxina, pero en presencia de una citocinina o de una hormona vegetal de tipo citocinina. El potencial embriogénico de los cultivos celulares de las monocotiledóneas producidos mediante estos métodos disminuye con el tiempo y hace necesario reiniciar repetidamente el cultivo celular primario (patente de los Estados Unidos n.º 6 153 812 expedida el 28 de noviembre de 2000; Trigiano y Gray, *Plant tissue culture concepts and laboratory exercises*. 2.ª ed., Boca Raton: CRC Press (2000)). En cambio, la combinación de hormonas explicada en la presente invención tiene como resultado inesperado que el callo primario inducido a partir del explante ya muestra embriogénesis sin necesidad de una etapa de cultivo secundario y que la capacidad embriogénica no disminuye con el tiempo.

Como saben los expertos en la técnica, las citocininas, tanto naturales como sintéticas, se utilizan para inducir la formación de los vástagos al mismo tiempo que se inhibe la formación de la raíz (Trigiano y Gray, *Plant tissue culture concepts and laboratory exercises*. 2.ª ed., Boca Raton: CRC Press (2000)). No obstante, en la presente invención, el uso de citocininas, tal como la citocinina sintética tidiazurón, produjo un efecto sorprendente y era que durante la transferencia desde el medio primario de cultivo que contenía una combinación de auxinas y citocininas a un medio sin auxina, pero con la citocinina (p. ej., tidiazurón), no sólo se promovió el alargamiento caulinar, sino que inesperadamente también se produjo la formación de raíces.

En algunas realizaciones, el medio para el cultivo terciario (a saber, el medio terciario) tal y como da a conocer la presente invención comprende una fuente de carbono. La fuente de carbono para el medio terciario puede ser cualquier fuente de carbono adecuada conocida por los expertos en la técnica (Slater et al., *Plant biotechnology, the genetic manipulation of plants*, Oxford University Press, 368 págs., (2003)). La fuente de carbono útil para el medio terciario incluye, pero sin limitarse a ellos, azúcares tal como sacarosa, glucosa, maltosa, galactosa y sorbitol, y los similares. Al igual que ocurre con los medios primario y secundario, la fuente de carbono preferente para el medio terciario es la sacarosa.

En una realización, el medio terciario se prepara añadiendo a agua estéril (a) la citocinina tidiazurón; (b) sacarosa a 30 g/l; (c) unos 3 ml de solución de sales de Miller (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> al 6%, p/v); y (d) sales MS a 4,3 g/l. En una realización, la concentración del tidiazurón es de unos 0,01 mg/l a aproximadamente 1 mg/l. En otra realización, la concentración del tidiazurón es de unos 0,02 mg/l.

El medio terciario se puede gelificar y esterilizar tal y como se describe para el medio primario y secundario. A continuación, se puede utilizar tejido totipotente de la etapa de cultivo secundario para inocular el medio terciario. Luego se cultiva el medio de cultivo terciario inoculado, en cualquier régimen de luz, para obtener plantas enraizadas. La etapa de cultivo terciario se puede llevar a cabo durante un periodo de tiempo o a cualquier temperatura suficiente para obtener el alargamiento caulinar y plantas enraizadas. En una realización, las condiciones de cultivo incluyen luz continua, aproximadamente a temperatura ambiente, durante un periodo de aproximadamente una semana a unas cuatro semanas.

En más realizaciones, el medio terciario comprende la citocinina tidiazurón. Aún en otras realizaciones, el tidiazurón está presente en el medio terciario a una concentración de aproximadamente 0,02 mg/l.

La temperatura y la duración de la etapa de cultivo terciario no son críticas y puede ser cualquier temperatura o duración suficientes para producir plántulas completas con raíces y con alargamiento caulinar parcial. En las realizaciones representativas, la temperatura y la duración de la etapa de cultivo terciario son similares a las descritas más arriba para la etapa de cultivo primario.

En el caso de las plantas monocotiledóneas de la presente invención (por ejemplo, *Arundo donax*, *Thysanolaena maxima*, *Miscanthus x giganteus*, *Miscanthus floridulus*, *Scirpus validus* y *Scirpus californicus*), la etapa de cultivo terciario da lugar a plántulas completas con raíz y alargamiento caulinar parcial que se adaptan ventajosamente a los contenedores de propagación de plantas que se emplean habitualmente. Además, los cultivos terciarios resultantes no interfieren con la manipulación de las plántulas con las herramientas utilizadas para la transferencia durante la división de los cultivos.

El cultivo celular embriogénico obtenido en la etapa de cultivo primario se puede mantener indefinidamente en el medio de cultivo terciario con pases regulares a medio nuevo. Por lo tanto, el método es adecuado no sólo para el mantenimiento y la propagación continuos de las líneas de cultivo celular totipotente, sino también para el mantenimiento de líneas de cultivo continuo de tejido regenerable.

### **Aclimatación y plantación**

Al finalizar la etapa de cultivo terciario, las plántulas se pueden trasladar bien directamente al suelo para la aclimatación, o se pueden transferir a un medio cuaternario para permitir la aclimatación gradual en condiciones no estériles y fotoautótrofas. La aclimatación suele implicar una introducción de una plántula en condiciones del aire del entorno, entre ellas, humedad, temperatura y ausencia de esterilidad. En una realización, la aclimatación comprende retirar gradualmente las tapas de las placas de cultivo para exponer las plántulas en medio cuaternario a las condiciones de ausencia de esterilidad y humedad más baja. La aclimatación típicamente comprende adicionalmente la estimulación de la plántula para que comience a realizar la fotosíntesis por el hecho de que los

medios cuaternarios y/o el suelo no proporcionan una fuente de carbono gratuita, tal como la sacarosa.

En una realización, las plántulas se transfieren del medio terciario a un medio cuaternario que es similar al medio utilizado para la etapa del cultivo terciario, pero que no tiene hormonas vegetales, ni vitaminas ni fuente de carbono.

5 La etapa de cultivo cuaternario se puede llevar a cabo durante un periodo de tiempo y a cualquier temperatura suficiente para que las plántulas se aclimaten. Así pues, en las realizaciones representativas, la temperatura para la etapa del cultivo cuaternario es similar a la descrita para las etapas de cultivo primario y secundario. En las realizaciones particulares, la etapa del cultivo cuaternario se consigue llevar a cabo a una temperatura sustancialmente ambiental.

10 En una realización ejemplar, la duración de la etapa cuaternaria puede estar en el margen de aproximadamente una semana a unas cuatro semanas o más. En otras realizaciones, la duración de la etapa cuaternaria puede ser de una, dos, tres y cuatro semanas, y similares. En otras realizaciones, la duración puede ser de un mes, dos meses, tres meses o más. Aún en otras realizaciones, la duración de la etapa cuaternaria es de aproximadamente una semana a unas tres semanas, de aproximadamente una semana a unas cinco semanas, de aproximadamente una semana a unas seis semanas, de aproximadamente una semana a unas ocho semanas, de aproximadamente dos semanas a unas cuatro semanas, de aproximadamente dos semanas a unas seis semanas, de aproximadamente dos semanas a unas ocho semanas, de aproximadamente dos semanas a unas doce semanas o de aproximadamente cuatro semanas a unas ocho semanas, y similares.

20 Un medio que es útil para la etapa del cultivo cuaternario (a saber, el medio cuaternario) puede ser cualquier medio basal que se utilice para el cultivo de tejidos vegetales. Los expertos en la técnica conocen bien tales medios, que incluyen, pero sin limitarse a ellos, medio MS y medio B5 de Gamborg (completo o % de fuerza iónica) sin una fuente de carbono, ni de vitaminas, ni de hormonas ni de ningún otro aditivo, tal como mezclas de nutrientes, tamponantes, compuestos antimicóticos, aminoácidos, ácidos orgánicos, nucleótidos, nucleósidos, bases, endurecedores y similares.

25 En la figura 3E se muestra un ejemplo de plantas de *A. donax* transferidas a macetas desde el medio cuaternario después de la aclimatación. En la figura 5C se muestra a *Scirpus validus* en la etapa de aclimatación.

### Transporte

30 Las aplicaciones del campo biotecnológico tal como la restauración del hábitat, la remediación y la producción de biomasa requieren la producción de propágulos a escala industrial. Según la escala, parte o toda la tecnología de propagación necesita desplegarse a un lugar cómodo cerca de donde se va a aplicar. Por consiguiente, para estas aplicaciones se necesitan la conservación y la movilización del acopio de reservas de propágulos en la etapa del desarrollo adecuado.

