

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 800 281**

51 Int. Cl.:

A01H 5/02 (2008.01)

C12N 5/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.12.2016 PCT/IN2016/050446**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.06.2017 WO17103948**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2016 E 16875081 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2020 EP 3389363**

54 Título: **Un procedimiento in vitro**

30 Prioridad:

19.12.2015 IN 4182DE2015

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

29.12.2020

73 Titular/es:

**COUNCIL OF SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL
RESEARCH (100.0%)
Anusandhan Bhawan Rafi Marg
New Delhi 110001, IN**

72 Inventor/es:

**KURIAN JOHN, CHOUMPURATHU;
VIJAY SHIRGURKAR, MRUDUL y
BHIMRAO DHAGE, ASHOK**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 800 281 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

Un procedimiento *in vitro*

Campo técnico de la invención:

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la inducción de floración *in vitro*/proliferación de primordios florales *in vitro* en el crocus del azafrán (*Crocus sativus* L.) para producir flores enteras con estigmas reales. Más particularmente, la presente invención proporciona una alternativa rentable al cultivo en el campo de azafrán, mediante un procedimiento continuo, independiente de la temporada, de inducción de floración *in vitro*/proliferación de primordios florales *in vitro* para producir flores enteras con estigmas reales de azafrán (*Crocus sativus* L.).

Antecedentes de la invención:

10 El azafrán del comercio son los estigmas secos del crocus del azafrán (*Crocus sativus* L.), que se ha utilizado durante mucho tiempo como especia, agente colorante y medicina. Tiene un gran valor comercial y es la fuente de tres fitoquímicos de alto valor, la crocina, la picrocrocina y el safranal. Es la especia más cara del mundo (Rs. 200 000 a 300 000 por Kg). Los compuestos fitoquímicos del azafrán poseen una serie de actividades medicinales importantes, tales como efectos antiinflamatorios, antioxidantes, anticonvulsivos, ansiolíticos, antidepresivos, afrodisíacos, antihipertensivos, antitúricos, antinociceptivos, antígenotóxicos y citotóxicos (Kirtikar y Basu, 1933). Mejoran la memoria y las habilidades de aprendizaje, y aumentan el flujo sanguíneo en la retina y la coroides (Srivastava et al., 2010). Los compuestos fitoquímicos del azafrán también tienen propiedades anticancerígenas y tumorocidas (Abdullev, 2002).

20 En la actualidad, el crocus del azafrán se cultiva en un estrecho cinturón geográfico que se extiende desde Creta (España) en el oeste y Cachemira (India) en el este entre las regiones de clima tropical y templado, debido a los requisitos específicos de suelo y clima del cultivo. Irán, España (juntos representan el 80% de la producción mundial de azafrán), India, Grecia, Azerbaiyán, Marruecos son los principales productores de azafrán. En la India, el azafrán se cultiva en Pampore (Cachemira) y Kishtawar (Jammu).

25 Aunque, la India era uno de los principales productores de azafrán junto con España e Irán, el área con cultivo de azafrán y la producción anual, no obstante, han sido testigos de disminuciones rápidas y drásticas en las últimas dos décadas. En vista de la variedad de actividades biológicas y la menor disponibilidad de la materia prima, la investigación sobre este valioso producto natural se ha visto obstaculizada. Por lo tanto, es necesario aumentar la producción de este valioso producto natural, el azafrán, a mayor escala para satisfacer la creciente demanda mundial.

30 Sin embargo, aumentar la producción de azafrán por los medios tradicionales es difícil. El alto coste del azafrán puede atribuirse a tres razones: (i) requisito agroclimático específico para el cultivo, (ii) bajo rendimiento y (iii) recolección manual que requiere mucha mano de obra. Ha habido muy poca mejora en las prácticas de cultivo convencionales seguidas durante miles de años. Aunque ha habido muchos intentos de desarrollar una alternativa a la producción de azafrán mediante el cultivo en el campo, hasta hoy no se dispone de dichos métodos. Métodos disponibles actualmente para la proliferación *in vitro* de tejido de estigma y la producción de estructuras similares al estigma (SLS) a partir de brotes de flores jóvenes, órganos florales o sus partes como explantes tienen muchas limitaciones y no son comercialmente viables.

