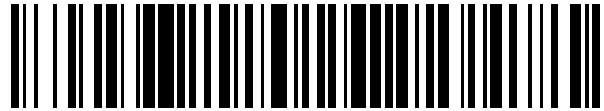


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 485 015**

51 Int. Cl.:

A01H 4/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.06.2009 E 09800627 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.05.2014 EP 2315518**

54 Título: **Embriogénesis somática de *Jatropha curcas* a partir de óvulos**

30 Prioridad:

23.07.2008 US 82896 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

12.08.2014

73 Titular/es:

**JOIL (S) PTE. LTD. (100.0%)
1 Research Link National University of Singapore
Singapore 117604, SG**

72 Inventor/es:

**VASUDEVAN, RAMESH ANBAZHAGAN y
RAMACHANDRAN, SRINIVASAN**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 485 015 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

Embriogénesis somática de *Jatropha curcas* a partir de óvulos

5 Antecedentes de la invención

La presente invención se refiere al campo de la producción de embriones somáticos, en concreto, a métodos para la embriogénesis somática de *Jatropha* a partir de óvulos. Más específicamente, la presente invención se refiere a un método y composiciones de medios para la embriogénesis somática de *Jatropha curcas* a partir de óvulos de botones florales no abiertos. El método es adecuado para la transformación de *Jatropha curcas*, para producir un stock clónico de plantas útil para plantación a gran escala de *Jatropha curcas* y para producir haploides, dobles haploides, diploides y plántulas libres de enfermedades.

Las publicaciones y otros materiales usados en el presente documento para ilustrar los antecedentes de la invención o para proporcionar detalles adicionales respecto de la puesta en práctica, por conveniencia, están agrupados respectivamente en la Bibliografía.

Jatropha curcas, que pertenece a la familia de las Euforbiáceas, es una planta cuyo origen se encuentra en América Latina, ampliamente dispersa por todas las regiones tropicales áridas y semiáridas del mundo. *Jatropha* es un género extenso que comprende más de 170 especies. Las especies más comunes en India son *J. curcas*, *J. gossypifolia*, *J. multifida*, *J. nana*, *J. panduraefolia*, *J. villosa* y *J. podagrica*. *J. curcas* es un árbol pequeño o arbusto con corteza gris suave, que exuda un látex acuoso de color blanquecino cuando se corta. Normalmente, crece hasta una altura de entre tres y cinco metros, pero puede alcanzar una altura de hasta ocho o diez metros en condiciones favorables. Es una planta resistente a las sequías, que vive hasta 50 años y crece en tierras marginales.

J. curcas tiene hojas grandes de color verde a verde pálido, que se alinean alternas sub opuestas. Las hojas son de trí a penta lobuladas con filotaxis en espiral. El peciolo de las flores varía entre 6-23 mm de longitud. Las flores se forman en las estaciones cálidas. Se forman varios cultivos siempre que el suelo sea húmedo, bueno y las temperaturas elevadas. En condiciones donde sucede un crecimiento continuo, un desequilibrio en la producción de flor pistilada o estaminada da como resultado un mayor número de flores hembra. Los frutos se producen en invierno, cuando el arbusto se encuentra sin hojas. Cada inflorescencia produce un ramo de aproximadamente 10 o más frutos ovoides. Se forman tres cocos bivalvos después de que las semillas maduren y el exocarpo carnoso se seca. Las semillas han alcanzado la madurez cuando la cápsula cambia de verde a amarillo, de dos a cuatro meses después de la fertilización. Las semillas negruzcas de cáscara delgada son oblongas y se asemejan a las semillas de la linaza. Esta planta tiene varios usos medicinales, especialmente en productos nutracéuticos, farmacéuticos, dermatológicos y de cuidado personal. El látex de *Jatropha curcas* tiene propiedades anti cancerígenas debido a la presencia de un alcaloide conocido como "jatropina". Los tallos tiernos se usan para lavarse los dientes. El jugo de las hojas se usa aplicado externamente para las hemorroides. Las raíces se usan como antídoto para mordeduras de serpiente. Las semillas se usan con propósitos antihelmínticos. La corteza produce un tinte azul oscuro usado para teñir tejidos, redes y líneas de pesca. La mayor parte de las especies de *Jatropha* son ornamentales a excepción de *J. curcas* y *J. glandulifera* que son especies productoras de aceite. Las semillas de estas especies contienen aceite semi-seco que se ha demostrado útil para propósitos medicinales y veterinarios.

El contenido en aceite es del 25-30 % en las semillas y del 50-60 % en el germen. El aceite contiene un 21 % de ácidos grasos saturados y un 79 % de ácidos grasos insaturados. El aceite de *Jatropha* contiene ácido linoleico (C18:2) y ácido oleico (C18:1) que en conjunto forman hasta un 80 % de la composición del aceite. El ácido palmítico (C16:0) y el ácido esteárico (C18:0) son otros ácidos grasos presentes en este aceite. El aceite no es comestible, sin embargo, tiene el potencial de proporcionar una alternativa prometedor y comercialmente viable al combustible diesel ya que tiene todas las propiedades fisicoquímicas y de rendimiento deseables del combustible diesel. La planta *J. curcas* ha atraído últimamente una atención particular como planta energética tropical. El aceite de la semilla puede usarse como combustible para motores diesel ya que tiene características similares a las del combustible fósil para motores diesel. Además, debido a su naturaleza no tóxica y biodegradable, el biodiesel de *Jatropha* cumple con los estándares europeos de la norma EN 14214 de combustibles puros y mezclados para motores diesel. La semilla de *Jatropha curcas* rinde aproximadamente 6-8 TM/ha con aproximadamente un 37 % de aceite. Dicho rendimiento puede producir el equivalente a 2100-2800 litros de combustible/ha, cuya energía es equivalente a 19.800/26.400 kWh/ha (Gaydou et al., 1982). Debido a su elevado valor de saponificación y su capacidad de arder sin emitir humo, el aceite de las semillas es comercialmente útil. Por ejemplo, se usa extensivamente para producir jabón. Las preocupaciones económicas, medioambientales y de seguridad energética por todo el mundo fuerzan a cambiar de combustibles fósiles a alternativas de biocombustible como el bioetanol y el biodiesel. Ya que los biocombustibles pueden producirse a partir de un amplio conjunto de cultivos, cada país está adoptando una estrategia que explote las ventajas comparativas que se sustentan en determinadas cosechas.

Entre los distintos cultivos de biocombustible, se considera que *Jatropha curcas* es un mejor candidato para la producción de biocombustible debido a sus factores fisiológicos y naturales. El interés intenso en el aceite de *Jatropha curcas* ha generado una enorme presión para proveer de suficientes semillas que sean homogéneas y lo suficientemente productivas para plantación. Por lo tanto, hay una necesidad urgente para propagar en masa

- árboles de élite. Son igualmente urgentes métodos par mejorar varias características agronómicas de *Jatropha curcas*. La ingeniería genética se encuentra reconocida como un método rápido para la mejora de cultivos. La transformación de plantas es esencialmente un proceso en dos etapas, es decir, dispensación de los genes dentro de una célula hospedadora seguido de la regeneración de la célula transformada en una planta. Los callos somáticos embriogénicos o cultivos somáticos embriogénicos en suspensión se consideran como el método de regeneración más eficiente ya que la mayor parte de las células transformadas ya han adquirido el potencial embriogénico que hará que se desarrollen en un embrión somático de manera prácticamente espontánea, un proceso similar a un óvulo fertilizado en un embrión cigótico (Dodeman, et al., 1997).
- Los embriones somáticos son adecuados para transformación vía *Agrobacterium tumefaciens* (Mathews et al., 1992), microinyección (Neuhaus et al., 1987) y bombardeo con partículas (Wilde et al., 1992). Además, los embriones somáticos o los callos embriogénicos somáticos pueden criopreservarse usando nitrógeno líquido sin pérdida de viabilidad. Estos son materiales ideales para el mantenimiento del plasma germinal así como de la embriogenicidad celular.
- Los embriones somáticos son de origen clónico y por tanto la multiplicación usando embriones somáticos puede tener un potencial de tasas elevadamente altas de aumento vegetativo y es por tanto de un interés comercial considerable. La regeneración a través de embriogénesis somática es una opción atractiva para el cultivo de tejidos de plantas. Según se ha informado, los embriones somáticos proporcionan más regenerantes estables que los brotes. Otra ventaja de los sistemas de regeneración usando embriones somáticos es su origen celular único aparente. Esto significa que es improbable que los regenerantes sean de origen quimérico, ya que, si se origina un regenerante de un grupo de células en vez de una única célula, los tejidos de la planta pueden ser quiméricos o inestables y producir plantas fuera de tipo.
- Para mejorar adicionalmente este cultivo, pueden utilizarse técnicas biotecnológicas como cultivos tisulares y transformación. Durante las dos últimas décadas se han documentado varios informes acerca de la regeneración de *Jatropha* usando varios explantes y varias composiciones de medios. Estos informes incluyen la regeneración de plantas a partir del hipocótilo, peciolo y explantes foliares (Sujatha y Mukta, 1996), explantes de epicótilo (Solicitud de Patente de China N° 200610020449.X), discos foliares (Publicación de Solicitud de Patente de India N° 490/MUM/2006), explantes de punta apical y nodal (Publicación de Solicitud de Patente europea N° 1817956; Datta et al., 2007), embriogénesis somática a partir de callos foliares (Jha et al., 2007; Jyoti, S. et al., 2000) y transformación a partir de explantes de disco del cotiledón (Li et al., 2008). Además, regeneración a partir de explante de botón floral de la cebolla (Puddephat, I.J. et al., 1999) y en el clavel (*Dianthus caryophyllus*), óvulos aislados de botones florales inmaduros pseudofertilizados (Sato, S. et al., 2000). Todos los estudios anteriores se encuentran enfocados en la regeneración mediada por callos y tejidos meristemáticos. La producción de plántulas a través de organogénesis o embriogénesis somática a partir de tejidos reproductivos (anteras u óvulos) puede dar lugar a la producción de haploides, dobles haploides o diploides que pueden dar como resultado un carácter homocigótico fiel a su tipo, abriendo camino a un programa de fitomejoramiento.
- Las determinaciones de ploidía se han efectuado tradicionalmente contando los cromosomas ápices radicales teñidos, pero este método es laborioso y a menudo difícil con especies que tienen cromosomas pequeños y elevados niveles de ploidía, y puede dar lugar a un germoplasma mal clasificado (Brummer et al., 1999). Todos los cromosomas se localizan en el núcleo celular de las plantas, lo que permite usar el contenido de ADN nuclear como una estimación del nivel de ploidía. En los últimos años, la citometría de flujo se ha convertido en la técnica preferida para estimar el contenido de ADN nuclear debido a su facilidad, rapidez y precisión (Rayburn et al., 1989; Heslop-Harrison, 1995). Arumuganathan y Earle (1991a) determinaron el contenido de ADN nuclear de más de 100 de las principales plantas de cultivo usando citometría de flujo. Vogel et al. (1999) usaron citometría de flujo para determinar el contenido básico de ADN de los genomas de las Triticeas perennes. La citometría de flujo también se ha usado para determinar la ploidía del pasto varilla (*Panicum virgatum* L.) (Hultquist et al., 1997; Lu et al., 1998), alfalfa (*Medicago sativa* L.) (Brummer et al., 1999) y especies de césped (Arumuganathan et al., 1999). La cantidad de ADN en células de plantas se expresa en picogramos (pg como un valor "C" (Bennet y Smith, 1976). La letra C significa "constante" o la cantidad de ADN en un núcleo o genoma haploide; los valores 2C representan el contenido de ADN de un núcleo somático diploide. Las cantidades de ADN en picogramos pueden convertirse a megapares de bases (Mpb) mediante el factor de conversión de 1 pg = 980 Mpb (Bennet et al., 2000).
- Por lo tanto, todavía hay una necesidad en la técnica para la regeneración de plántulas mediante embriogénesis somática usando tejidos reproductivos (anteras u óvulos). A pesar de estos éxitos comunicados, en esta investigación se comunica por primera vez la regeneración de elevada frecuencia mediante embriogénesis somática a partir de explantes de óvulos aislados a partir de botones florales sin abrir de *Jatropha curcas* que son económicos y permiten la producción de haploides, dobles haploides o diploides y plántulas libres de enfermedades.