35 Para la plantación a escala industrial, la presente invención da a conocer métodos en donde los cultivos, plántulas o plantas de cualquiera de las diferentes etapas de cultivo descritas en la presente memoria se pueden trasladar cerca del lugar donde se realizará la plantación final. En algunas realizaciones de la presente invención, después de finalizar la etapa de cultivo secundario, las placas de cultivo que están llenas de tejido totipotente se acumulan por conservación en frío en un número suficiente para un proyecto de plantación determinado. Las placas se pueden transportar mediante cualquier medio de transporte en un compartimento frío hasta una instalación de propagación adecuada en donde luego se pueden desempaquetar y hacer propagar adicionalmente si fuera necesario, o transferir al medio terciario.

40 El compartimento en el cual los cultivos, plántulas y plantas se transportan puede estar aislado o refrigerado. Cuando el tiempo de transporte es de menos de 3 semanas, el compartimento utilizado para transportar los cultivos, las plántulas o las plantas puede estar aislado y mantenido a temperatura ambiente. Cuando el tiempo necesario para el transporte es tres semanas o más, o si las condiciones así lo necesitaran, los cultivos, las plántulas o las plantas se pueden transportar en compartimentos mantenidos a temperatura fría. La temperatura del compartimento frío puede ser aproximadamente la misma que las descritas más arriba para el tratamiento con frío y para la conservación en frío de los cultivos celulares embriogénicos.

45 Los materiales vegetales que se pueden transportar incluyen cualquiera de los materiales vegetales descritos en la presente memoria, entre ellos, el cultivo celular embriogénico, el cultivo de tejidos, las plántulas, las plantas o los propágulos. Así pues, los propágulos se transportan como cultivos celulares embriogénicos en placas de cultivo con medio semisólido en la oscuridad a la temperatura ambiente o a la temperatura de almacenamiento en frío. Los tipos de propágulos que se pueden transportar incluyen, pero sin limitarse a ellos, cultivos caulinares para micromacollación terciaria en líquido, cultivos caulinares para micromacollación terciaria en medio de cultivo semisólido en cubetas o bolsas, cultivos pluricaulinares para micromacollación en cultivos líquidos sin azúcares en cubetas, y aclimatación de plantas empaquetadas con las raíces sin enterrar. La elección del propágulo transportado depende de la necesidad, de la demanda y de las condiciones del lugar.

55 Las distancias a las cuales los materiales vegetales se pueden transportar pueden ser distancias largas o cortas. Por consiguiente, los materiales vegetales se pueden mantener en tránsito durante aproximadamente un día o menos, o

durante aproximadamente 30 días o más.

Por consiguiente, tal y como se describe en la presente memoria, los tratamientos con frío sirven para varios propósitos. Los tratamientos con frío mejoran la longevidad del cultivo de tejidos, de las plántulas, de las plantas y de los propágulos, permiten el transporte rentable y seguro y/o aceleran el crecimiento totipotente una vez que los materiales vegetales se desempaquetan y se cultivan posteriormente en el sitio de destino final. La figura 3F muestra el porte de una planta de *A. donax* consolidada a partir de plantas clonadas *in vitro*.

### Potenciación de la mejora genética somaclonal y de la manipulación genética

Un factor limitante importante asociado a las aplicaciones biotecnológicas emergentes de las plantas de cultivo no tradicional es la ausencia de material vegetal de élite. El material vegetal de élite es material vegetal seleccionado por sus características fenotípicas y genotípicas deseables. Como tal, el material vegetal de élite incluye, pero sin limitarse a ellos, clones vegetativos, híbridos F1 y materiales vegetales endogámicos seleccionados por sus características fenotípicas y genotípicas deseables. La tecnología de la mejora genética clásica se basa principalmente en el uso de líneas (puras) endogámicas, cruces y análisis de progenies. Es raro que haya líneas puras disponibles para las especies vegetales silvestres medioambientalmente importantes y obtenerlas es un proceso muy tedioso. El uso de cultivos de tejidos totipotentes para inducir la variación somaclonal (genética y/o epigenética) en los materiales vegetales clonales puede proporcionar atajos y una mayor eficacia.

En la presente memoria se encuentra descrito un método para producir una línea vegetal de élite que comprende: seleccionar al menos un rasgo de interés en el cultivo celular embriogénico totipotente y/o plántula producido por los métodos de la presente invención, en donde al menos un rasgo de interés procede de la variación somaclonal o de la introducción de al menos una secuencia nucleotídica heteróloga en el genoma de una célula del cultivo celular embriogénico totipotente y/o plántula, y cultivar el cultivo celular embriogénico totipotente y/o plántula que comprende al menos un rasgo de interés para producir una línea vegetal de élite.

Se describen más realizaciones, en las que al menos un rasgo de interés es la resistencia y/o incremento de la tolerancia a una condición medioambiental. En algunas realizaciones, el incremento de la tolerancia es a la presencia de un contaminante químico en el entorno. En otras realizaciones, la resistencia o incremento de la tolerancia es a un fenol halogenado o a otro xenobiótico. En las realizaciones adicionales, la resistencia o el incremento de la tolerancia es a las sales.

Aún en otras realizaciones, otras características por las que se pueden seleccionar las líneas de élite incluyen, pero sin limitarse a ellas, mejora de la morfología, mejora de los parámetros de biomasa, mejora de la tolerancia a plagas y patógenos, y cualquier combinación de las mismas. La mejora de los parámetros de biomasa incluye, pero sin limitarse a ellas, la proporción de celulosa/lignina y la calidad de la fibra, y cualquier combinación de las mismas.

Cuando se incrementan la longitud y el volumen de la fase totipotente, en especial la fase de cultivo celular embriogénico, se incrementarán las variaciones somaclonales; por consiguiente, permitirá una selección a nivel celular muy eficaz de líneas de élite originadas por eventos somaclonales o de transferencia génica. En algunas realizaciones, los cultivos secundarios totipotentes continuos incrementan adicionalmente la eficacia de la selección al extender la selección de rasgos, que se expresan sólo a nivel de los vástagos diferenciados. Además, en algunas realizaciones se puede obtener una población de élite alterada sin la generación ni la caracterización de las líneas individuales, si la presión selectiva se aplica constantemente a los cultivos embriogénicos hasta que se diferencian las plantas de los cultivos secundarios. La población de élite alterada resultante se puede utilizar directamente en aplicaciones sin reducir adicionalmente la variación genética natural en la población de élite por una segunda clonación.

Los cultivos celulares totipotentes continuos también proporcionan un sistema excelente para todas las formas de mejora genética molecular, entre ellas la introducción de genes de interés y de construcciones genéticas complejas, con el uso de la transformación genética para la manipulación epigenética y genética de estas plantas.

Por consiguiente, se describen en la presente memoria realizaciones en las que el explante se selecciona de una planta transgénica transformada estable con al menos una secuencia nucleotídica heteróloga. En otras realizaciones, al menos una secuencia nucleotídica heteróloga se introduce en una célula del cultivo celular embriogénico totipotente que se hizo crecer en el medio primario o en el secundario para producir un cultivo celular embriogénico totipotente transgénico y estable. Otras realizaciones comprenden producir una plántula transgénica y/o una planta a partir del cultivo celular embriogénico totipotente transgénico.

Otras realizaciones comprenden introducir al menos una secuencia nucleotídica heteróloga de interés en una célula del cultivo celular embriogénico que creció en el medio terciario para producir un cultivo celular embriogénico transgénico y estable y/o una plántula transgénica estable con vástago y raíz. Otra realización da a conocer un método para introducir al menos una secuencia nucleotídica heteróloga de interés en una célula de una plántula producida por los métodos de la presente invención que creció en medio terciario o medio cuaternario para producir una plántula transgénica estable con vástago y raíz y/o una planta transgénica estable. Aún en otra realización, se da a conocer un método en el que al menos una secuencia nucleotídica heteróloga se introduce en una célula de la plántula o planta aclimatada producida por los métodos de la presente invención para producir una plántula y/o

planta transgénica estable.

La secuencia nucleotídica heteróloga de interés puede ser cualquier secuencia nucleotídica heteróloga e incluye, pero sin limitarse a ellas, secuencias nucleotídicas que codifican genes de resistencia a antibióticos, genes de resistencia a plaguicidas, genes de resistencia a las sales, genes de reductasas de mercurio, gen de la liasa organomercuríca, genes de la toxina Bt y cualquier combinación de los mismos. Las secuencias nucleotídicas de interés de la presente invención también pueden codificar los ARNpi que reprimen los genes de la biosíntesis de los polisacáridos y de la lignina. Los genes de la biosíntesis de los polisacáridos y de la lignina los conocen bien los expertos en la técnica (véanse, por ejemplo, Boerjan et al., *Annu. Rev. Plant Biol.* 54: 519-546 (2003) y Burton et al, *Planta* 221: 309-312 (2005)). Así pues, los genes de la biosíntesis de la lignina incluyen, pero sin limitarse a ellos, alcohol cinamílico deshidrogenasa, cinamoil coenzima-A reductasa, ácido cafeico O-metiltransferasa, cafeoil-CoA O-metiltransferasa, 4-cumarato-coenzima A ligasa, y similares. Los genes de la biosíntesis de los polisacáridos incluyen, pero sin limitarse a ellos, glucosiltransferasas, complejo de la celulosa sintasa, endoglucanasas y similares.