35 Sano et al. (1987) fueron unos de los primeros que intentaron desarrollar una alternativa a la producción de azafrán mediante el cultivo en el campo. Trabajaron en la proliferación *in vitro* de tejido de estigma y la producción de estructuras similares a estigmas (SLS) (Sano y Himeno, 1987; Plessner y Ziv, 1999; Husaini et al., 2010). Sano y Himeno (1987) utilizaron estigmas intactos más ovario como explantes. También se cultivaron estigmas individuales o medios ovarios extirpados jóvenes. Podían lograr la proliferación de tejido del estigma como un callo (por organogénesis indirecta) y también la producción de estructuras similares a estigmas (SLS) (por organogénesis indirecta). Existen varios informes sobre la producción de estructuras similares a estigmas (SLS) (Chen et al., 2003; Zeng et al., 2003; Jun et al., 2007; Mir et al., 2010; Namin et al., 2010). Sano y Himeno (1987) describieron una mayor formación de estructuras similares a estigmas (SLS) pigmentadas *in vitro* a partir de estigmas intactos con ovario o medio ovario extirpados como explantes. Otsuka et al. (1992) describieron la producción de estructuras similares a estigmas (SLS) *in vitro* cuando el medio contenía niveles elevados de sacarosa junto con NAA, BA y alanina. La calidad y cantidad de compuestos fitoquímicos y pigmentos de azafrán dependía del tipo de tejido u órganos regenerados *in vitro* (Plessner y Ziv, 1999).

50 Las estructuras similares a estigmas (SLS) regeneradas a partir de varios órganos florales contenían bajos niveles de compuestos fitoquímicos y pigmentos del azafrán (Sano y Himeno, 1987) o compuestos fitoquímicos y pigmentos diferentes en conjunto. Sin embargo, en algunos casos la composición y cantidad de compuestos fitoquímicos y pigmentos del azafrán eran similares a los producidos en estigmas recogidos de plantas cultivadas de forma natural (Sano y Himeno, 1987; Plessner y Ziv, 1999; Husaini et al., 2010).

55 El tejido calloso hecho proliferar *in vitro* a partir de explantes de estigma o las estructuras similares al estigma (SLS) producidas *in vitro* a partir de brotes de flores jóvenes, órganos florales enteros o parte (corola, estambres, filamentos, anteras, pistilo, ovario, carpelos, placenta, estilo, estigmas intactos o extirpados) no contienen suficientes metabolitos secundarios. Todos los métodos puestos en práctica hasta ahora en la técnica anterior usan brotes de flores jóvenes,

5 diferentes órganos florales tales como corola, estambres, filamentos, anteras, pistilo, ovarios, carpelos, placentas, estilo y estigma, etc. como explantes para generar tejido calloso (por organogénesis indirecta) o estructuras similares al estigma (SLS) en un esfuerzo por aumentar la producción de la especias azafrán. En general, se acepta en el campo que el estigma real de las flores enteras se espera que produzca azafrán de mayor calidad que las SLS. En este contexto, inducir la floración es un objetivo deseable.

Además, aproximadamente 150 flores juntas producen 1 g (0.035 oz) de hebras secas de azafrán. Por lo tanto, para aumentar el rendimiento del azafrán, es imprescindible aumentar el número de flores con estigmas que poseen ingredientes naturales reales, que se pueden procesar para producir hebras de azafrán.