Sumario de la invención

- La presente invención se refiere al campo de la producción de embriones somáticos, en particular a métodos para la embriogénesis somática de *Jatropha* a partir de óvulos. Más específicamente, la presente invención se refiere a un método y composiciones de medios para la embriogénesis somática de *Jatropha curcas* a partir de óvulos

procedentes de botones florales sin abrir. El método es adecuado para la transformación de *Jatropha curcas*, para producir stock de plantación clónico útil para la plantación a gran escala de *Jatropha curcas* y para producir haploides, dobles haploides, diploides y plántulas libres de enfermedades. El método también permite una elevada eficiencia de transformación de esta planta.

5 Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, se proporciona un método para regenerar *Jatropha* mediante embriogénesis somática que comprende las etapas de: (a) cultivar un explante de *Jatropha* en un primer medio que comprende medio basal MS y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en la oscuridad para inducir la formación de callos embriogénicos, en donde el explante de *Jatropha* es un óvulo diseccionado procedente de un botón floral no
10 abierto; (b) cultivar el callo embriogénico en el primer medio en un fotoperiodo de luz/oscuridad para inducir el desarrollo del embrión somático y la maduración; y (c) cultivar los embriones somáticos maduros en un segundo medio que comprende medio basal MS, ácido indol-3-butírico (IBA) y ácido giberélico (GA₃) en un fotoperiodo de luz/oscuridad para germinar las plántulas. En consecuencia, los explantes se obtienen a partir de plantas madre sanas de *Jatropha curcas*. En un aspecto, el óvulo no está fertilizado. En un aspecto adicional, el explante de óvulo se esteriliza. Los explantes de óvulo se colocan sobre un medio sólido de iniciación de cultivo que comprende medio
15 basal MS (Murashige y Skoog, 1962) y que contiene una auxina para la inducción de callos y la embriogénesis somática.

20 La auxina es ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Los explantes de óvulo se cultivan en el medio de iniciación en la oscuridad para la formación del callo embriogénico. El callo embriogénico se transfiere al medio de iniciación fresco y se cultivan con luz para el desarrollo y maduración de embriones somáticos. Los embriones somáticos maduros se transfieren a un medio sólido de germinación que tiene sales basales de medio MS y que contiene auxina y ácido giberélico (GA₃). La auxina es ácido indol-3-butírico. En una realización, el medio de germinación también contiene una o más citoquininas. En otra realización, el medio de germinación también contiene uno o más
25 aditivos orgánicos. En una realización adicional, el medio de germinación también contiene una o más citoquininas y uno o más aditivos orgánicos. En una realización, la citoquinina es quinetina (KN), 6-bencilaminopurina (BA), derivados de urea con actividad de citoquinina (como tidiazurón (TDZ)) o mezclas de los mismos. En una realización, el aditivo orgánico es hidrolizado de caseína (CH), sulfato de adenina (AdSO₄) o mezclas de los mismos. Los embriones somáticos maduros se cultivan en el medio de germinación con luz. Las plántulas germinadas se endurecen y transfieren a un invernadero.
30

El método de la presente invención comprende un sistema completo y eficiente que puede usarse para la regeneración de plantas del género de *Jatropha*, más específicamente, en la especie de *Jatropha curcas* y sus híbridos artificiales. Se han producido numerosos embriones somáticos mediante este sistema y los regenerantes han demostrado ser completamente normales en cuanto a desarrollo vegetativo y reproducción sexual.
35

Como se muestra en el presente documento, las plántulas producidas a partir de óvulos no fertilizados mediante el método de embriogénesis somática son haploides. Las plantas diploides, por ejemplo, plantas dobles haploides, se producen tratando los callos embriogénicos con un inhibidor mitótico, como colchicina u orizalina.
40

Breve descripción de las figuras

Las Figuras 1A-1F muestran la embriogénesis somática a partir de óvulos de *Jatropha curcas* L. Fig. 1A: Iniciación de callos a partir de óvulos después de 20 días. Fig. 1B: Iniciación de callos embriogénicos a partir de óvulos
45 después de 40 días. Fig. 1C: Formación de embriones somáticos a partir de callos ovulares. Fig. 1D: desarrollo de distintas etapas de embriones somáticos (estado globular, en forma de corazón, de torpedo y cotiledonario) a partir de callos ovulares después de 75 días. Fig. 1 E y Fig. 1F: Desarrollo de embriones somáticos secundarios a partir de embriones somáticos primarios después de 90 días (tor: embriones somáticos en forma de torpedo; glo: embriones somáticos globulares).
50

Las Figuras 2A-2F muestran diferentes estados de embriones somáticos a partir de óvulos de *Jatropha curcas* L. Fig. 2A: Iniciación de callos embriogénicos a partir de óvulos. Fig. 2B: Embrión en estado globular (glo) y embrión en forma de corazón (h). Fig. 2C: Embrión en forma de torpedo (tor). Fig. 2D y Fig. 2E: Embriones somáticos en forma de cotiledón (cot) (estado temprano y tardío). Fig. 2F: Embriones somáticos germinados (r: raíz).
55

Las Figuras 3A-3C muestran el análisis de la ploidía en una planta regenerada de acuerdo con la presente invención. Fig. 3A: Planta producida en el presente documento. Fig. 3B: El contenido de ADN de una planta control diploide determinado por citometría de flujo muestra 2C. Fig. 3C: El contenido de ADN de la planta de la Fig. 3A determinado mediante citometría de flujo muestra 1C indicando que la planta es haploide.
60

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere al campo de la producción somática de embriones, en particular, a métodos para la embriogénesis somática de *Jatropha* a partir de óvulos. Más específicamente, la presente invención se refiere a un
65 método y composiciones de medios para la embriogénesis somática de *Jatropha curcas* a partir de óvulos de botones florales sin abrir. El método es adecuado para la transformación de *Jatropha curcas*, para producir un stock

de plantación clónico útil para plantación a gran escala de *Jatropha curcas* y para producir haploides, dobles haploides, diploides y plántulas libres de enfermedades. El método también permite una transformación elevadamente eficiente de esta planta.

- 5 La propagación mediante embriogénesis somática se refiere a métodos mediante los cuales se producen embriones *in vitro* a partir de pequeños trozos de tejido de planta o células individuales. Los embriones se llaman somáticos ya que se derivan del tejido somático (vegetativo), en vez de proceder del proceso sexual. La propagación vegetativa mediante embriogénesis somática tiene la capacidad de capturar toda la ganancia genética de genotipos elevadamente deseables. Además, estos métodos son fácilmente susceptibles de automatización y mecanización.
- 10 Finalmente, la transformación elevadamente eficiente de plantas puede lograrse usando embriogénesis somática en células transformadas regeneradas.