En una célula de un cultivo celular embriogénico o de una célula vegetal se puede introducir una secuencia nucleotídica mediante cualquier método conocido por los expertos en la técnica. Los procedimientos para transformar una amplia gama de especies vegetales se conocen bien y son cotidianos en la técnica, y se describen en la bibliografía. Tales métodos incluyen, pero sin limitarse a ellos, la transformación por la administración de ADN mediante bacterias, administración de ADN mediante virus, administración de ADN mediante bigotes de ADN o carburo de sílice, administración de ADN mediante liposomas, microinyección, bombardeo con micropartículas, electroporación, sonicación, infiltración, captación de ADN mediante PEG y cualquier otro mecanismo eléctrico, químico, físico o biológico que dé lugar a la introducción de ADN en la célula vegetal, y cualquier combinación de los mismos. Las guías generales para los diferentes métodos de transformación de plantas conocidos en la técnica incluyen Miki et al («Procedures for introducing foreign DNA into plants» en *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Glick, B. R. y Thompson, J. E., Eds. (CRC Press, Inc., Boca Raton, 1993), págs. 67-88) y Rakowoczy-Trojanowska (*Cell. Mol. Biol. Lett.* 7: 849-858 (2002)).

La administración de ADN mediante bacterias incluye, pero sin limitarse a ella, la administración de ADN mediante *Agrobacterium* spp y se describe, por ejemplo, en Márton et al., (*Nature* 277: 129-131 (1979)); Horsch et al., (*Science* 227:1229 (1985); Ishida et al., (*Nature Biotechnol.* 14: 745-750 (1996)); y Fraley et al., (*Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 4803 (1983)). La transformación mediante otras diferentes especies bacterianas se describe, por ejemplo, en Broothaerts et al. (*Nature* 433: 629-633 (2005)).

La administración física de las secuencias nucleotídicas mediante el bombardeo de micropartículas se describe, por ejemplo, en Sanford et al., (*Methods in Enzymology* 217: 483-509 (1993)) y McCabe et al., (*Plant. Cell Tiss. Org. Cult.* 33: 227-236 (1993)).

Otro método para la administración física del ADN a las plantas es la sonicación de las células destinatarias. Este método se describe, por ejemplo, en Zhang et al., (*BioTechnology* 9: 996 (1991)). Alternativamente, la fusión se liposomas o esferoplastos se puede utilizar para introducir secuencias nucleotídicas en las plantas. Ejemplos del uso de la fusión de liposomas o de esferoplastos se dan a conocer en Deshayes et al., (*EMBO J.*, 4: 2731 (1985) y Christou et al., (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 3962 (1987)). La captación directa del ADN en los protoplastos por precipitación con CaCl<sub>2</sub>, alcohol polivinílico o poli-L-ornitina, se describe, por ejemplo, en Hain et al. (*Mol. Gen. Genet.* 199: 161 (1985) y Draper et al. (*Plant. Cell Physiol.* 23: 451 (1982)). La electroporación de protoplastos y de células completas y de tejidos se describe, por ejemplo, en Donn et al., (en *Abstracts of VIIth International Congress on Plant Cell and Tissue Culture IAPTC*, A2-38, p 53 (1990); D'Halluin et al., (*Plant. Cell.* 4: 1495-1505 (1992)); Spencer et al., (*Plant. Mol. Biol.* 24: 51-61 (1994)) y Fromm et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 5824 (1985)). La precipitación con polietilenglicol (PEG) se describe, por ejemplo, en Paszkowski et al., (*EMBO J.* 3: 2717-2722 (1984)). La microinyección de los protoplastos de células vegetales o de callo embriogénico se describe, por ejemplo, en Crossway (*Mol. Gen. Genetics* 202: 179-185 (1985)). La metodología con bigotes de carburo de sílice se describe, por ejemplo, en Dunwell et al., (*Methods Mol. Biol.* 111: 375-382 (1999); Frame et al., (*Plant. J.* 6: 941-948 (1994)); y Kaepler et al., (*Plant Cell Rep.* 9: 415-418 (1990)).

Además de estos diferentes métodos para introducir secuencias nucleotídicas en las células vegetales, están disponibles los métodos de vectores de expresión y de cultivo *in vitro* para la transformación de tejidos o células vegetales y la regeneración de las plantas para llevar a cabo los métodos de esta invención. Véase, por ejemplo, Gruber et al., («Vectors for Plant Transformation» en *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Glick, B. R. y Thompson, J. E., Eds. (CRC Press, Inc., Boca Raton, (1993), páginas 89-119).

Por consiguiente, en una realización se introduce una secuencia nucleotídica heteróloga dentro de una célula del cultivo celular embriogénico totipotente o de una célula vegetal producidas por los métodos de la presente invención mediante el cocultivo de la célula del cultivo celular embriogénico totipotente con *Agrobacterium tumefaciens* para producir un cultivo celular embriogénico totipotente transgénico y estable, o una célula vegetal transgénica estable.

En otra realización se da a conocer un método, en el que se introduce una secuencia nucleotídica heteróloga en una célula del cultivo celular embriogénico totipotente o en una célula vegetal producidas por los métodos de la presente invención mediante transferencia directa del ADN para producir un cultivo celular embriogénico totipotente



transgénico y estable o una célula vegetal transgénica.

Los métodos de la presente invención además dar a conocer la producción de una plántula y/o planta transgénica estable a partir del cultivo celular embriogénico totipotente transgénico o de la célula vegetal transgénica. En la técnica son cotidianos los métodos para seleccionar el cultivo celular, las células vegetales, o las plantas, transgénicos transformados y estables.

### Producción de asociaciones entre planta y microorganismo con un propósito determinado

Los cultivos celulares totipotentes asépticos continuos y los cultivos pluricaulinares también proporcionan un excelente sistema para producir asociaciones entre microorganismos y plantas antes de la aclimatación y de la transferencia al suelo. La especie microbiana o el consorcio se selecciona con una aplicación particular en mente y se pueden afinar para que proporcione adaptabilidad en un determinado lugar de plantación o para que contribuya con funciones metabólicas facultativas que, en sinergia con el propio metabolismo de la planta, y proporcione una mejora de la capacidad metabólica que resultarán útiles para diferentes aplicaciones tales como la fitorremediación o la conversión de material bruto.

En consecuencia, la presente invención da a conocer un método para establecer una asociación entre una planta y un microorganismo que comprende cocultivar al menos una plántula y/o planta producida por los métodos de la presente invención con al menos una especie microbiana en un medio cuaternario para establecer una asociación entre la planta y el microorganismo. Tal y como se describió previamente, el medio cuaternario de la presente invención carece de hormonas vegetales, de fuente de carbono y de vitaminas. En una realización de la invención, una especie microbiana se cocultiva con al menos una plántula y/o planta producida por los métodos de la presente invención para establecer una asociación entre la planta y el microorganismo. En otras realizaciones, se cocultivan dos o más especies microbianas con al menos una plántula y/o planta producida por los métodos de la presente invención.

En las realizaciones representativas, al menos una planta y/o plántula se selecciona entre las plántulas que crecen en el medio terciario. En otras realizaciones, al menos una planta y/o plántula es una plántula o planta que crece en medio cuaternario. Aún en otras realizaciones, al menos una plántula o planta es una planta o plántula que crece en el suelo. Adicionalmente, al menos una plántula o planta puede ser de líneas vegetales de élite producidas por los métodos de la presente invención.

Las especies microbianas que se pueden utilizar para establecer una asociación entre la planta y el microorganismo incluyen, pero sin limitarse a ellos, *Pseudomonas mallei*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas cepaica*, *Acinetobacter lwoffii*, *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus* y *Phyllobacterium* spp., y combinaciones de los mismos. En otras realizaciones de la invención, una plántula que tiene establecida una asociación entre la planta y el microorganismo está aclimatada a las condiciones fotosintéticas y sin esterilidad.

Por consiguiente, en algunas realizaciones de la invención la asociación entre la planta y el microorganismo es entre *Arundo donax* y un microorganismo seleccionado entre el grupo que consiste en *Pseudomonas mallei*, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter lwoffii*, *Pseudomonas cepaica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis* y *Phyllobacterium* spp., y combinaciones de los mismos.