10 Sin embargo, los métodos disponibles hasta ahora son para la producción de estructuras similares a estigmas (SLS), y no para estigmas reales. Otros métodos explorados hasta ahora no son económicamente viables, para la producción de azafrán mediante el cultivo en el campo y no son adecuados para la producción comercial de azafrán como industria, en vista del contenido relativamente bajo de pigmentos y compuestos aromáticos.

15 Por lo tanto, para abordar la necesidad de hace muchos años de la técnica anterior de desarrollar una alternativa para aumentar la producción de azafrán a una escala económica, los presentes autores de la invención por primera vez han ideado un procedimiento de inducción de floración *in vitro*/proliferación de primordios florales *in vitro* continuo, independiente de la temporada, para producir flores enteras y estigmas reales de azafrán usando cormos latentes del tamaño correcto recolectados en el momento correcto como explantes a diferencia de los brotes florales jóvenes u órganos florales enteros o partes.

Objetos de la invención

20 El objeto de la presente invención es abordar los problemas en la técnica anterior adoptando un enfoque totalmente nuevo para la producción de flores enteras de azafrán con estigmas reales que es independiente de la temporada y rentable, a través de inducción de la floración *in vitro*/proliferación de primordios florales *in vitro* para aumentar el número de flores/por campo/año.

Sumario de la invención:

25 En el contexto de las carencias mencionadas anteriormente en la técnica anterior, los autores de la presente invención han desarrollado un procedimiento que comprende combinaciones específicas y secuencia de etapas y tratamientos termodinámicos que incluyen la elección del explante correcto (parte de la planta utilizada como material de partida), elección del tamaño del explante de acuerdo con el diámetro y el peso, el momento adecuado de obtención del explante, la esterilización de la superficie de los explantes, el medio de cultivo en el que se utilizan los reguladores de crecimiento de plantas (PGR) adecuados en sus concentraciones óptimas, inoculación/incubación, etc. para lograr así
30 con éxito la inducción de floración *in vitro*/proliferación de primordios florales *in vitro*.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un procedimiento continuo, independiente de la temporada, de inducción de floración *in vitro*/proliferación de primordios florales *in vitro* para producir flores enteras con estigmas reales de crocus del azafrán (*Crocus sativus* L) utilizando explante de cormos latentes, que comprende los etapas de:

35 a. Normalización del tamaño correcto de los explantes de cormos según el diámetro y el peso, y el momento correcto para la recolección de los explantes de cormos y el inicio de los cultivos;

b. Esterilización de la superficie de los explantes de cormos lavándolos con detergente diluido seguido de tratamiento con un agente antimicrobiano de amplio espectro adecuado y varios lavados posteriores con agua destilada;

40 c. Preparación de los medios basales normalizados de Murashige - Skoog (MS) con los elementos principales (N, P, K, Mg, Ca, etc.) y elementos menores (I, Na, Mn, Zn, Mo, Cu, Co, Fe etc.) complementado con vitaminas y PGR en una concentración que varía de 0.01 a 2 mg/l, en estado líquido o semisólido; y

45 d. Inoculación aséptica de los explantes esterilizados en la superficie en/sobre el medio MS de la etapa (c), en una estación de trabajo estéril en una sala de inoculación mantenida con un alto grado de esterilidad y una temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$;

e. Incubación de los explantes en una sala de incubación/cámara de crecimiento en condiciones estériles a una temperatura en el intervalo de $9\text{-}30^{\circ}\text{C}$ (generalmente a $22 + 2^{\circ}\text{C}$, pero con variaciones diurnas y dependientes de la estación) con un fotoperíodo de 16 horas a una intensidad de luz de $11.7 \approx \text{mol/m}^2/\text{s}$ seguido de un período de oscuridad de 8 horas con HR de 50-90% hasta que se formen brotes; y

50 f. Transferencia e incubación de los cultivos germinados cortados verticalmente en/sobre el medio MS de la etapa (c) para producir flores enteras con estigmas reales.