Los embriones somáticos se producen induciendo la formación de embriones somáticos en tejido explantado. De acuerdo con la presente invención, los embriones somáticos se inducen a partir de explantes obtenidos a partir de óvulos de una planta del género *Jatropha*. Los óvulos se obtienen de flores sin abrir. En un aspecto, los óvulos no están fertilizados. Los explantes de óvulos se colocan en un medio sólido citado en el presente documento como medio de iniciación. El medio de iniciación es medio MS y contiene una auxina. La auxina es 2,4-D. En una realización, la concentración de 2,4-D en el medio de iniciación es de aproximadamente 2,26 μM a aproximadamente 9,04 μM , preferentemente de aproximadamente 4,52 μM a aproximadamente 6,78 μM , más preferentemente aproximadamente 6,78 μM . En una realización, el medio de iniciación también contiene una fuente de carbono. En una realización, la fuente de carbono es sacarosa a una concentración de aproximadamente 2 % a aproximadamente 5 %, preferentemente de aproximadamente 2 % a aproximadamente 3 %, más preferentemente aproximadamente 3 %. En otra realización, la fuente de carbono es glucosa a una concentración de aproximadamente 2 % a aproximadamente 5 %, preferentemente de aproximadamente 3 % a aproximadamente 5 %. En una realización adicional, la fuente de carbono es fructosa a una concentración de aproximadamente 2 % a aproximadamente 5 %, preferentemente de aproximadamente 2 % a aproximadamente 3 %. En una realización adicional, la fuente de carbono es maltosa a una concentración de aproximadamente 2 % a aproximadamente 5 %, preferentemente de aproximadamente 2 % a aproximadamente 3 %. En otra realización, la fuente de carbono es una mezcla de sacarosa y glucosa a una concentración de aproximadamente 2 % a aproximadamente 3 %, preferentemente aproximadamente 2 % de sacarosa y de aproximadamente 2 % a aproximadamente 3 %, preferentemente aproximadamente un 2 % de glucosa. En una realización adicional, la fuente de carbono es una mezcla de fructosa y glucosa a una concentración de aproximadamente 1 % a aproximadamente 2 %, preferentemente 1 % de fructosa y de aproximadamente 2 % a aproximadamente 3 %, preferentemente aproximadamente un 2 % de glucosa. En una realización adicional, la fuente de carbono es una mezcla de maltosa y glucosa a una concentración de aproximadamente 1 % a aproximadamente 2 %, preferentemente aproximadamente 1 % de maltosa y de aproximadamente 2 % a aproximadamente un 3 %, preferentemente aproximadamente un 2 % de glucosa.

En una realización, los explantes de óvulos se cultivan en el medio de iniciación durante un tiempo de aproximadamente 30 días a aproximadamente 60 días, preferentemente durante aproximadamente 40 días. El cultivo se mantiene a aproximadamente $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ en la oscuridad con una humedad relativa del 55 % al 60 %. Cultivar los explantes de óvulos en el medio de iniciación induce la formación de callos embriogénicos.

Después de cultivar en el medio de iniciación en la oscuridad para inducir la formación de callos embriogénicos, el tejido de callo embriogénico se coloca en medio fresco de iniciación para el desarrollo y maduración de embriones somáticos. En una realización, el tejido de callo embriogénico se cultiva en medio de iniciación durante un tiempo de aproximadamente cuatro a aproximadamente seis semanas, preferentemente cuatro semanas. En una realización adicional, el tejido de callo embriogénico con embriones somáticos en desarrollo y en maduración se subcultiva a intervalos de dos semanas. El cultivo de tejido de callo embriogénico para desarrollar y madurar embriones somáticos se mantiene a aproximadamente $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ con un fotoperiodo de 16h/8h (luz/oscuridad) a una humedad relativa aproximadamente del 55 % al 60 %. El fotoperiodo de luz se produce bajo luces fluorescentes con una intensidad de luz de $25\text{ }\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Después de cultivar para producir embriones somáticos maduros, los embriones somáticos se colocan sobre un medio sólido citado en el presente documento como medio de germinación. Los embriones somáticos maduros son embriones somáticos en forma de cotiledón. De acuerdo con la presente invención, el medio de germinación es medio MS y contiene una auxina y GA_3 . La auxina es IBA. En una realización, la concentración de IBA en el medio de germinación es de aproximadamente 1,23 μM a aproximadamente 4,92 μM , preferentemente de aproximadamente 1,84 μM a aproximadamente 2,46 μM , más preferentemente aproximadamente 2,46 μM . En una realización, la concentración de GA_3 en el medio de germinación es de aproximadamente 0,72 μM a aproximadamente 5,76 μM , preferentemente de aproximadamente 1,44 μM a aproximadamente 2,88 μM , más preferentemente aproximadamente 2,88 μM . En una realización, el medio de germinación contiene además una o más citoquininas. En una realización, la citoquinina es KN, BA, derivados de la urea con actividad de citoquinina (como TDZ) o mezclas de los mismos. En una realización, la concentración de KN es de aproximadamente 1,16 μM a aproximadamente 9,28 μM , preferentemente de aproximadamente 2,32 μM a aproximadamente 4,64 μM , más

preferentemente aproximadamente 4,64 μM . En otra realización, la concentración de BA es de aproximadamente 1,10 μM a aproximadamente 8,86 μM , preferentemente de aproximadamente 2,21 μM a aproximadamente 4,43 μM , más preferentemente aproximadamente 4,43 μM . En una realización adicional, la concentración de TDZ es de aproximadamente 1,13 μM a aproximadamente 9,08 μM , preferentemente de aproximadamente 2,27 μM a aproximadamente 4,54 μM , más preferentemente aproximadamente 4,54 μM . En una realización adicional, la citoquinina es una mezcla de KN y BA en cantidades de aproximadamente 1,16 μM a aproximadamente 4,64 μM , preferentemente de aproximadamente 1,16 μM a aproximadamente 2,32 μM , más preferentemente 2,32 μM de KN y de aproximadamente 1,10 μM a aproximadamente 4,43 μM , preferentemente de 1,10 μM a aproximadamente 2,21 μM , más preferentemente aproximadamente 2,21 μM de BA. En otra realización, la citoquinina es una mezcla de BA y TDZ en cantidades de aproximadamente 1,10 μM a aproximadamente 4,43 μM , preferentemente de aproximadamente 1,10 μM a aproximadamente 2,21 μM , más preferentemente aproximadamente 2,21 μM de BA y de aproximadamente 1,13 μM a aproximadamente 4,54 μM , preferentemente de aproximadamente 1,13 μM a aproximadamente 2,27 μM , más preferentemente aproximadamente 2,27 μM de TDZ. En una realización adicional, la citoquinina es una mezcla de KN y TDZ en cantidades de aproximadamente 1,16 μM a aproximadamente 4,64 μM , preferentemente de aproximadamente 1,16 μM a aproximadamente 2,32 μM , más preferentemente aproximadamente 2,32 μM de KN y de aproximadamente de 1,13 μM a aproximadamente 4,54 μM , preferentemente de aproximadamente 1,13 μM a aproximadamente 2,27 μM , más preferentemente aproximadamente 2,27 μM de TDZ. En otra realización, el medio de germinación además contiene uno o más aditivos orgánicos. En una realización, el aditivo orgánico es CH, AdSO_4 o mezclas de los mismos. En una realización, el medio de germinación se suplementa con aproximadamente de 0,25 g a aproximadamente 1,5 g, preferentemente de aproximadamente 0,5 g a aproximadamente 1,0 g, más preferentemente aproximadamente 1,0 g de CH. En una realización, el medio de germinación se suplementa con aproximadamente de 25 mg a aproximadamente 200 mg, preferentemente de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 100 mg, más preferentemente aproximadamente 100 mg de AdSO_4 . En una realización adicional, el medio de germinación se suplementa con una o más citoquininas y uno o más aditivos orgánicos. El medio de germinación también contiene una fuente de carbono. La fuente de carbono en el medio de germinación puede ser la misma que en el medio de iniciación. En una realización preferente, la fuente de carbono es sacarosa a una concentración de aproximadamente 2 % a aproximadamente 5 %, preferentemente de aproximadamente 2 % a aproximadamente 3 %, más preferentemente, aproximadamente un 3 %.

En una realización, los embriones somáticos maduros se cultivan en el medio de germinación durante un tiempo de aproximadamente una semana a aproximadamente 3 semanas, preferentemente aproximadamente dos semanas. En una realización, los embriones somáticos maduros se subcultivan a intervalos de dos semanas. En una realización, el cultivo de embriones somáticos maduros se mantiene a aproximadamente $25\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ con un fotoperiodo de 16h/8h (luz oscuridad) con una humedad relativa del 55 % al 60 %. En una realización, el fotoperiodo de luz se produce bajo luces blancas fluorescentes con una intensidad de luz de aproximadamente $25\text{ }\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Los embriones somáticos germinados, es decir, plántulas, se endurecen. En una realización, las plántulas son endurecidas sobre suelo, arena, musgo, carbón (1:1:2:0,5 v/v/v/v) u otro suelo Houghland solo o en una combinación de proporciones definidas de suelo Houghland y arena (2:1 v/v).

La plántula producida a partir de óvulos no fertilizados mediante el método de embriogénesis somática descrito en el presente documento produce una planta haploide según se demuestra mediante análisis de contenido de ADN mediante citometría de flujo.

Las plantas dobles haploides se producen tratando los callos embriogénicos con un inhibidor mitótico. En una realización, el callo embriogénico se trata con el inhibidor mitótico durante de uno a tres días, preferentemente tres días. En una realización, el inhibidor mitótico es colchicina. En una realización, el callo embriogénico se trata con de un 0,1 % a un 0,5 %, preferentemente un 0,5 % de colchicina. En otra realización, el inhibidor mitótico es orizalina. En una realización, el callo embriogénico se trata con de un 0,1 % a un 0,5 %, preferentemente un 0,5 % de orizalina. El inhibidor mitótico se añade al medio de inducción de los callos embriogénicos, descrito anteriormente, antes de la transferencia de los callos embriogénicos al medio fresco de iniciación. Las condiciones de cultivo para cultivar en presencia del inhibidor mitótico son las mismas que para la inducción de callos embriogénicos somáticos. A continuación del tratamiento con el inhibidor mitótico, el callo embriogénico tratado se coloca en medio fresco de iniciación para el desarrollo y maduración de embriones somáticos y se cultivan como se describe anteriormente. Los embriones somáticos maduros se colocan sobre el medio de germinación y se cultivan como se describe anteriormente para germinar plántulas dobles haploides como se describe anteriormente.