En otras realizaciones, la asociación entre la planta y el microorganismo es entre *Thysanolaena maxima* y un microorganismo seleccionado entre el grupo que consiste en *Pseudomonas mallei*, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter lwoffii*, *Pseudomonas cepaica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis* y *Phyllobacterium* spp., y combinaciones de los mismos.

En otras realizaciones, la asociación entre la planta y el microorganismo es entre *Miscanthus x giganteus* y un microorganismo seleccionado entre el grupo que consiste en *Pseudomonas mallei*, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter lwoffii*, *Pseudomonas cepaica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis* y *Phyllobacterium* spp., y combinaciones de los mismos.

Aún en otras realizaciones, la asociación entre la planta y el microorganismo es entre *Miscanthus floridulus* y un microorganismo seleccionado entre el grupo que consiste en *Pseudomonas mallei*, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter lwoffii*, *Pseudomonas cepaica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis* y *Phyllobacterium* spp., y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones de la presente invención, la asociación entre la planta y el microorganismo es entre *Scirpus californicus* y un microorganismo seleccionado entre el grupo que consiste en *Pseudomonas mallei*, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter lwoffii*, *Thysanolaena maxima*, *Pseudomonas cepaica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis* y *Phyllobacterium* spp., y combinaciones de los mismos.

En otras realizaciones, la asociación entre la planta y el microorganismo es entre *Scirpus validus* y un microorganismo seleccionado entre el grupo que consiste en *Pseudomonas mallei*, *Acinetobacter baumannii*,

*Acinetobacter lwoffii*, *Pseudomonas cepaica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis* y *Phyllobacterium* spp., y combinaciones de los mismos.

Después de completar la etapa de cocultivo, las placas se pueden transportar mediante cualquier medio de transporte a una instalación de propagación adecuada donde, luego, las plantas se pueden desempaquetar y aclimatar, y transplantar a suelo.

### **Fitorremediación**

La presente invención da a conocer adicionalmente métodos dirigidos a la fitorremediación. La fitorremediación se puede utilizar para retirar los contaminantes del entorno, entre ellos, pero sin limitarse a ellos, compuestos xenobióticos y otros compuestos o contaminantes tales como los presentes en el entorno a concentraciones que son más elevadas de lo normal.

Así pues, en una realización, la fitorremediación comprende consolidar en un medio líquido varias plantas producidas mediante los métodos de la presente invención, y que poseen las mismas características genéticas, y poner en contacto las raíces de las plantas con un contaminante medioambiental en el medio líquido, lo que ocasiona que el contaminante medioambiental sea retirado del medio líquido.

En otras realizaciones, la fitorremediación comprende consolidar en un terreno varias plantas generadas por los métodos de la presente invención, y que poseen las mismas características genéticas, y poner en contacto en el terreno las raíces de las plantas con el contaminante ambiental, lo que ocasiona que el contaminante medioambiental sea retirado del terreno.

En las realizaciones representativas, varias plantas comprende al menos dos plantas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, varias plantas comprende 10 plantas. En otras realizaciones de ejemplo, varias plantas comprende cientos o miles de plantas.

Las plantas que se pueden utilizar para la fitorremediación incluyen, pero sin limitarse a ellas, plantas que se generan a partir de plantas silvestres, de plantas cultivadas (crecidas en invernadero y en el campo) y de plantas regeneradas de explantes producidos por los métodos de la presente invención. Además, las plantas que se pueden utilizar en la fitorremediación comprenden líneas de élite producidas con los métodos descritos en la presente memoria.

La presente invención se explica con mayor detalle en los ejemplos no limitantes siguientes.

### **Ejemplos**

#### **Ejemplo 1**

#### **30 Incremento del ritmo de multiplicación mediante el tratamiento con frío del cultivo celular embriogénico de *Arundo***

El ritmo de multiplicación del cultivo celular embriogénico de *Arundo* en el medio de cultivo secundario se incrementa mediante un tratamiento previo en frío de seis meses, así como mediante la reducción del tamaño del inóculo inicial. Un incremento de la proporción de células embriogénicas se vuelve también obvio después del tratamiento con frío, lo que da lugar a un incremento del rendimiento de aproximadamente el 50%. En el caso de la propagación a gran escala donde el subcultivo es la etapa limitante (trabajo manual en una cámara de flujo laminar en condiciones estériles), los tratamientos con frío dan lugar a un incremento considerable de la eficacia. La tabla 1 muestra los datos para dos proporciones de masa inicial por medio y además muestra que una masa de inicio más pequeña da lugar a un ritmo de multiplicación mucho más alto.

40

**TABLA 1.** Proporción masa inicial por medio, para el cultivo celular embriogénico de *Arundo* en el medio de cultivo secundario.

Tratamiento sin frío				Tratamiento con frío			
Masa [g]	inicial	Masa final [g]	Veces de incremento	Masa [g]	inicial	Masa final [g]	Veces de incremento
	1,60	5,96	3,7		1,14	6,32	5,5
	1,95	6,04	3,1		1,53	6,31	4,1
	2,33	7,04	3,0		0,91	4,60	5,1
	1,93	6,11	3,2		1,27	5,31	4,2
	1,10	4,27	3,9		1,25	5,90	4,7
	1,60	5,68	3,6		1,59	6,62	4,2
	1,48	3,76	2,5		1,06	7,60	7,2
	1,20	3,10	2,6		1,27	5,41	4,3
	<b>1,65</b>		<b>3,2 ± 0,2</b>		<b>1,25</b>		<b>4,9 ± 0,4</b>
Tratamiento sin frío				Tratamiento con frío			
Masa [g]	inicial	Masa final [g]	Veces de incremento	Masa [g]	inicial	Masa final [g]	Veces de incremento
	0,60	4,22	7,0		0,61	5,86	9,6
	0,69	4,25	6,2		0,70	6,50	9,3
	0,72	5,01	7,0		0,59	5,77	9,8
	0,67	4,13	6,2		0,66	5,41	8,2
	0,72	4,34	6,0		0,55	5,45	9,9
	0,73	4,85	6,6		0,53	4,99	9,4
	<b>0,69</b>		<b>6,5 ± 0,2</b>		<b>0,61</b>		<b>9,4 ± 0,3</b>

5 Sin desear comprometerse con ninguna teoría de la invención en particular, la conservación en frío no sólo retrasa la senescencia sino que, tal como se explicó más arriba, induce cambios fisiológicos duraderos que ocasionan un incremento de la velocidad de crecimiento embriogénico después de la recuperación a una temperatura de crecimiento normal. El incremento de la velocidad de crecimiento se ha mantenido al menos durante 2-3 meses en condiciones con frío prolongado. La viabilidad se conservó al 100% en el frío (a 5-10 °C) durante al menos 10 meses con ensayos cada 4 semanas. La recuperación desde la conservación en frío (y totipotencia) se puede monitorizar al transferir los cultivos en condiciones que inducen la diferenciación (medio secundario en condiciones de cultivo a temperatura ambiente (25 a 27 °C) y con luz) y al medir los cambios del contenido de clorofila (un buen indicador de la cantidad de diferenciación caulinar en este sistema) así como de la velocidad de crecimiento.

10 Se señala que los presentes inventores iniciaron el primer cultivo embriogénico de *Arundo donax* en 1998 y que este cultivo se ha mantenido sin pérdida de la capacidad de regeneración durante más de 8 años. Los métodos de la presente invención también han permitido el inicio de cultivos celulares embriogénicos de manera repetible a partir de este mismo clon silvestre de *Arundo* y de otros clones ecotipo de diferentes hábitats de forma cotidiana cada año. Se han desarrollado varias líneas a partir de los ecotipos «Blossom» y «GT». Por lo que conocen los inventores, la presente invención es el primer informe de un cultivo celular embriogénico totipotente continuo de *Arundo donax*.

Los efectos positivos observados del tratamiento con frío de los cultivos fueron sorprendentes, ya que *Arundo donax*,

así como algunas de las otras especies de la presente invención, son especies subtropicales o mediterráneas y, por consiguiente, se consideran que son sensibles al frío.

## Ejemplo 2

### Rendimiento de la productividad y de la propagación

5 Lo siguiente es un experimento ejemplar que muestra el rendimiento de la productividad y de la propagación de la presente invención.

1. **Multiplicación en las placas de cultivo (cultivos primario y secundario).** Se consiguió un ritmo de multiplicación de cinco a diez veces en cuatro semanas en las etapas de cultivo primario y secundario (0,6 g a 1 g → 6 g a 7,5 g por ciclo de 4 semanas). Se transfirieron de aproximadamente 200 000 a unas 3 200 000 plantas en potencia por hora (considerando de uno a cuatro subcultivos terciarios). Se produjeron de unos 10 a 20 millones de plantas en potencia por m<sup>2</sup> de espacio de suelo en la cámara de cultivo embriogénico (considerando un único subcultivo terciario y 4000 placas por m<sup>3</sup> de caja).