Descripción de figuras:

Figura 1: representa a. Flor entera (etapa de brote), b. Flor entera (abierta), c y d. Estigmas

Figura 2: representa la floración inducida *in vitro* en *Crocus sativus* L.

Figura 3: representa el efecto de diferentes concentraciones de BAP (i) Control (0); (ii) BAP 0.5 mg/l ; (iii) BAP 1.0 mg/l; y (iv) BAP 2.0 mg/l

Figura 4: representa el cultivo *in vitro* de azafrán en medio que no contiene PGR.

- 5 Figura 5: Comparación del análisis por HPLC del estigma natural de Cachemira (5 (a)), el estigma de las flores producidas por el procedimiento (5 (b))

Descripción detallada de la invención:

La siguiente descripción es ilustrativa de realizaciones de la invención. La siguiente descripción no debe interpretarse como limitante, entendiéndose, que la persona experta puede llevar a cabo muchas variaciones obvias de la invención.

- 10 La presente invención describe un nuevo procedimiento rentable para la producción *in vitro* de flores de crocus del azafrán (*Crocus sativus* L.) mediante el crecimiento y desarrollo de primordios florales preexistentes, y la extensión de la temporada de floración y la producción de múltiples flores a través de la proliferación de estos primordios florales

Fuente del explante: Los cormos de crocus del azafrán (*Crocus sativus* L.) se compraron a un agricultor de azafrán en Pampore, Jammu y Cachemira, India, y a un comerciante de azafrán en Srinagar, Jammu y Cachemira, India.

- 15 En un aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para la producción de flores enteras con estigmas reales usando cormos latentes como explantes en donde la floración/proliferación de primordios florales se induce *in vitro*. Este procedimiento elimina el requisito básico del cultivo de suelo específico y condiciones climáticas, y lo hace independiente de la temporada, en donde es posible la producción continua de azafrán durante todo el año y en cualquier parte del mundo.

- 20 En un aspecto del procedimiento, el explante utilizado como material de partida se selecciona de cormos (propágulos vegetativos subterráneos), que se recogen del suelo en diferentes épocas del año (es decir, de junio a septiembre), mientras todavía están en estado latente, para iniciar los cultivos. Los cormos se usan de tres maneras diferentes; (a) como cormos enteros, (b) cormos cortados horizontal o verticalmente a diferentes niveles, y (c) cormos cortados en un cubo pequeño de aproximadamente 1 cm³ que contiene el brote latente o ligeramente germinado. Los cormos son de un tamaño que varía de 0.5 cm a 2.5 cm de diámetro, de 6 a 12 g de peso.

El uso de explantes de cormos en forma entera o cuando se cortan horizontal o verticalmente a diferentes niveles se contaminan y solo 10 a 20% de los cultivos permanecen estériles. Los cormos cortados en un cubo pequeño de aproximadamente 1 cm³ que contiene el brote latente o ligeramente germinado producen cultivos estériles y en germinación máxima de aproximadamente 50 a 80%.

- 30 En otro aspecto, los explantes de cormos se esterilizan usando un procedimiento estandarizado de esterilización de superficie de múltiples etapas, con daño mínimo al explante, para obtener cultivos en germinación máxima para la floración.

Los agentes esterilizantes se seleccionan de Labolene, Savlon (10 a 20%), Carnizim (1%), Bavistin (1%), Benomilo (2%), cloruro mercúrico (0.01% a 0.1%) y similares.

- 35 Por consiguiente, la esterilización comprende lavar el explante de corno con detergente Labolene (0.5-3 ml diluidos en 100 ml de agua) durante aproximadamente 10 a 15 minutos. Los explantes se lavan varias veces con agua destilada para eliminar los restos del detergente. A continuación, se trata con Savlon (10 a 20%) durante 5 a 10 minutos y se lava con agua destilada. Luego se tratan con un agente antifúngico seleccionado de Bavistin (1%) durante 20 a 40 minutos o con Carnizim (1%) durante 20 a 40 minutos o con Benomilo (2%) durante 20 a 40 minutos y se lavan a fondo con agua destilada para eliminar cualquier resto de agentes antifúngicos. A esto le sigue un tratamiento con cloruro mercúrico (0.01% a 0.1%) durante aproximadamente 5 a 8 minutos y se lava con agua destilada a fondo. El tratamiento con cloruro mercúrico se administra en una estación de trabajo estéril.