Además, la presente invención proporciona sistemas que pueden usarse para la transformación de plantas del género *Jatropha*. El método de transformación/transfección no es crítico para la transformación de plantas del género *Jatropha*; varios métodos de transformación o transfección se encuentran disponibles en la actualidad. A medida que estén disponibles nuevos métodos para transformar cultivos u otras células hospedadoras, se podrán aplicar directamente. En consecuencia, una gran variedad de métodos se han desarrollado para insertar una secuencia de ADN en el genoma de una célula hospedadora para obtener la transcripción y/o traducción de la secuencia para efectuar cambios fenotípicos en el organismo. Por lo tanto, puede emplearse cualquier método que proporcione una transformación/transfección efectiva. Véase, por ejemplo, Mathews et al., (1992), Neuhaus et al., (1987), Wilde et al., (1992), Patentes de los Estados Unidos N° 7.241.937, 7.273.966 y 7.291.765 y las Publicaciones

de Solicitud de Patente N° 2007/0231905 y 2008/0010704. Véase también la Publicación de Solicitud Internacional N° WO2005/103271.

5 En un aspecto, el tejido explantado puede co-cultivarse con una cepa de *Agrobacterium* que porte una construcción de ADN que contenga un gen o ácido nucleico de interés usando técnicas bien conocidas en la técnica. El tejido transformado puede seleccionarse usando técnicas convencionales bien conocidas en la técnica. En otro aspecto, los cultivos embriogénicos líquidos en suspensión pueden co-cultivarse con una cepa de *Agrobacterium* que porten una construcción de ADN que contenga un gen o ácido nucleico de interés usando técnicas bien conocidas en la técnica. El tejido transformado puede seleccionarse usando técnicas convencionales bien conocidas en la técnica.

10 En un aspecto adicional, el ADN puede introducirse en el tejido explantado o células del cultivo líquido embriogénico en suspensión usando técnicas convencionales, como bombardeo con partículas. El tejido transformado puede seleccionarse usando técnicas convencionales bien conocidas en la técnica. Las plantas transformadas o transgénicas pueden regenerarse usando los métodos descritos en el presente documento.

15 De manera similar, el ADN que se inserta (el ADN de interés) en las plantas del género *Jatropha* no es crítico para el proceso de transformación. Generalmente, el ADN que se introduce dentro de la planta es parte de una construcción. El ADN puede ser un gen de interés, por ejemplo, una secuencia codificante para una proteína, o puede ser una secuencia que sea capaz de regular la expresión de un gen, como una secuencia sin sentido, una secuencia de supresión de sentido o una secuencia de ARNm. La construcción incluye típicamente regiones reguladoras unidas operativamente al extremo 5' del ADN de interés y/o al extremo 3' del ADN de interés. Un casete que contiene todos estos elementos también se cita en el presente documento como un casete de expresión. Los casetes de expresión pueden contener adicionalmente secuencias líder 5' en la construcción del casete de expresión. Las regiones reguladoras (es decir, promotores, regiones reguladoras transcripcionales, y regiones de terminación traduccional) y/o el polinucleótido que codifica un ancla de señal puede ser nativo/análogo a la célula hospedadora o entre sí. Como alternativa, las regiones reguladoras y/o el polinucleótido que codifica un ancla de señal puede ser heterólogo a la célula hospedadora o entre sí. Véase, la Patente de los Estados Unidos N° 7.205.453 y las Publicaciones de Solicitud de Patente de los Estados Unidos N° 2006/0218670 y 2006/0248616. El casete de expresión puede contener adicionalmente genes de marcador de selección. Véase la Patente de los Estados Unidos N° 7.205.453 y las Publicaciones de Solicitud de Patente de los Estados Unidos N° 2006/0218670 y 2006/0248616.

Generalmente, el casete de expresión comprenderá un gen marcador de selección para la selección de las células transformadas. Los genes marcadores de selección se utilizan para la selección de células transformadas o tejidos. Normalmente, el gen marcador de selección de la planta codificará una resistencia a antibióticos, incluyendo los genes adecuados al menos un conjunto de genes que codifiquen resistencia al antibiótico espectinomina, el gen estreptomycin fosfotransferasa (spt) que codifica la resistencia a la estreptomina, el gen neomicin fosfotransferasa (nptII) que codifica la resistencia a kanamicina o gentamicina, el gen higromicín fosfotransferasa (hpt o aphIV) que codifica la resistencia a higromicina y los genes de acetolactato sintasa (als). Como alternativa, el gen de marcador de selección de la planta codificará resistencia a herbicidas como resistencia a los herbicidas del tipo sulfonilurea, glufosinato, glifosato, amonio, bromoxinil, imidazolinonas y 2,4-diclorofenoxiacetato (2,4-D), incluyendo genes que codifican resistencia a herbicidas que actúan para inhibir la acción de la glutamina sintasa como fosfinotricina o basta (por ejemplo, el gen bar). Véase de manera general el documento WO 0236782, la Patente de los Estados Unidos N° 7.205.453 y las Publicaciones de Solicitud de Patente de los Estados Unidos N° 2006/0248616 y 2007/0143880, y aquellas referencias citadas en el presente documento. Esta lista de genes marcadores de selección no pretende ser limitativa. Cualquier gen marcador de selección puede usarse.

Se pueden usar una variedad de promotores en la práctica de la invención. Los promotores pueden seleccionarse basándose en el resultado deseado. Esto es, los ácidos nucleicos pueden combinarse con promotores constitutivos, preferentes de tejido u otros para la expresión en la célula hospedadora de interés. Dichos promotores constitutivos incluyen, por ejemplo, el promotor central de Rsyn7 (documento WO 99/48338 y Patente de los Estados Unidos N° 6.072.050); el promotor central CaMV^{35S} (Odell et al., 1985); actina de arroz (McElroy et al., 1990); ubiquitina (Christensen and Quail, 1989; Christensen et al., 1992); pEMU (Last et al., 1991); MAS (Velten et al., 1984); promotor ALS (Patente de los Estados Unidos N° 5.659.026), y similares. Otros promotores constitutivos incluyen, por ejemplo, los divulgados en las Patentes de los Estados Unidos N° 5.608.149, 5.608.144, 5.604.121, 5.569.597, 5.466.785, 5.399.680, 5.268.463 y 5.608.142.

Otros promotores incluyen promotores inducibles, en concreto de un promotor inducible por patógenos. Dichos promotores incluyen aquellos de las proteínas relacionadas con patogénesis (proteínas PR), que se inducen después de la infección por un patógeno; por ejemplo, proteínas PR, proteínas SAR, beta-1,3-glucanasa, quitinasa, etc. Otros promotores incluyen aquellos que se expresan de manera local en o cerca del sitio de la infección por el patógeno. En realizaciones adicionales, el promotor puede ser un promotor inducible por heridas. En otras realizaciones, los promotores regulados por agentes químicos pueden usarse para modular la expresión de un gen en una planta mediante la aplicación de un regulador químico exógeno. El promotor puede ser un promotor inducible por agentes químicos, donde la aplicación del químico induce la expresión del gen, o un promotor que se reprime por agentes químicos, donde la aplicación del químico reprime la expresión génica. Además, los promotores preferidos de tejido pueden usarse para dirigir la expresión potenciada de un polinucleótido de interés dentro de un

tejido de planta concreto. Cada uno de estos promotores se describen en las Patentes de los Estados Unidos N° 6.506.962, 6.575.814, 6.972.349 y 7.301.069 y en las Publicaciones de Solicitud de Patente de los Estados Unidos N° 2007/006917 y 2007/0143880.

5 En los casos donde sea apropiado, el ADN de interés puede optimizarse para incrementar la expresión en la planta transformada. Esto es, las secuencias codificantes pueden sintetizarse usando codones preferidos de planta para mejorar la expresión. Hay disponibles métodos en la técnica para sintetizar genes preferidos de plantas. Véase, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos N° 5.380.831, 5.436.391, y 7.205.453 y las Publicaciones de Solicitud de Patente de los Estados Unidos N° 2006/0218670 y 2006/0248616.

10 La práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de química, biología molecular, microbiología, ADN recombinante, genética, inmunología, biología celular, cultivo celular y biología de transgénicos, que se encuentran dentro de las habilidades de la técnica. Véase, por ejemplo, Maniatis et al., 1982, Molecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York); Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, 2ª edición. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York); Sambrook y Russel, 2001, Molecular Cloning 3ª edición (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York); Ausubel et al., 1992, Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, incluyendo actualizaciones periódicas); Glover, 1985, DNA Cloning (IRL Press, Oxford); Russel, 1984, Molecular biology of plants: a laboratory course manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York); Anand, Techniques for the Analysis of Complex Genomes (Academic Press, Nueva York, 1992); Guthrie y Fink, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology (Academic Press, Nueva York, 1991); Harlow y Lane, 1988, Antibodies (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York); Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Transcription and Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Culture of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); el tratado, Methods in Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Methods in Enzymology, Vols. 154 y 155 (Wu et al. eds.), Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology (Mayer y Walker eds., Academic Press, Londres, 1987); Handbook of Experimental Immunology, Volúmenes I-IV (D.M. Weir y C. C. Blackwell eds., 1986); Riott, Essential Immunology, 6ª Edición, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988; Fire et al., RNA Interference Technology: From Basic Science to Drug Development, Cambridge University Press, Cambridge, 2005; Schepers, RNA Interference in Practice, Wiley-VCH, 2005; Engelke, RNA interference (RNAi): The Nuts & Bolts of siRNA Technology, DNA Press, 2003; Gott, RNA Interference, Edición y modificación: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology), Human Press, Totowa, NJ, 2004; Sohail, Gene Silencing by RNA Interference; Technology and Application, CRC, 2004.