2. **Transferencia a recipientes de cultivo (cultivo terciario) y multiplicación.** Se consiguió un ritmo de multiplicación de unas cuatro veces por ciclo de 3 semanas (30 g → 120 g) con un ritmo de desgaste de aproximadamente el 5%. Así pues, se transfirieron aproximadamente 240 000 plantas potenciales por hora.

La presente invención generó una gran cantidad de volumen. Por consiguiente, a partir de una sola placa de cultivo de cultivo celular embriogénico (6 a 7,5 g) después de 12 semanas (cuatro subcultivos terciarios), 160 000 plantas potenciales pasaron a la aclimatación.

3. **Cultivo cuaternario: aclimatación (dos a cuatro semanas).** La etapa 3 incluyó plantas listas para transferirse a compartimentos del invernadero así como plantas listas para campo de cuatro semanas de edad. Los parámetros utilizados en los cálculos incluyen lo siguiente. Cada placa de cultivo crecida completamente proporciona un cultivo embriogénico de unos 6 g a 7,5 g, que es aproximadamente 2500 plantas en potencia. Los cultivos terciarios se inician con unos 30 g de tejido embriogénico por recipiente o cuatro placas de cultivo de tejido por recipiente. El peso fresco de un cultivo crecido completamente en un recipiente es de 120 g, que es de aproximadamente 10 000 plantas potenciales.

## Ejemplo 3

### Transformación de explantes de *Arundo donax* mediante *Agrobacterium tumefaciens*

Se utilizó *Agrobacterium tumefaciens* portador del plásmido pMSF3022 para transformar los explantes de *Arundo donax* (segmentos transversales de inflorescencia inmadura). El plásmido pMSF3022 lleva el gen *bar* que confiere resistencia a la fosfotricina y proporciona una selección positiva, y el gen *gfp* (proteína fluorescente verde) que proporciona una selección visual de los transformantes. Se seleccionaron los transformantes resistentes al antibiótico durante cuatro semanas después de haber transferido el gen mediante la incubación de los explantes en medio de cultivo sólido primario con o sin fosfotricina y que contenía ticarcilina a una concentración de 400 mg/l para eliminar el *Agrobacterium* residual. Tal y como se muestra en la figura 6A, los explantes de control (sin transformar) se murieron con 10 mg/l de fosfotricina (antibiótico/herbicida). En ausencia del antibiótico/herbicida, los explantes de control desarrollan el callo embriogénico (figura 6B). En cambio, los explantes que se cocultivaron con *A. tumefaciens* que llevan el plásmido pMSF3022 (transformados) fueron capaces de desarrollar el callo embriogénico en presencia de 10 mg/l de fosfotricina (figura 6C). La figura 6D muestra que los explantes cocultivados desarrollan el callo embriogénico en ausencia del antibiótico/herbicida.

## Ejemplo 4

### Variación somaclonal en los cultivos celulares embriogénicos totipotentes continuos

Las plantas de *Arundo donax* regeneradas de los cultivos celulares embriogénicos que crecieron en medio de crecimiento secundario líquido como se describe en la presente memoria muestran una frecuencia más alta de variación somaclonal que los clones vegetativos producidos por esquejes en el invernadero. El rasgo elegido para demostrar la variación somaclonal es la actividad de deshalogenación oxidativa del extracto acelular de las raíces. Se demostró que la actividad de deshalogenación media de la población se incrementaba en los cultivos celulares embriogénicos crecidos en el medio de crecimiento secundario líquido en comparación con los clones vegetativos producidos por esquejes en el invernadero.

1. Ensayo de la actividad de deshalogenación oxidativa. El ensayo colorimétrico para medir la deshalogenación oxidativa mide la deshalogenación enzimática dependiente de peróxido del 2,4,6-triclorofenol (TCP) mediante extractos acelulares de raíces. El TCP es un contaminante medioambiental antropógeno, que es tóxico para los cultivos de células y para las plantas. La actividad de deshalogenación oxidativa es proporcional a la actividad peroxidasa total de la raíz ensayada mediante el TCP, que actúa convenientemente como el cromógeno de la reacción.

Las raíces se separaron, se enjuagaron con agua destilada, se secaron sobre papel absorbente y, si no se utilizaban inmediatamente, se congelaban en nitrógeno líquido para la conservación temporal. Las muestras se pesaron, se congelaron en un baño de etanol con hielo seco y se homogeneizaron en el tampón de extracción (KPO<sub>4</sub> a 50 mM, pH 5,3) en un tubo de microcentrifugación con un micromazo. El homogeneizado se centrifugó a 15 000 x g durante 20 min.

Para un ensayo enzimático estándar se añaden 500 µl del sobrenadante (extracto bruto) a 500 µl del tampón de ensayo. El tampón de ensayo contiene H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 20 mM y TCP a 1 mM en tampón Bistris a 20 mM (pH 5,9, 25 °C, 1 h). La intensidad del color a 525 nm es proporcional a la pérdida de TCP según se mide mediante HPLC.

La retirada del TCP de la fase líquida se ensaya midiendo el TCP sobre una columna de fase inversa NovaPak-C18 de 3,8 x 150 mm (parte n.º WAT086344, módulo de separaciones de HPLC Waters 2690 con un detector de matriz de fotodiodos Waters 996, sistema operativo Millennium 32, Waters Co.) en condiciones isocráticas (tamaño de la muestra: 50 µl; velocidad del flujo: 1 ml/min; sistema móvil: metanol ácido (MeOH – ácido acético al 5% en agua, 70:30, la detección a es a 289 nm)).

**2. La selección previa de los cultivos celulares embriogénicos en un xenobiótico halogenado da lugar a un incremento de la variación somaclonal.** Para seleccionar previamente los cultivos celulares embriogénicos, se disuelve el TCP en metanol, se esteriliza por filtración y se añade al medio enfriado tras la esterilización en autoclave justo antes de que solidifique en condiciones asépticas. El oscurecimiento del tejido se produce después de tres días a una concentración de TCP de 0,3 mM o mayor. La concentración mínima a la que se produce la necrosis y la parada del crecimiento es de 0,24 mM. El oscurecimiento parcial se produce con TCP entre 0,24 y 0,28 mM, pero algún tejido sobrevive incluso a esta concentración. La selección previa se lleva a cabo haciendo crecer los cultivos celulares embriogénicos en TCP a 0,24 mM. La actividad enzimática se ensaya 2 meses después (véase más adelante).

La aplicación de una presión selectiva altera la frecuencia de las variantes somaclonales. La exposición a concentraciones casi mortales de TCP da lugar a una mayor variabilidad genética, según se analizó mediante la actividad de deshalogenación. La figura 7 muestra la dispersión de la variabilidad genética que se obtiene de estos experimentos. La actividad, normalizada por peso fresco, se subdivide en intervalos arbitrarios de 1 unidad y el número relativo (% de ensayos totales) de individuos que caen en el intervalo se indica en el eje y de las figuras 7A, 7B y 7C. En comparación con la propagación en invernadero mediante esquejes tal y como se muestra en la figura 7A, la propagación basada en el cultivo celular embriogénico mostrada en la figura 7B dio lugar a un incremento del 14% de la actividad media de deshalogenación de la población por encima del percentil 95.º (5% superior). Para el 1% superior, el incremento fue del 31%.

Adicionalmente, la exposición de los cultivos embriogénicos a una concentración casi mortal de TCP dio lugar a una mayor variación genética en la población final de plantas según se analizó mediante la actividad de deshalogenación, y se muestra en la figura 7C. La figura 7C muestra que el incremento de la actividad media de la población por encima del percentil 95.º (5% superior) fue del 64% en comparación con la propagación vegetativa. Para el 1% superior, el incremento fue del 93%. La figura 7D también presenta los datos representados como cuartiles.

## Ejemplo 5

### Escrutinio previo de asociaciones compatibles e incompatibles entre plantas y microorganismos

Para determinar qué asociaciones entre plantas y microorganismos son compatibles y cuáles no lo son, se puede llevar a cabo el escrutinio previo de las diferentes asociaciones.

Para este ensayo previo de escrutinio, las raíces cortadas y estériles de *Arundo donax* se sumergen en cultivos líquidos individualizados con una cepa bacteriana y las raíces se colocan en el medio cuaternario de cultivo de plantas, líquido o solidificado con un gelificante. Las bacterias incompatibles ocasionan la alteración del color, infiltración, reacciones hipersensibles y, finalmente, necrosis de las raíces. Las cepas compatibles en las cuales las raíces permanecen normales se vuelven a ensayar con plantas intactas.