- 45 El aspecto adicional del presente procedimiento *in vitro* incluye la inoculación aséptica de los explantes esterilizados en los medios normalizados en una estación de trabajo estéril a aproximadamente 25°C. Los explantes se inoculan enteros o cortados horizontal o verticalmente a un tamaño que varía de 0.5 cm a 2.5 cm de diámetro y de 0.5 a 10 g de peso o se pueden cortar en un cubo pequeño de aproximadamente 1 cm³ que contiene los brotes apicales latentes o ligeramente germinados.

- 50 Los diferentes medios basales seleccionados incluyen el medio de White, el medio B5 de Gambourg o el medio basal de Murashige y Skoog (MS), ya sea en concentración completa (100%) o media concentración (50%), y/o en combinación con nutrientes principales y secundarios de un medio con vitaminas de otro medio.

En un aspecto preferido, los medios basales normalizados de acuerdo con la invención comprenden el medio basal de Murashige y Skoog (MS) ya sea en la concentración completa, o con los elementos principales (N, P, K, Mg, Ca, etc.) en la mitad de concentración (50%) y elementos secundarios (I, Na, Mn, Zn, Mo, Cu, Co, Fe, etc.) en la

concentración completa (100%) y con vitaminas de otro medio basal, en estado líquido o semisólido. Cuando se usa en estado semisólido, el medio comprende agar-agar en el intervalo de 0.5 a 0.7% u otros agentes gelificantes.

5 El medio basal normalizado comprende además reguladores del crecimiento de las plantas (PGR) seleccionados de auxinas sintéticas tales como ácido naftalenoacético, citoquininas de tipo adenina representadas por BAP (6-bencilaminopurina), kinetina y zeatina, citoquininas de tipo fenilurea como difenilurea y tidiazurón (TDZ); giberelinas (GA) en concentraciones que varían de 0.01 a 5 mg/l. Preferiblemente, los PGR incluyen BAP (6-bencilaminopurina), tidiazurón (TDZ) solos o en combinación en una concentración en el intervalo de 0.01 a 5.0 mg/l.

10 El medio se dispensa en frascos de cultivo estériles con tapas de polipropileno o en tubos de ensayo estériles tapados con algodón. El medio se esteriliza en autoclave a 120°C-125°C; preferiblemente a 121°C y a una presión entre 4.5-9 kg (10-20 lb); preferiblemente 6.8 kg (15 lb) durante 10 a 30 minutos, preferiblemente 20 minutos. El medio se prepara en agua destilada y el pH se ajusta en el intervalo de 5 a 6; preferiblemente de 5.6 a 5.8.

15 En un aspecto preferido, el medio de cultivo basal comprende medio de Murashige y Skoog (MS) ya sea en concentración completa o con los elementos principales N, P, K, Mg, Ca en mitad de concentración (50%) o con elementos secundarios I, Na, Mn, Zn, Mo, Cu, Co o Fe en concentración completa (100%); vitaminas; sacarosa del 2% al 3% como fuente de carbono; los PGR se seleccionaron de 6-bencilaminopurina (BAP) en el intervalo de 0.5 a 2.0 mg/l o tidiazurón (TDZ) en el intervalo de 0.01 a 0.1 mg/l usado por separado; en estado líquido o semisólido.