35 Ejemplos

La presente invención se describe en referencia a los siguientes Ejemplos, que se ofrecen a modo ilustrativo y no pretenden limitar la invención en modo alguno. Se utilizan técnicas estándar bien conocidas en la técnica, o las técnicas descritas específicamente a continuación.

40 EJEMPLO 1

Preparación de la planta madre

45 En determinadas realizaciones, la planta de la cual se recogen los explantes es sometida a una evaluación para identificar especímenes sanos y/o tratamiento tanto para mantener un estado libre de enfermedad o para tratar una enfermedad existente. La salud puede determinarse evaluando las plantas en cuanto a su tamaño, peso, crecimiento general, apariencia y ausencia de infección o contaminación. Las plantas de *J. curcas* se encuentran normalmente infectadas con "ojo de rana" (*Cercospora Spp.*), insectos del orden *Heteroptera* y el escarabajo pulga dorado (especies Podagarica). La descontaminación puede efectuarse rociando las plantas con agentes como fungicidas, insecticidas, pesticidas o similares. Los fungicidas preferidos para el pretratamiento de la planta madre incluyen Bavistin™, Captan™, Dithane o combinaciones de los mismos a una concentración de aproximadamente 0,05 % a 0,2 %. Los insecticidas preferidos para el pretratamiento de la planta madre incluyen, pero sin limitación, Rogor™, Nuvacron, Fastac™, Ultracid™ 40-WP, Thiodane™ a una concentración de aproximadamente 0,005 % a 0,02 %.

55 EJEMPLO 2

Esterilización de los botones florales sin abrir

60 Los botones florales sin abrir de *Jatropha curcas* L. se recogieron de las plantas madre en el invernadero de Temasek Lifesciences Laboratory, 1 Research Link, Universidad Nacional de Singapur, Singapur 117604 (amablemente proporcionadas por el Dr. Hong Yon). Los botones florales se lavaron en un lavado quirúrgico con clorhexidina (dos gotas en 100 ml de agua esterilizada) durante veinte minutos y posteriormente estos botones florales adicionalmente se esterilizaron superficialmente en solución clorox al 10 % (lejía comercial) durante quince minutos seguidos de cinco lavados con agua estéril. Para asegurar la completa esterilidad, estos botones se enjuagaron de nuevo con alcohol al 70 % durante 3 minutos y a continuación se lavaron con agua estéril tres veces

antes de la disección para aislar los óvulos como explantes.

EJEMPLO 3

5 Medios y hormonas

El medio de iniciación fue medio basal MS (sales minerales MS y vitaminas) suplementado con sacarosa (3 %) como fuente de carbono e incluía fitoagar (0,8 %) como agente gelificante. El pH del medio era de 5,8. El medio de germinación era medio basal MS suplementado con sacarosa (3 %) como fuente de carbono e incluía fitogel (0,25 %) como agente gelificante. El pH del medio era 5,8. Se dispensó el medio en placas de Petri esterilizadas (tamaño de 90 X 15 mm, plástico policarbonato, Canadá). Los agentes químicos usados para las preparaciones de los medios fueron de grado analítico (Duchefa Biochemie, Haarlem, Países Bajos y Sigma Aldrich, Inc, St Louis, EE.UU.).

15 Se añadieron diferentes hormonas al medio para el desarrollo del método de acuerdo con la presente invención. En general, el medio contenía una concentración reducida de fitohormonas. Las hormonas que se ensayaron en los medios fueron fitohormonas que afectarían al crecimiento de la forma deseada durante los distintos estados del cultivo tisular. Los ejemplos de fitohormonas que se ensayaron incluyen auxina natural o sintética (2,4-D, ácido indol-3-acético (IAA), IBA), citoquinina (BA, KN), GA₃, o derivados de la urea con actividad de citoquinina (como TDZ). Las hormonas se ensayaron de manera independiente o en combinación. Para la inducción del callo embriogénico, solo fue efectiva 2,4-D (2,26, 4,52, 6,78 y 9,02 μM). Otras auxinas IAA (0,71, 1,42, 2,85, 5,70 μM), IBA (0,615, 1,23, 2,46, 4,92 μM) y combinación de 2,4-D (2,26, 4,52, 6,78 y 9,02 μM) o IAA (0,71, 1,42, 2,85, 5,70 μM) o IBA (0,615, 1,23, 2,46, 4,92 μM) con citoquininas, BA (1,10, 2,20, 4,43 μM), KN (1,16, 2,32, 4,64 μM) y TDZ (1,13, 2,27, 4,54 μM) de manera individual y en combinaciones indujeron únicamente callos no embriogénicos.

25 Para la germinación de los embriones somáticos, la combinación de IBA (1,23, 1,84, 2,46, 4,92 μM) y GA₃ (0,72, 1,44, 2,88, 5,76 μM) fue efectiva. IAA (1,42, 2,85, 5,7, 8,56 μM) y NAA (1,34, 2,68, 5,37, 8,04 μM) en combinación con GA₃ (0,72, 1,44, 2,88, 5,76 μM) se ensayaron pero no fueron efectivas. La adición de citoquininas (1,16, 2,32, 4,64, 9,28 μM de KN; 1,10, 2,21, 4,43, 8,86 μM de BA; 1,13, 2,27, 4,54, 9,08 μM de TDZ; 1,16, 2,32, 4,64 μM de KN y 1,10, 2,21, 4,43 μM de BA; 1,10, 2,21, 4,43 μM de BA y 1,13, 2,27, 4,54 μM de TDZ; 1,16, 2,32, 4,64 μM de KN y 1,13, 2,27, 4,54 μM de TDZ)) y/o aditivos orgánicos (0,25 g, 0,5 g, 1,0 g de CH; 25 mg, 50 mg, 100 mg, 200 mg de AdSO₄; o combinaciones de los mismos) potenciaron el crecimiento de plántulas germinadas.

EJEMPLO 4

35 Aislamiento y cultivo de explantes de óvulos

Los botones florales esterilizados se diseccionaron usando un microscopio estereoscópico y los óvulos se aislaron e hirieron usando una aguja de disección. Los explantes de óvulo heridos se inocularon en medio de iniciación suplementado con distintas fitohormonas y se incubaron en la oscuridad durante 40 días. Los callos inducidos a partir de estos óvulos se transfirieron al medio de iniciación fresco y se cultivaron con luz (fotoperiodo de 16/8h (luz/oscuridad), con una intensidad de luz de 25 μE m⁻²s⁻¹) para el desarrollo y maduración del embrión somático. Los callos con embriones somáticos en desarrollo y maduración se subcultivaron cada dos semanas. Los embriones somáticos maduros en forma de cotiledón que se desarrollaron a partir de estos callos embriogénicos se transfirieron a un medio de germinación para la germinación. Los embriones somáticos en germinación se subcultivaron cada dos semanas. Las plántulas germinadas se endurecieron y transfirieron al invernadero. Todos los cultivos se mantuvieron a 25 °C ± 2 °C con una humedad relativa del 55 % - 60 %. Se desarrollaron aproximadamente 12 - 15 embriones en forma de cotiledón maduros por cada 100 mg de callo embriogénico, y el 95 % de los embriones somáticos se desarrollaron.

EJEMPLO 5

Embriogénesis somática de *Jatropha curcas*

55 Se considera que *Jatropha curcas* es un mejor candidato para la producción de biocombustibles debido a su elevado contenido en aceites y últimamente ha atraído una atención especial como planta energética tropical. Debido a estos factores fisiológicos de poseer un elevado contenido en aceite, es importante mejorar su producción de biomasa. Por este motivo, pueden utilizarse técnicas biotecnológicas como cultivo tisular y transformación. Aunque hay informes acerca de regeneración de callos y tejido meristemático (Sujatha y Mukta, 1996; Solicitud de Patente de China N° 200610020449; Publicación de Solicitud de Patente de India N° 490/MUM/2006; Publicación de Solicitud de Patente europea N° 1817956; Datta et al., 2007) y embriogénesis somática a partir de callos foliares (Jha et al., 2007), no ha habido informes acerca de regeneración mediante embriogénesis somática usando órganos reproductivos, en concreto óvulos no fertilizados como explantes en *J. curcas*. En el presente estudio se ha estandarizado la regeneración mediante embriogénesis somática usando óvulos no fertilizados de *J. curcas*.

65

La inducción de callos sucedió en medio MS que contenía distintas auxinas y citoquininas tanto de manera individual como en combinaciones. Entre los distintos tipos de medio, el medio MS que contenía 2,4-D fue efectivo en la inducción de callos embriogénicos (Figuras 1A, 1B y Figura 2A mostrada usando 6,78 μM de 2,4-D) y desarrollo de embriones somáticos (en forma globular, de corazón, de torpedo y de cotiledón) (Figuras 1C y 1D, Figuras 2A-2E).

5 El uso de otras fitohormonas no dio como resultado la inducción de callos embriogénicos. El cultivo continuo de embriones somáticos en medio MS que contenía 2,4-D dio como resultado una formación de embriones somáticos anormales sin germinación.

10 Cabe destacar que la luz jugó un papel crucial en la inducción de los callos embriogénicos. El cultivo de óvulos en medio MS suplementado con 2,4-D en condiciones de oscuridad indujo el callo embriogénico. Sin embargo, el cultivo de óvulos en medio MS suplementado con 2,4-D en presencia de luz no dio como resultado la inducción de callos embriogénicos. De manera similar, los embriones somáticos se desarrollaron únicamente en condiciones con luz y no en condiciones de oscuridad.

15 La germinación de los embriones somáticos sucedió en medio MS suplementado con GA_3 e IBA. La adición de citoquininas (KN, BA, TDZ, KN/BA, KN/TDZ y BA/TDZ) y aditivos orgánicos (CH, AdSO_4 y CH/ AdSO_4) potenció el crecimiento de las plántulas germinadas. También se observó que junto con los embriones somáticos primarios, también aparecieron embriones somáticos secundarios (Figuras 1E y 1F).