## Ejemplo 6

### Degradación del aceite en las asociaciones entre planta y microorganismo según se detecta mediante un ensayo de degradación de micropelícula

La desaparición de restos de aceite bruto y de determinados hidrocarburos poliaromáticos en contacto con las raíces colonizadas por las bacterias se puede ver mediante un ensayo de degradación de micropelícula. Sobre la superficie del medio mínimo nutritivo sin fuente de carbono se seca una película delgada de aceite bruto mediante la evaporación de una solución de solvente no polar (por ejemplo, hexano). El contraste entre la película de aceite y la región transparente creada por la bacteria (que aparece opaca) que coloniza las raíces se ve mediante la técnica fotográfica, que produce un aspecto opaco (blanquecino) debido a que se ve un papel opaco a través de la ventana transparente creada por la digestión de la película de aceite. La figura 8 muestra un ejemplo de un ensayo de

degradación de micropelícula en el que las raíces de *Arundo donax* están colonizadas por *Pseudomonas cepaica*.

Todo lo anterior ilustra la presente invención y no debe interpretarse como una limitación de la misma.

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para incrementar la velocidad de crecimiento de una masa celular embriogénica de un cultivo celular embriogénico totipotente de una familia de hierba monocotiledónea o de una planta de junco en operaciones a escala industrial, que comprende:
  - 5 (a) cultivar un explante de tejido del ápice caulinar de la planta monocotiledónea en un medio primario, en el que el explante se había tratado previamente con una temperatura fría y el medio primario comprende auxina o auxina y citocinina, para producir un cultivo celular embriogénico totipotente;
  - (b) tratar el cultivo celular embrionario totipotente con una temperatura fría para incrementar la velocidad de crecimiento de la masa del cultivo celular embrionario totipotente continuo en comparación con un control, en el
    - 10 que el tratamiento con una temperatura fría es para que dure de 30 días a 325 días y comprende una temperatura en un margen de 4 °C a 10 °C; y
    - (c) mantener el cultivo celular embriogénico totipotente mediante el cultivo adicional en el medio primario y/o en un medio secundario, mediante el cual se produce un cultivo de una planta monocotiledónea que tiene una mayor velocidad de crecimiento de la masa celular embriogénica con una velocidad de multiplicación de 5x a 8x
      - 15 en comparación con 2x a 3x para un control sin el tratamiento con frío.
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la planta monocotiledónea se selecciona entre el grupo que consiste en *Arundo* spp., *Thysanolaena* spp., *Miscanthus* spp., y *Scirpus* spp., y combinaciones de las mismas.
3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que además comprende micropropagar una planta monocotiledónea, comprendiendo el método la transferencia del cultivo celular embriogénico de la etapa (c) a un
  - 20 medio terciario para continuar la multiplicación y producir una plántula con raíz y vástago.
4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, que además comprende aclimatar la plántula mediante la transferencia de la plántula bien a un medio cuaternario o bien directamente a suelo para la aclimatación en condiciones fotosintéticas y sin esterilidad, lo que produce una plántula o planta aclimatada.
5. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el cultivo celular embriogénico se conserva, transporta y rehabilita para la producción de propágulos.
6. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la auxina del medio primario se selecciona entre el grupo que consiste en ácido 2,4-diclorofenoxiacético, ácido indolbutírico y picloram, y cualquier combinación de los mismos, y la citocinina del medio primario se selecciona entre el grupo que
  - 30 consiste en hemisulfato de adenina, dimetilaliladenina, zeatina, benciladenina, cinetina y tidiazurón, y cualquier combinación de los mismos.
7. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el medio secundario comprende auxina y citocinina.
8. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, en el que el medio terciario comprende citocinina, en el que además la citocinina se selecciona entre el grupo que consiste en tidiazurón,
  - 35 zeatina, benciladenina, cinetina y dimetilaliladenina, y combinaciones de los mismos.
9. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8, que además comprende la etapa de cocultivar al menos una plántula con al menos una especie microbiana en un medio cuaternario para establecer una asociación entre planta y microorganismo.
10. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, que comprende aclimatar la plántula que tiene una asociación consolidada entre planta y microorganismo a unas condiciones fotosintéticas y sin esterilidad.
11. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 10, que además comprende utilizar la plántula y/o planta en la fitorremediación, en los sistemas de fitorreactores o para la producción de biomasa.
12. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la fitorremediación comprende:
  - 45 consolidar muchas plantas que poseen las mismas características genéticas en un medio líquido o una superficie de terreno; y
    - poner en contacto las raíces de las plantas con un contaminante medioambiental en el medio líquido o en la superficie de terreno, lo que ocasiona que el contaminante medioambiental sea retirado del medio líquido.
13. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que además comprende la etapa de seleccionar al menos un rasgo de interés en el cultivo celular embriogénico totipotente, en el que al menos
  - 50 un rasgo de interés es un resultado de la variación somaclonal del cultivo celular embriogénico o de la introducción

de al menos una secuencia nucleotídica heteróloga en el genoma de una célula del cultivo celular embriogénico; y cultivar el cultivo celular embriogénico totipotente que comprende al menos un rasgo de interés para producir una línea vegetal de élite.

- 5 14. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, en el que al menos un rasgo de interés es la resistencia y/o incremento de la tolerancia a una condición medioambiental.