20 La incubación de los cultivos se lleva a cabo en una sala de incubación convencional/cámara de crecimiento que tiene parámetros físicos controlados y normalizados tales como entorno estéril, condiciones de temperatura, fotoperíodo, humedad relativa (HR) y condiciones adecuadas/favorables para la inducción de la floración *in vitro* en el azafrán. Los presentes autores de la invención observaron que las variaciones diurnas de temperatura son importantes para la inducción de la floración *in vitro*/proliferación de primordios florales *in vitro* en el azafrán.

25 En consecuencia, la incubación se lleva a cabo a una temperatura en el intervalo de 9°C a 30°C, preferiblemente a una temperatura en el intervalo de 9°C a 21°C, con HR (humedad relativa) en el intervalo de 50 a 90%, y fotoperíodo de aproximadamente 16 horas proporcionado por 1/2/4 tubos fluorescentes fríos (Philips, 40 W), que dan aproximadamente 11.7 \approx mol.m⁻².s⁻¹ PPF (flujo de fotones fotosintéticos), es decir, ~866 lux (iluminancia) seguido cada uno de un período de oscuridad de 8 h. Los cultivos se mantienen durante 4-5 semanas en el medio en las condiciones de incubación anteriores durante las cuales el 80% del cultivo permanece estéril y muestra germinación. Luego se transfieren a un medio MS nuevo de la misma composición y se incuban en condiciones estériles durante aproximadamente 1 a 2 semanas hasta que los brotes germinados tienen aproximadamente 8 cm de largo. Los brotes germinados se cortan verticalmente y se incuban en medio MS de la misma composición durante otras 2 a 3 semanas en las mismas condiciones. Esto ayuda a que el brote se abra y crezca más (Figura 1 y Figura 2).

30 En un aspecto, aproximadamente de 50 a 70% de los cultivos incubados en el medio MS de la composición anterior que contienen PGR seleccionados de 6-bencilaminopurina (BAP) o tidiazurón (TDZ) utilizados individualmente en una concentración en el intervalo de 0.01 a 2.0 mg/l muestran la presencia de brotes en floración como se muestra en la Fig. 3, mientras que los cultivos incubados en medio sin PGR no mostraron la emergencia de los brotes florales (Fig. 4).

La inducción de floración *in vitro*/proliferación de primordios florales *in vitro* según el procedimiento ocurrió en el mes de diciembre-enero a febrero-marzo y hasta mayo, que generalmente no es el período de floración del azafrán.

El procedimiento de acuerdo con la invención produjo 1-8 flores por recipiente de cultivo y en promedio 3-5 flores por recipiente de cultivo. Esto era diferente a las 2-3 flores por cormo/temporada producidas de forma natural.

40 Como cada flor tiene tres estigmas, se produjeron 3-24 estigmas por recipiente de cultivo. Por el contrario, los cormos generalmente producen 2-3 flores y 3-9 estigmas/temporada (es decir, por año), en la naturaleza, en el periodo de 2-3 semanas desde finales de octubre hasta de principios a mediados de noviembre. La inducción de floración *in vitro*/proliferación de primordios florales *in vitro* de la presente invención producía 3-15 estigmas adicionales en comparación con el cultivo en el campo convencional.

45 Así, según la invención, el número de estigmas/por cormo/temporada era efectivamente 3 veces y ocasionalmente 4 veces también. Los autores de la invención están trabajando más en el campo para normalizar los parámetros para un rendimiento constante de 8 flores o incluso más por cormo.

50 Además, la producción *in vitro* de flores según la presente invención podría extenderse desde mediados de diciembre hasta mediados de mayo, haciendo así al presente procedimiento de inducción de la floración *in vitro* continuo e independiente de la temporada.

En un aspecto, los estigmas del azafrán producidos por dicha técnica *in vitro* según la invención encuentran uso en los campos de la industria alimentaria, el teñido y la medicina como agente colorante, saborizante e inductor de aroma para alimentos, como agente colorante para algodón y lana, y como remedio para una serie de enfermedades y condiciones de salud.