20 Por el contrario, Jha et al. (2007) han comunicado que indujeron callos embriogénicos a partir de explantes foliares de *J. curcas* en medio MS suplementado con KN (9,3 μM) y desarrollaron los embriones somáticos en medio MS suplementado con KN (2,3 μM) e IBA (1,0 μM). Jha et al. (2007) también comunicaron que la adición de sulfato de adenina (13,6 μM) estimuló el proceso de desarrollo del embrión somático. En el presente estudio, la adición de AdSO_4 en el medio de inducción de callos dio como resultado la inducción de un callo compacto verdoso que se convierte en no embriogénico. Únicamente fueron vitales para la inducción de callos embriogénicos 2,4-D y condiciones de oscuridad. Unos resultados similares fueron comunicados por Kim et al. (2007) para *Podophyllum peltatum*. Jha et al. (2007) han afirmado que el sistema embriogénico somático en *J. curcas* dura de doce a dieciséis semanas, mientras que en el presente estudio, el sistema embriogénico somático completo puede completarse en menos de doce semanas con una germinación de embriones somáticos del 95 %. Ya que los embriones somáticos se desarrollan a partir de óvulos no fertilizados, este sistema puede usarse para la producción de haploides, dobles haploides o plantas diploides que son útiles en fitomejoramiento y en la creación de plantas transgénicas.

EJEMPLO 6

35 Determinación de la ploidía de plantas regeneradas

El objetivo de este estudio fue determinar el contenido de ADN nuclear de plántulas derivadas de embriones somáticos a partir de botones florales de *Jatropha curcas* L e *in vivo* en plantas adultas cuyo número de cromosomas es $2n=22$.

40 Se usaron los procedimientos descritos por Arumiganathan y Earle (1991b) y Tuna et al. (2001) para determinar el contenido de ADN por núcleo. En resumen, el procedimiento consiste en preparar suspensiones de núcleos intactos cortando tejidos de plantas y lisando los protoplastos en un tampón de MgSO_4 mezclado con estándares de ADN y tiñendo los núcleos con yoduro de propidio (PI) en una solución que contiene ARNasa libre de ADNasa. Se estimaron las intensidades de fluorescencia de los núcleos teñidos comparándolas con las intensidades de fluorescencia de los núcleos de las plantas diploides de *Jatropha curcas in vivo*.

50 Se escindieron aproximadamente 500 mg de tejido verde fresco procedente de brotes derivados de embriones somáticos y se colocaron sobre hielo en una placa de Petri de plástico de 35 X 10 mm. Se añadieron aproximadamente 500 mg de tejidos foliares procedentes de plantas de semillero de *Jatropha* como estándar. El tejido foliar se cortó en segmentos de 0,25-1,0 mm en 1 ml de solución A (24 ml de tampón de MgSO_4 (enfriado sobre hielo); 25 mg de ditiotreitól; 500 μl de stock de yoduro de propidio (5,0 mg de yoduro de propidio en 1,0 ml de agua bidestilada); 635 μl de stock de Triton X-100 (1,0 g de tritón X-100 en 10 ml de agua bidestilada)). El homogenizado se filtró a través de una malla de nylon de 33 μM dentro de un tubo de microcentrífuga y se centrifugó (microcentrífuga VS-15, Shelton Scientific, Shelton, CT) a 13.000 RPM durante 20 s. Se desechó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 400 μl de solución B (7,5 ml de solución A; 17,5 μl de ARNasa (libre de ADNasa)) y se incubó durante 15 minutos a 37 °C antes del análisis por citometría de flujo.

60 El material preparado se analizó en un espectrofotómetro Nanodrop. Para la medida, se recogieron señales de fluorescencia del PI (FL2-A) procedentes de 20.000 núcleos mediante el programa informático CellQuest (Becton Dickinson Immuno Cytometry system, San Jose, CA). Se usó una configuración del instrumento en tiempo real empleando los parámetros FL2-A y FSC-H que permitieron el uso de la medida de fluorescencia de los núcleos para generar un histograma de FL2-A. La posición media del pico G0/G1 (núcleos) de la muestra y del estándar interno se determinaron analizando los datos mediante el programa CellQuest. El contenido medio de ADN por planta se basó en los 20.000 núcleos escaneados. La fórmula usada para convertir los valores de fluorescencia en contenido

de ADN fue: Contenido de ADN Nuclear = (posición media del pico desconocido)/(posición media del pico conocido) X contenido de ADN del estándar conocido.

5 El análisis por citometría de flujo de las hojas jóvenes de plantas control diploides de *Jatropha curcas* mostró dos picos de señal de amplitud de pulso de ADN que corresponden a contenido cromosómico 2C y 4C (Figura 3B). En el caso de plántulas derivadas de embriones somáticos (Figura 3A), solo se observó un pico que era menor que la señal de amplitud de pulso de ADN que corresponde al contenido cromosómico 2C y es aproximadamente la mitad del contenido de ADN de 2C (Figura 3C). Esta observación de un único pico indicó que las plantas eran haploides con un número de cromosomas $n = 11$ y los dos picos observados en las plantas control muestran que la planta es diploide con un número de cromosomas $2n = 22$. El contenido de ADN de las hojas de plantas haploides y diploides se cuantificó y se observó que las hojas de plantas haploides y diploides contienen 254,15 ng/ μ l y 508,3 ng/ μ l respectivamente. Ya que las plántulas se regeneraron mediante embriogénesis somática mediada por callos a partir de óvulos aislados del ovario de botones florales sin fertilizar de *J. curcas*, las plántulas son haploides, lo que se confirmó por citometría de flujo. Se han comunicado observaciones de producción de haploides a partir de cultivo in vitro de óvulos no polinizados de *Curcubita pepo* y remolacha azucarera (*Beta vulgaris* L.) (Metwally et al. (2004); Gürel y Gürel (1998); Bossoutrot y Hosemans (1985); Galatowitsch y Smith (1990); Van Geyt et al. (1987)). Esta es la primera comunicación de producción de plantas haploides a partir de plantas no fertilizadas de *Jatropha curcas*.

20 EJEMPLO 7

Producción de plantas dobles haploides regeneradas de *Jatropha curcas*

25 Los callos embriogénicos preparados como se describe en el Ejemplo 5 anterior para desarrollarse en embriones somáticos (después de cuarenta días de inducción de callos embriogénicos) se trataron con diferentes concentraciones de colchicinas (0,1-1 %) durante tres días. Las condiciones de cultivo (temperatura, fotoperiodo y luz) son iguales a las descritas anteriormente. Después del tratamiento con colchicina, los callos embriogénicos tratados se transfirieron a medio de iniciación fresco (medio MS que contiene 2,4-D (6,78 μ M)) y se cultivaron como se describe en el Ejemplo 5 para el desarrollo de los embriones somáticos. Los embriones somáticos maduros se transfirieron a medio de germinación (medio MS fortificado con GA₃ e IBA) y se cultivaron como se describe en el Ejemplo 5 para el desarrollo de plántulas.

30 De entre los diferentes tratamientos con colchicinas, la concentración del 0,5 % fue la más efectiva en la producción de plántulas dobles haploides. Si la concentración aumenta por encima del 0,5 %, los callos se vuelven marrones y mueren. Los caracteres morfológicos de las plántulas tratadas con colchicinas son como de doble haploide. Esta técnica puede aplicarse además para programas de fitomejoramiento.

35 El uso de términos "un", "una", "uno", "el" o "la" y referentes similares en el contexto de describir la invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones siguientes) deben interpretarse para cubrir tanto el singular y el plural, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o quede claramente contradicho por el contexto. Los términos "comprenden", "tienen", "incluyen" y "contienen" deben entenderse como términos abiertos (es decir, significan "incluyen, pero sin limitación") a menos que se indique lo contrario. La cita de intervalos de valores en el presente documento tiene únicamente el propósito de servir como método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que se encuentre dentro del intervalo, a menos que se indique lo contrario en el presente documento, y cada valor separado se incorpora en la memoria descriptiva como si fuese citado de manera individual en el presente documento. Por ejemplo, si se divulga el intervalo 10-15, 11, 12, 13 y 14 también se encuentran divulgados. Todos los métodos descritos en el presente documento pueden efectuarse en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en el presente documento o quede claramente contradicho por el contexto. El uso de cualquiera de y todos los ejemplos, o lenguaje ejemplar (por ejemplo, "como") proporcionado en el presente documento, tiene únicamente el propósito de ilustrar mejor la invención, y no supone una limitación al alcance de la invención a menos que se reivindique lo contrario. Ninguna expresión en la memoria descriptiva debe interpretarse como indicativo de cualquier elemento no reivindicado como esencial para la práctica de la invención.