**Figura 1**

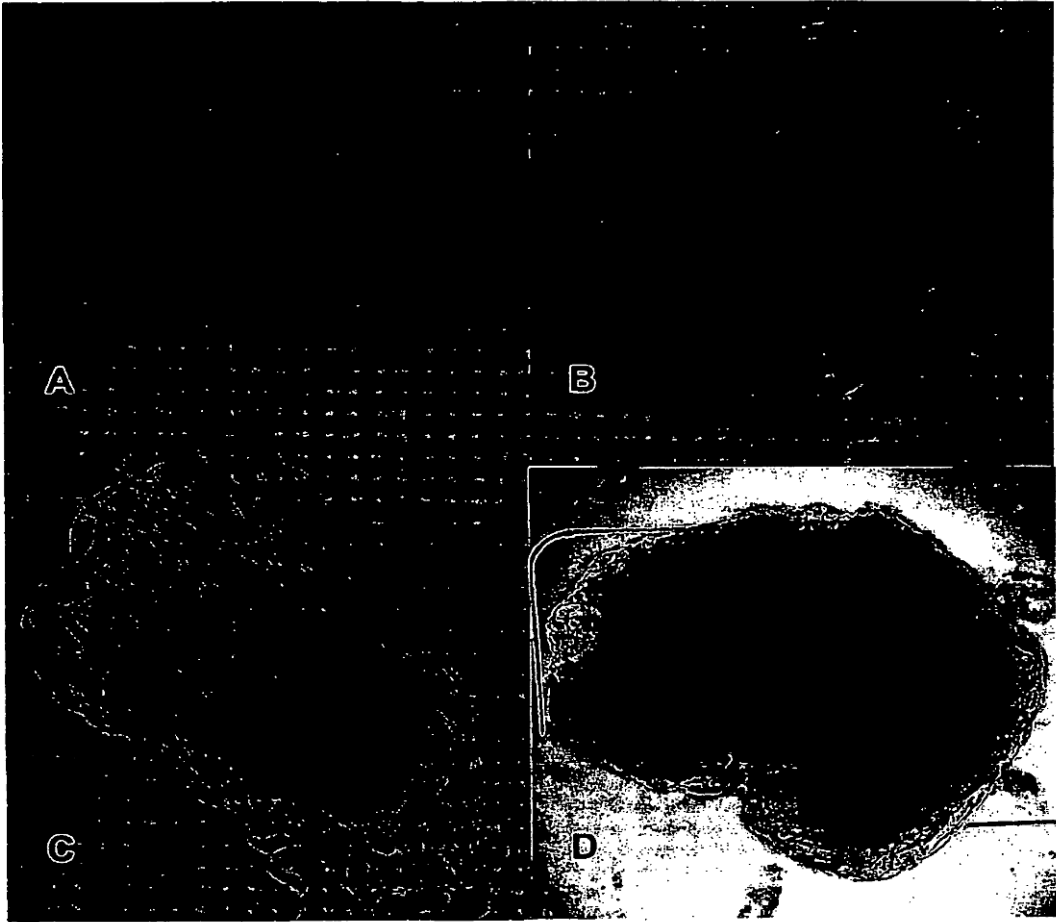


Figura 2

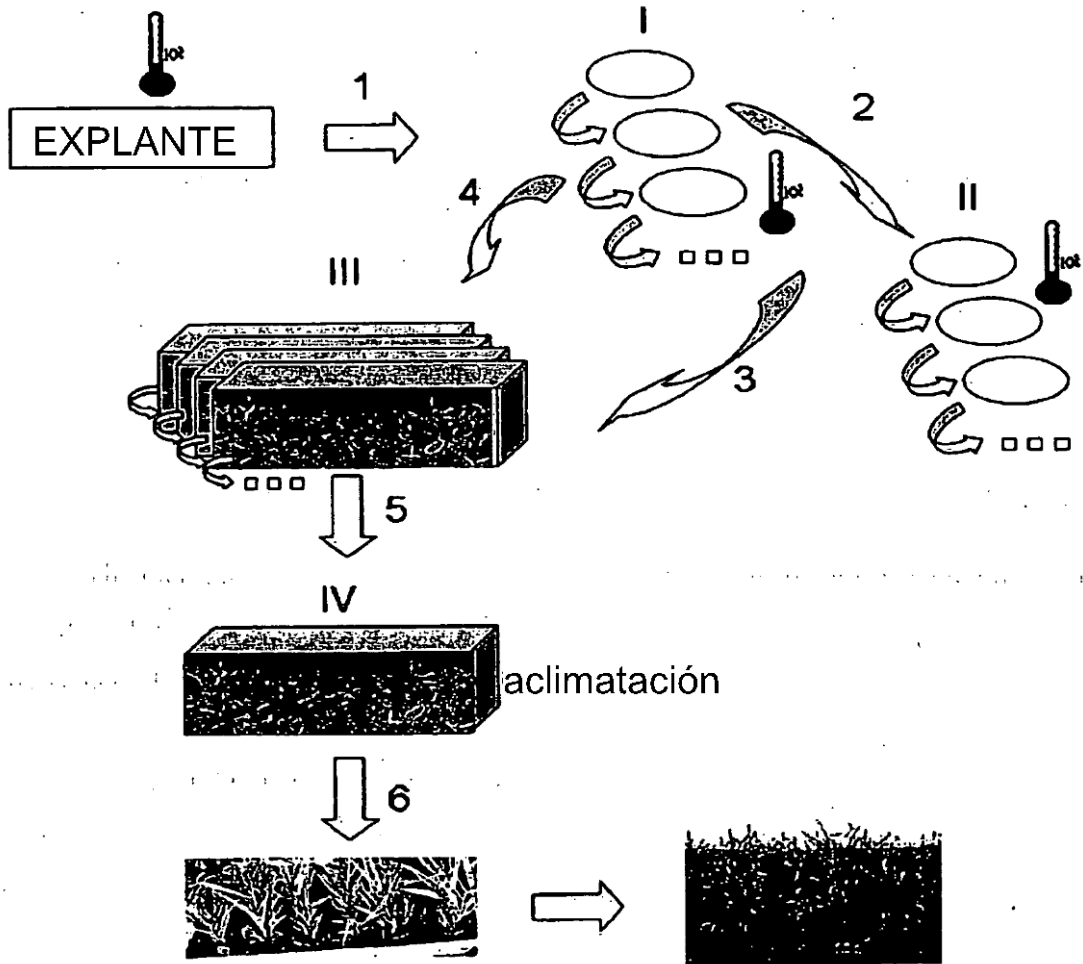


Figura 3

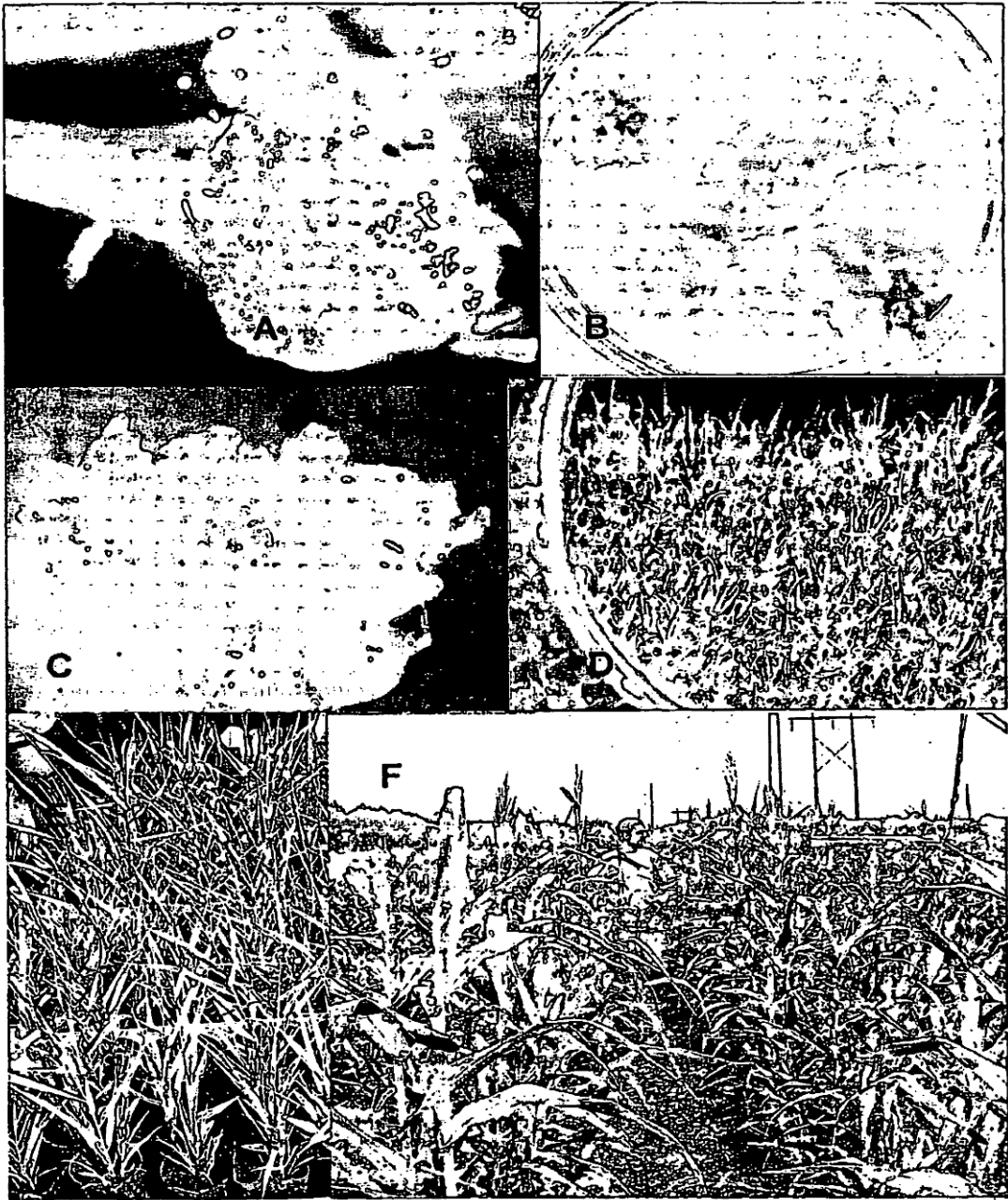


Figura 4