55 La presente inducción de floración *in vitro*/proliferación de primordios florales *in vitro* para producir flores enteras y

- estigmas reales de crocus del azafrán (*Crocus sativus* L.) usando explante de cormo permite la producción de estigmas de azafrán independiente de la temporada, durante todo el año. Con un mayor refinamiento del procedimiento, se puede obtener un rendimiento de azafrán de un acre del campo de aprox. 93-464.6 m² (1000-5000 pies cuadrados) de sala de incubación. El procedimiento de inducción de floración *in vitro*/proliferación de primordios florales *in vitro* de la presente invención es una alternativa económica a la producción de azafrán por cultivo en el campo, y tiene un alto potencial comercial.
- El presente procedimiento supera la dependencia del clima y las condiciones del suelo minimizando así la incertidumbre en la producción de flores de azafrán a partir de cormos en forma de condiciones naturales, infestaciones que están más allá del control humano. Esto hace que el procedimiento sea comercialmente escalable y se puede llevar a cabo en cualquier parte del mundo sin restringirlo a zonas productoras de azafrán de inmersión a alta temperatura.
- La producción industrial de azafrán ha sido un problema pendiente y sin resolver durante muchas décadas. La inducción de la floración (flor entera) de azafrán en el laboratorio y la floración repetida del mismo cormo no se han logrado hasta la fecha.
- En esta invención, los autores de la invención han llegado a una sorprendente combinación y secuencia de etapas y tratamientos termoquímicos que por primera vez ha permitido la floración independiente de la temporada del azafrán con la capacidad adicional de producir múltiples eventos de floración a partir del mismo cormo. Por lo tanto, los autores de la invención han logrado la capacidad de producir industrialmente azafrán con más estigmas/cormo/año. Esto permitirá una alta producción en términos de azafrán para un agricultor en comparación con las prácticas tradicionales.
- Ventajas de la invención actual:
- El procedimiento hace que la floración del azafrán sea independiente de la temporada y la región,
 - El procedimiento aumenta el número de flores/cormo/año.
 - El procedimiento aumenta el rendimiento de estigmas (en la práctica azafrán) por hectárea de campo.
 - Los estigmas (azafrán) producidos por este método tienen los mismos ingredientes que los estigmas naturales. La calidad del azafrán se mantiene.
 - El procedimiento de la invención tarda solo 5-8 semanas para la floración completa. La floración es continua y no termina con el mes de noviembre a diferencia de la naturaleza.
 - El método es una alternativa económica a la producción de azafrán por cultivo en el campo, y tiene un alto potencial comercial.
- Metodología Experimental:
- Experimentos:
- Para llevar a cabo los experimentos, se adquirieron cormos enterrados de junio a septiembre de 2014 en los campos de azafrán en Cachemira. Se usaron cormos con un peso de 6-12 g como material vegetal de partida. Se limpiaron eliminando la tierra y otros materiales extraños, y se almacenaron bajo arena estéril a temperatura ambiente hasta su uso.
- Ejemplo 1:
- Se usaron cormos con un peso de ~10 g para los experimentos. Los explantes se prepararon recortando los lados y la base de los cormos y haciendo pequeños cubos de aproximadamente 1 cm³ que contiene los brotes apicales latentes o ligeramente germinados el 22/10/2014.
- Se esterilizó la superficie de estos explantes lavándolos con detergente neutro Labolene durante 10 min seguido de lavado con Savlon al 15% durante 10 minutos. Además, estos explantes se trataron con Bavistin al 1% (BASF) durante 30 minutos seguidos de 5 minutos seguidos de tratamiento con cloruro mercúrico al 0.08% en una estación de trabajo estéril (cámara de flujo de aire laminar). Después de cada tratamiento, los explantes se lavaron con agua destilada estéril.
- Preparación del medio: Se usó medio Murashige y Skoog complementado con 6-bencilaminopurina (BAP) (1.0 mg/l) para el cultivo. Los medios preparados en agua destilada estaban constituidos además por sacarosa al 3% y agar al 0.6%. El pH final se ajustó a 5.7. El medio se esterilizó en autoclave a 121°C a 6.8 kg (15 lb) de presión durante 20 minutos.
- Los cultivos se mantuvieron durante 5 semanas en el medio a 25 ± 2°C, intensidad de luz 16 horas de luz (a 11.7 μmol.m⁻².s⁻¹) seguido de un período oscuridad de 8 h.