Bibliografía

- 55 Arumuganathan, K. y Earle, E.D. (1991a). Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol Biol Rep* 9:208-219, (1991a).
- Arumuganathan, K. y Earle, E.D. (1991 b). Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. *Plant Mol Biol Rep* 9:221-231.
- 60 Arumuganathan, K. et al. (1999). Nuclear DNA content of thirteen turfgrass species by flow cytometry. *Crop Sci* 39: 1202-1207.
- Bennett, M.D. et al. (2000). Nuclear DNA amounts in angiosperms and their modern uses-807 new estimates. *Ann Bot (Londres)* 86:859-909.
- 65

- Bossoutrot, D. y Hosemans, D. (1985). Gynogenesis in *Beta vulgaris* L. from in vitro culture of unpollinated ovules to production of doubled haploid plants in soil. *Plant Cell Rep* 4:300-303.
- 5 Brummer, E.C. et al. (1999). Ploidy determination of alfalfa germ plasm accession using flow cytometry. *Crop Sci* 39: 1202-1207.
- Christensen, A.H. and Quail, P.H, (1989). Sequence analysis and transcriptional regulation by heat shock of polyubiquitin transcripts from maize. *Plant Mol Biol* 12:619-632.
- 10 Christensen, A.H. et al. (1992). Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Mol Biol* 18:675-689.
- 15 Datta, M.M. et al. (2007). In vitro clonal propagation of biodiesel plant (*Jatropha curcas* L.). *Curr Sci* 93:1438-1442.
- Dodeman, V. L. et al. (1997). Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *J Exp Bot* 48:1493-1509.
- 20 Galatowitsch, M.w. and Smith GA (1990). Regeneration from unfertilized ovule callus of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Can. J. Plant Sci* 70:83-89.
- Gaydou, A.M. et al. (1982). Vegetable energy sources in Madagascar: ethyl alcohol and oil seeds (Francés). *Oleagineux* 37:135-141.
- 25 Gürel, E. y Gürel, S. (1998). Plant regeneration from unfertilized ovaries of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) cultured *in vitro*. *Tr J Botany* 22:233-238.
- Heslop-Harrison, J.S. (1995). Flow cytometry and genome analysis. *Probe* 5:14-17.
- 30 Hultquist, S.J. et al. (1997). DNA content and chloroplast DNA polymorphisms among accessions of switchgrass from remnant Midwestern prairies. *Crop Sci* 37:595-98.
- Jha, T.B. et al. (2007). Somatic embryogenesis in *Jatropha curcas* Linn., an important biofuel plant. *Plant Biotech Rep* 1: 135-140.
- 35 Jyoti, S. et al. (2000). An expeditious method for regeneration of somatic embryos in *Jatropha curcas* L", *Phytomorphology*, International Society of Plant Morphologists, Delhi, In. 50, no. 3-4: 239-242.
- 40 Kim, Y.S. et al. (2007). High frequency plant regeneration via somatic embryogenesis in *Podophyllum peltatum* L., an important source of anticancer drug. *Curr Sci* 92:662-666.
- Last, O.I. et al. (1991). pEmu: an improved promoter for gene expression in cereal cells. *Theor Appl Genet* 81 :581-588.
- 45 Li, M. et al. (2008). Establishment of a mediated cotyledon disc transformation method for *Jatropha curcas*. *Plant Cell Tiss and Org Cult* 92:173-181.
- Lu, K. et al. (1998). Nuclear DNA content and chromosome numbers in switch grass. *Great Plains Res* 8:269-80.
- 50 Mathews, H. et al. (1992). Stable integration and expression of betaglucuronidase and NPT-II genes in mango somatic embryos. *In Vitro Cell Develop Biol-Plant* 28P: 172-178.
- McElroy, D. et al. (1990). Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. *Plant Cell* 2: 163-171.
- 55 Metwally, E.I. et al. (1998). Production of haploid plants from in vitro culture of unpollinated ovules of *Curcubita pepo*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 52:117-121.
- 60 Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497.
- Neuhaus, G. et al. (1987). Transgenic rapeseed plants obtained by microinjected DNA into micro-spore-derived embryoids. *Theor Appl Genet* 75:30-36.
- 65 Odell, J.T. et al. (1985). Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313:810-812.

- Puddephat, I.J. et al. (1999). Influence of stock plant pretreatment on gynogenic embryo induction from flower buds of onion. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 57, N°2: 145-148.
- 5 Rayburn, A.L. et al. (1989). Detection of intraspecific DNA content variation in *Zea mays* L., by flow cytometry. *J Exp Bot* 40: 1179-1183.
- Sato, S. et al. (2000). Production of doubled haploid plants of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) by pseudofertilized ovule culture. *Scientia Horticulturae* (Amsterdam) 83, N° 3-4: 301-310.
- 10 Sujatha, M y Mukta, N. (1996). Morphogenesis and Plant regeneration from tissue cultures of *Jatropha curcas*. *Plant Cell Tiss and Org Cult* 44:135-141.
- Van Geyt, J.P.C. et al. (1987). In vitro induction of haploid plants from unpollinated ovules and ovaries of the sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Theor Appl Genet* 73:920-925.
- 15 Velten, J. et al. (1984). Isolation of a dual plant promoter fragment from the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *EMBO J* 3:2723-2730.
- Vogel, K.P. et al. (1999). Nuclear DNA content and radiosensitivity in Brassica and allied genera. *Jap J Breed* 19: 350-356.
- 20 Wilde, HD. et al. (1992). Expression of foreign genes in transgenic yellow-poplar plants. *Physiol* 98:114-120.

REIVINDICACIONES

1. Un método para regenerar *Jatropha* mediante embriogénesis somática que comprende las etapas:
 - 5 (a) cultivar un explante de *Jatropha* en un primer medio que comprende medio basal MS y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en la oscuridad para inducir la formación de callos embriogénicos, en donde el explante de *Jatropha* es un óvulo diseccionado de un botón floral sin abrir;
 - (b) cultivar los callos embriogénicos en el primer medio en un fotoperiodo de luz/oscuridad para inducir el desarrollo y maduración del embrión somático; y
 - 10 (c) cultivar los embriones somáticos maduros en un segundo medio que comprende medio basal MS, ácido indol-3-butírico (IBA) y ácido giberélico (GA₃) en un fotoperiodo de luz/oscuridad para germinar las plántulas.
2. El método de la reivindicación 1, en donde la duración del cultivo es:
 - 15 de aproximadamente 30 días a aproximadamente 60 días en el primer medio para inducir la formación de callos embriogénicos;
 - de aproximadamente cuatro semanas a aproximadamente seis semanas en el primer medio para desarrollar y madurar los embriones somáticos; y
 - 20 de aproximadamente una semana a aproximadamente tres semanas en el segundo medio para germinar las plántulas.
3. El método de la reivindicación 2, en donde la duración de cultivo en cada medio es:
 - 25 aproximadamente 40 días en el primer medio para inducir la formación de callos embriogénicos;
 - aproximadamente cuatro semanas en el primer medio para desarrollar y madurar los embriones somáticos; y
 - aproximadamente dos semanas en el segundo medio para germinar las plántulas.
4. El método de la reivindicación 1, en donde la duración del cultivo es:
 - 30 de aproximadamente 30 días a aproximadamente 60 días en el primer medio para inducir la formación de callos embriogénicos;
 - de aproximadamente cuatro semanas a aproximadamente seis semanas en el primer medio con subcultivo aproximadamente cada dos semanas para desarrollar y madurar embriones somáticos; y
 - 35 de aproximadamente una semana a aproximadamente tres semanas en el segundo medio con subcultivo aproximadamente cada dos semanas para germinar las plántulas.
5. El método de la reivindicación 4, en donde la duración del cultivo en cada medio es:
 - 40 aproximadamente 40 días en el primer medio para inducir la formación de callos embriogénicos;
 - aproximadamente cuatro semanas en el primer medio para desarrollar y madurar los embriones somáticos maduros; y
 - aproximadamente dos semanas en el segundo medio para germinar las plántulas.
6. El método de la reivindicación 1, en donde el segundo medio contiene además una o más citoquininas, uno o más aditivos orgánicos o una mezcla o una o más citoquininas y uno o más aditivos orgánicos.
7. El método de la reivindicación 6, en donde la citoquinina es quinetina (KN), 6-bencilaminopurina (BA), tidiazurón (TDZ) o mezclas de los mismos.
- 50 8. El método de la reivindicación 6, en donde el aditivo inorgánico es hidrolizado de caseína (CH), sulfato de adenina (AdSO₄) o mezclas de los mismos.
9. El método de la reivindicación 6, en donde (a) la citoquinina es quinetina (KN), 6-bencilaminopurina (BA), tidiazurón (TDZ) o mezclas de los mismos y (b) el aditivo orgánico es hidrolizado de caseína (CH), sulfato de adenina (AdSO₄) o mezclas de los mismos.
- 55 10. El método de la reivindicación 1, en donde el medio comprende:
 - 60 primer medio: medio basal MS y de aproximadamente 2,26 μM a aproximadamente 9,04 μM de 2,4-D; y
 - segundo medio: medio basal MS, de aproximadamente 1,23 μM a aproximadamente 4,92 μM de IBA y de aproximadamente 0,72 μM a aproximadamente 5,76 μM de GA₃.
11. El método de la reivindicación 10, en donde los medios comprenden:
 - 65 primer medio: medio basal MS y aproximadamente 6,78 μM de 2,4-D; y

segundo medio: medio basal MS, aproximadamente 2,46 μM de IBA y aproximadamente 2,88 μM de GA_3 .

12. El método de la reivindicación 7, en donde la concentración de las una o más citoquininas es:

- 5 (a) de aproximadamente 1,16 μM a aproximadamente 9,28 μM de KN;
(b) de aproximadamente 1,10 μM a aproximadamente 8,86 μM de BA;
(c) de aproximadamente 1,13 μM a aproximadamente 9,08 μM de TDZ;
(d) de aproximadamente 1,16 μM a aproximadamente 4,64 μM de KN y de aproximadamente 1,10 μM a aproximadamente 4,43 μM de BA;
10 (e) de aproximadamente 1,10 μM a aproximadamente 4,43 μM de BA y de aproximadamente 1,13 μM a aproximadamente 4,54 μM de TDZ; o
(f) de aproximadamente 1,16 μM a aproximadamente 4,64 μM de KN y de aproximadamente 1,13 μM a aproximadamente 4,54 μM de TDZ.

15 13. El método de la reivindicación 12, en donde la concentración de las una o más citoquininas es:

- (a) aproximadamente 4,64 μM de KN;
(b) aproximadamente 4,43 μM de BA;
(c) aproximadamente 4,54 μM de TDZ;
20 (d) aproximadamente 2,32 μM de KN y aproximadamente 2,21 μM de BA;
(e) aproximadamente 2,21 μM de BA y aproximadamente 2,27 μM de TDZ; o
(f) aproximadamente 2,32 μM de KN y aproximadamente 2,27 μM de TDZ.