**Figura 5**

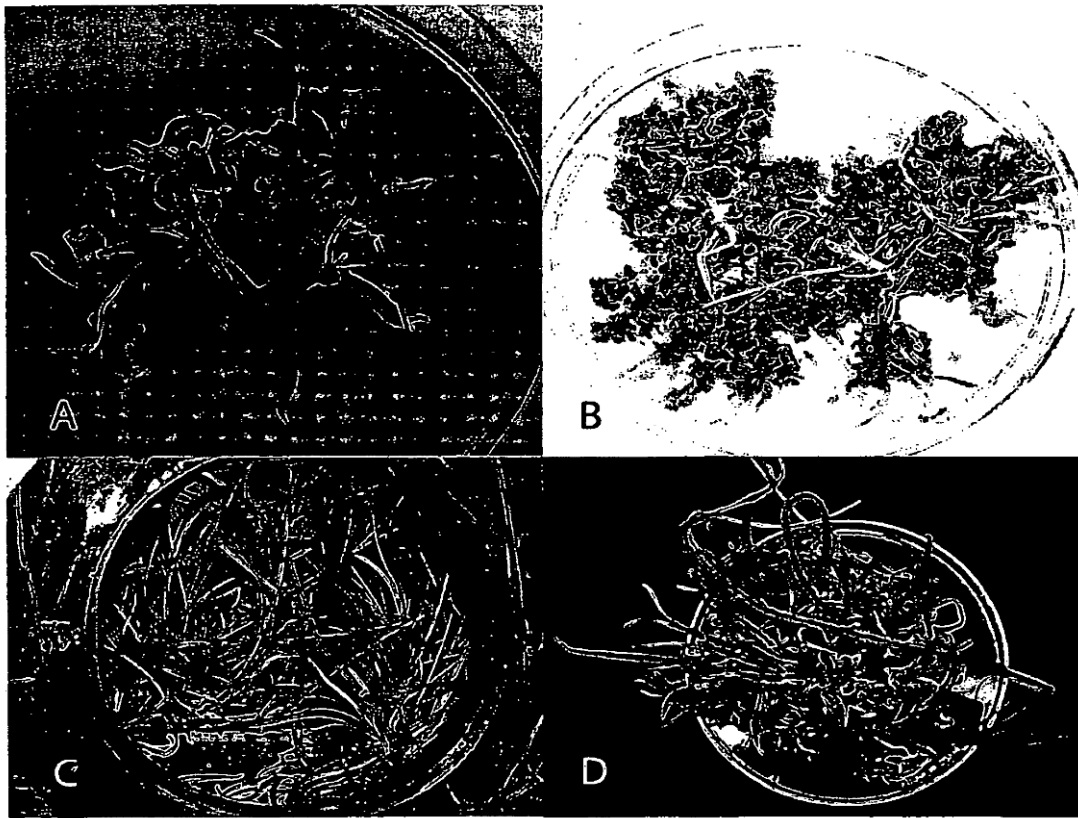
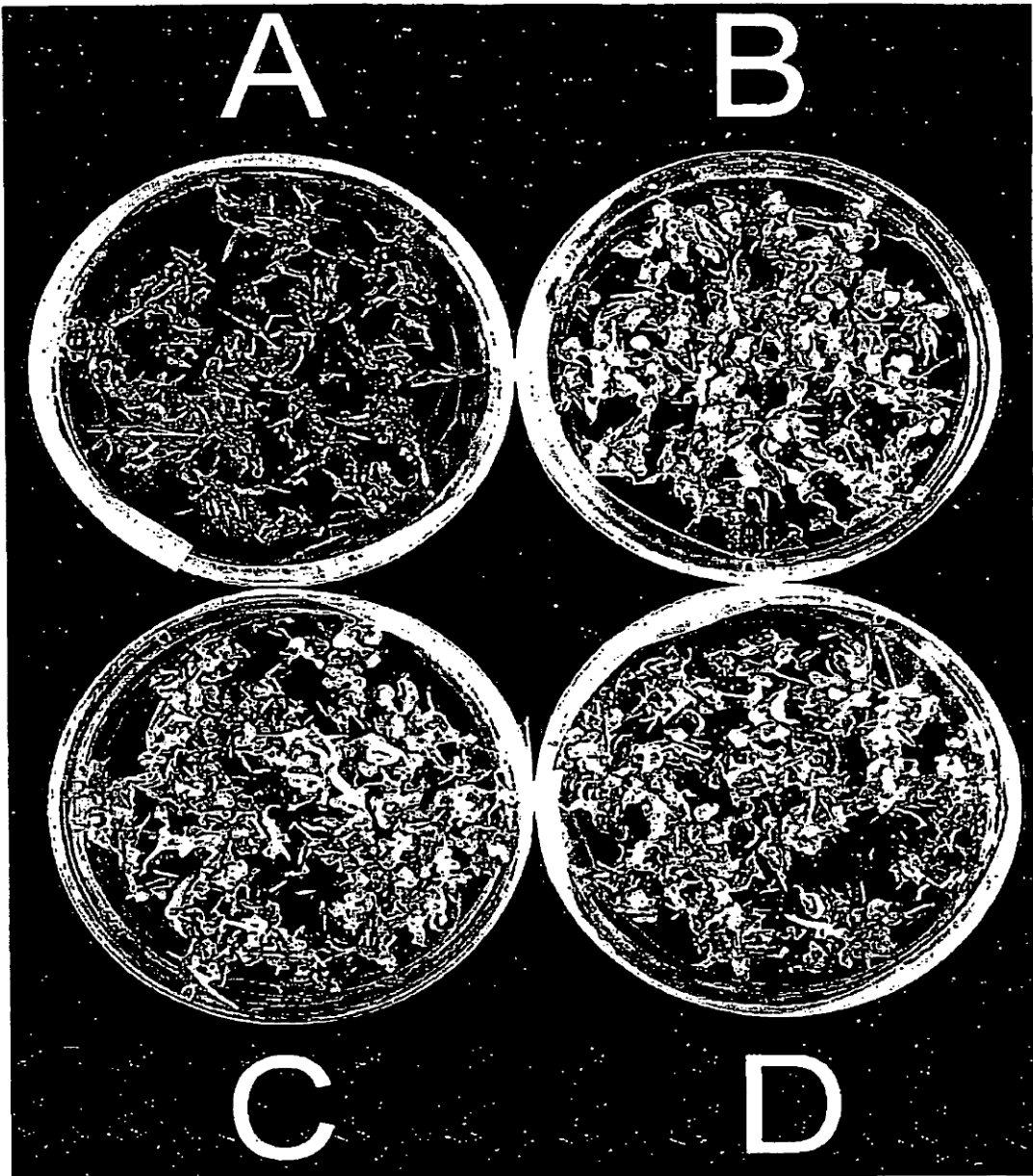
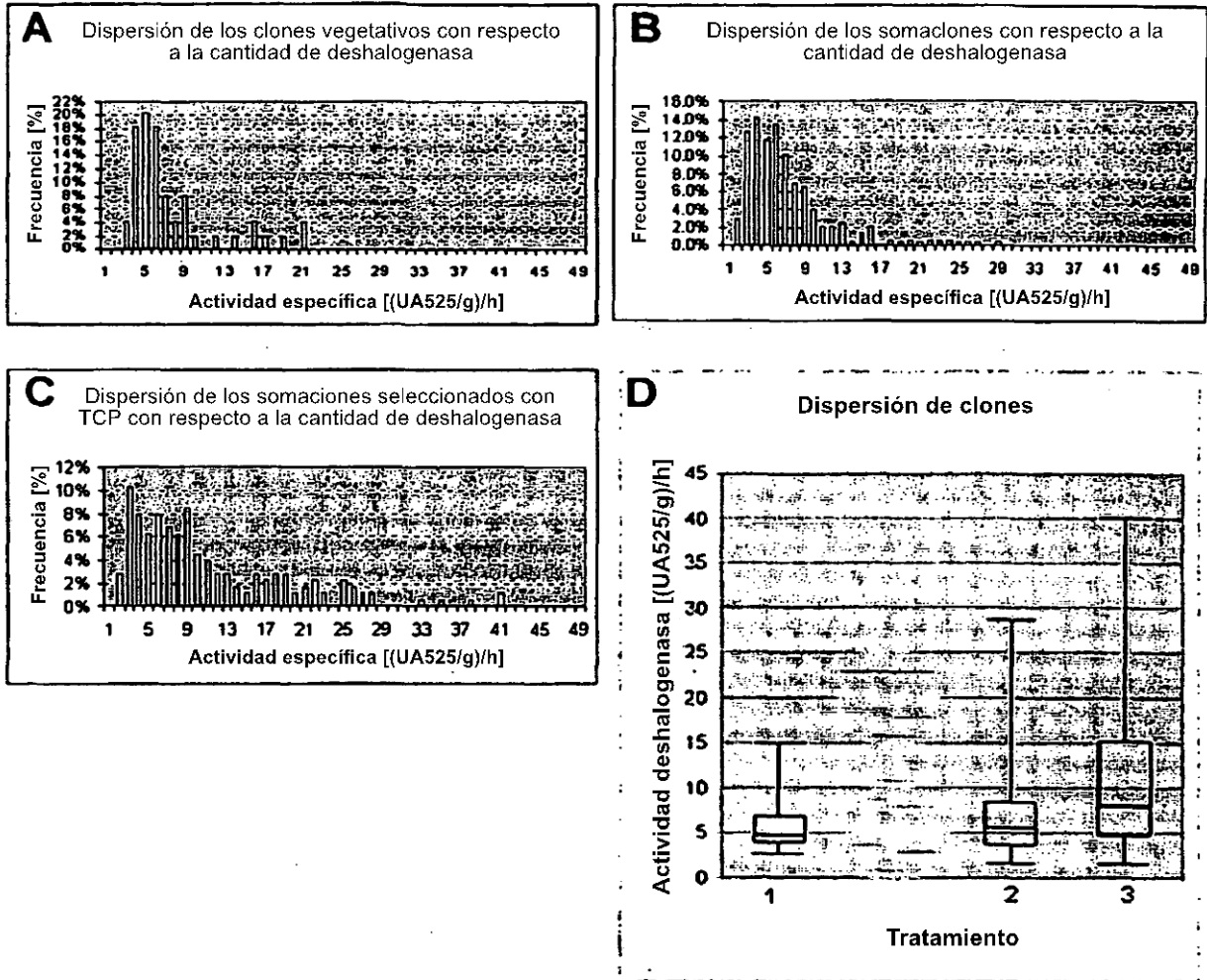


Figura 6



**Figura 7**



**Figura 8**