14. El método de la reivindicación 8, en donde la cantidad de aditivo orgánico es:

- 25 (a) de aproximadamente 0,25 g a aproximadamente 1,0 g de CH;
(b) de aproximadamente 25 mg a aproximadamente 200 mg de AdSO_4 ; o
(c) de aproximadamente 0,25 g a aproximadamente 1,0 g de CH y de aproximadamente 25 mg a aproximadamente 200 mg de AdSO_4 .
30

15. El método de la reivindicación 14, en donde la cantidad de aditivo orgánico es:

- (a) aproximadamente 1,0 g de CH;
(b) aproximadamente 100 mg de AdSO_4 ; o
35 (c) aproximadamente 1,0 g de CH y aproximadamente 100 mg de AdSO_4 .

16. El método de la reivindicación 9, en donde

- (a) la concentración de las una o más citoquininas es:
40 (i) de aproximadamente 1,16 μM a aproximadamente 9,28 μM de KN;
(ii) de aproximadamente 1,10 μM a aproximadamente 8,86 μM de BA;
(iii) de aproximadamente 1,13 μM a aproximadamente 9,08 μM de TDZ;
(iv) de aproximadamente 1,16 μM a aproximadamente 4,64 μM de KN y de aproximadamente 1,10 μM a aproximadamente 4,43 μM de BA;
45 (v) de aproximadamente 1,10 μM a aproximadamente 4,43 μM de BA y de aproximadamente 1,13 μM a aproximadamente 4,54 μM de TDZ; o
(vi) de aproximadamente 1,16 μM a aproximadamente 4,64 μM de KN y de aproximadamente 1,13 μM a aproximadamente 4,54 μM de TDZ; y
50 (b) la cantidad del aditivo orgánico es:
(i) de aproximadamente 0,25 g a aproximadamente 1,0 g de CH;
(ii) de aproximadamente 25 mg a aproximadamente 200 mg de AdSO_4 ; o
55 (iii) de aproximadamente 0,25 g a aproximadamente 1,0 g de CH y de aproximadamente 25 mg a aproximadamente 200 mg de AdSO_4 .

17. El método de la reivindicación 16, en donde

- 60 (a) la concentración de las una o más citoquininas es:
(i) aproximadamente 4,64 μM de KN;
(ii) aproximadamente 4,43 μM de BA;
(iii) aproximadamente 4,54 μM de TDZ;

- (iv) aproximadamente 2,32 μM de KN y aproximadamente 2,21 μM de BA;
- (v) aproximadamente 2,21 μM de BA y aproximadamente 12,27 μM de TDZ; o
- (vi) aproximadamente 2,32 μM de KN y aproximadamente 2,27 μM de TDZ; y

5 (b) la cantidad de aditivo orgánico es:

- (i) aproximadamente 1,0 g de CH;
- (ii) aproximadamente 100 mg de AdSO₄; o
- (iii) aproximadamente 1,0 g de CH y aproximadamente 100 mg de AdSO₄.

10 18. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 12-17, en donde los medios comprenden:
primer medio: medio basal MS y de aproximadamente 2,26 μM a aproximadamente 9,04 μM de 2,4-D; y
segundo medio: medio basal MS, de aproximadamente 1,23 μM a aproximadamente 4,92 μM de IBA y de
15 aproximadamente 0,72 μM a aproximadamente 5,76 μM de GA₃.

19. El método de la reivindicación 18, en donde los medios comprenden:

20 primer medio: medio basal MS y aproximadamente 6,78 μM de 2,4-D; y
segundo medio: medio basal MS, aproximadamente 2,46 μM de IBA y aproximadamente 2,88 μM de GA₃.

25 20. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde cada medio comprende además una fuente de carbono, en donde la fuente de carbono se selecciona preferentemente del grupo que consiste en sacarosa, glucosa, fructosa, maltosa, una mezcla de sacarosa y glucosa, una mezcla de fructosa y glucosa y una mezcla de maltosa y glucosa.

30 21. El método de la reivindicación 20, en donde la fuente de carbono se selecciona del grupo que consiste en de aproximadamente un 2 % a aproximadamente un 5 % de sacarosa, de aproximadamente un 2 % a aproximadamente un 5 % de glucosa, de aproximadamente un 2 % a aproximadamente un 5 % de fructosa, de aproximadamente un 2 % a aproximadamente un 5 % de maltosa, una mezcla de aproximadamente un 2 % a aproximadamente un 3 % de sacarosa y de aproximadamente un 2 % a aproximadamente un 3 % de glucosa, una mezcla de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 2 % de fructosa y de aproximadamente un 2 % a aproximadamente un 3 % de glucosa y una mezcla de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 2 % de maltosa y de aproximadamente un 2 % a aproximadamente un 3 % de glucosa.

35 22. El método de la reivindicación 1 que además comprende el paso (a1) después del paso (a) y antes del paso (b) en donde el paso (a1) comprende tratar el callo embriogénico con un inhibidor mitótico para inducir la duplicación de cromosomas, en donde el inhibidor mitótico se selecciona del grupo que consiste en colchicinas y orizalina.

40 23. El método de la reivindicación 22, en donde los callos embriogénicos se tratan con entre un 0,1 % a 0,5 % del inhibidor mitótico.

45 24. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 22 o 23, en donde los callos embriogénicos se tratan durante un periodo de un día a tres días.

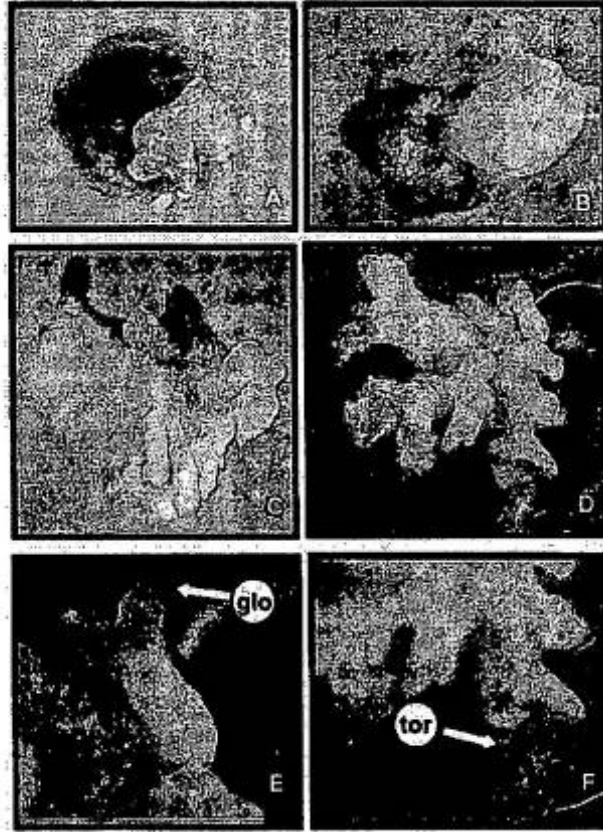


FIGURA 1

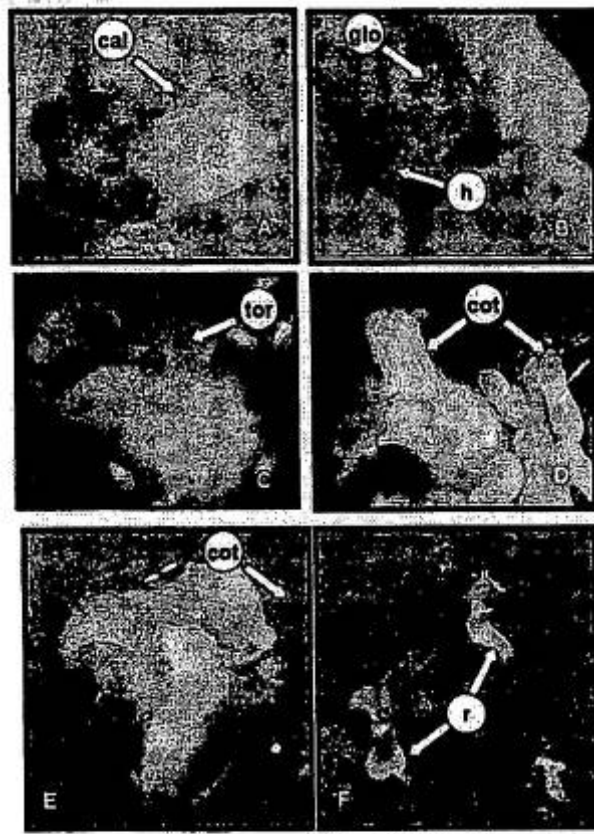


FIGURA 2

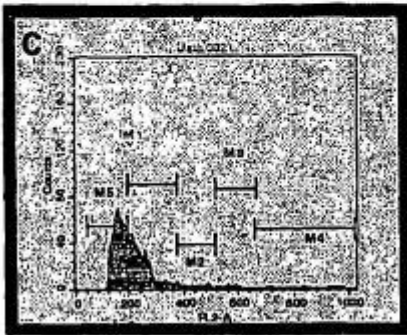
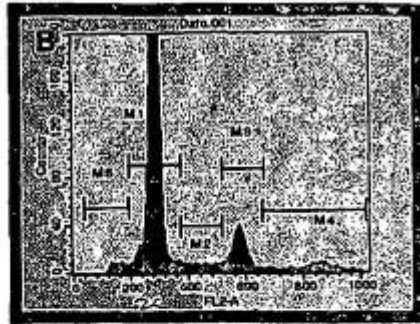
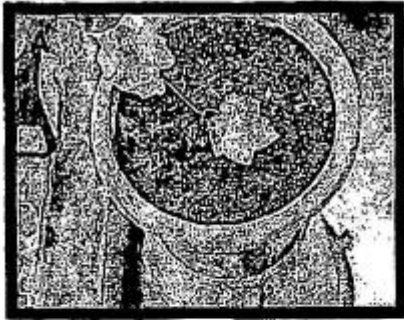


FIGURA 3