Los brotes germinados estériles de 5-7 cm de longitud se transfirieron a medio nuevo de la misma composición después de hacer un corte vertical en el brote en germinación. Ayuda a que el brote se abra y crezca más.

Se incubaron nuevamente durante 3 semanas en las mismas condiciones de incubación.

5 La floración se observó en los cultivos el 5 de noviembre de 2014. Este era el experimento de control para determinar y establecer la viabilidad del medio creado para la floración *in vitro* de azafrán durante la temporada de floración natural.

10 Preparación de medios que no tienen PGR: Para iniciar los cultivos, se usó medio basal de Murashige y Skoog complementado con sacarosa al 3%, gelificada con agar (0.6%). No se añadieron PGR y el pH final se ajustó a 5.7. Se utilizó como control el medio basal de Murashige y Skoog complementado con sacarosa al 3%, gelificado con agar (0.5-0.7%) sin PGR. El medio se esterilizó en autoclave a 121°C a 6.8 kg (15 lb) de presión durante 20 minutos.

Estos cultivos se incubaron adicionalmente en las mismas condiciones de incubación durante 4-5 semanas.

Los brotes en medio sin PGR eran delgados, los primordios florales no se desarrollaron más como en la Fig. 4.

Ejemplo 2

15 Se usaron cormos con un peso de ~10 g para los experimentos. Los explantes se prepararon recortando los lados y la base de los cormos y haciendo pequeños cubos de aproximadamente 1 cm³ que contenían los brotes apicales latentes o ligeramente germinados el 22/10/2014. Una parte de dichas muestras se usó para esta configuración, mientras que otra se reservó para la configuración del ejemplo 3.

20 Se esterilizó la superficie de los explantes pasándolos a través de detergente Labolene durante 10 min, seguido de lavado con Savlon al 15% durante 10 minutos. Además, los explantes en cubos se trataron con Bavistin al 1% (BASF) durante 30 minutos seguido de 5 min de tratamiento con cloruro mercúrico al 0.08% en una estación de trabajo estéril (cámara de flujo de aire laminar). Después de cada tratamiento, los explantes se lavaron con agua destilada estéril.

Preparación del medio: Se usó medio de Murashige y Skoog complementado con 6-bencilaminopurina (BAP) (1.0 mg/l) para el cultivo. El medio preparado en agua destilada estaba constituido además por sacarosa al 3% y agar al 0.6%. El pH final se ajustó a 5.7. El medio se esterilizó en autoclave a 121°C a 6.8 kg (15 lb) de presión durante 20 minutos.

25 Los cultivos se mantuvieron durante 5 semanas en el medio a 25 ± 2°C. Intensidad de luz 16 h de luz (a 11.7 μmol.m⁻².s⁻¹) seguido de un período de oscuridad de 8 h.

Los brotes germinados estériles de 5-7 cm de longitud se transfirieron a medio nuevo de la misma composición después de hacer un corte vertical en el brote en germinación.

Se incubaron nuevamente durante 3 semanas en las mismas condiciones de incubación.

30 Se observó el inicio de la floración en el cultivo hasta finales de diciembre de 2014 como en la Fig. 1.

Por lo tanto, siguiendo la metodología experimental según la invención, se observó que los explantes estaban floreciendo más allá de su período de floración natural de octubre-noviembre aproximadamente.

Los cultivos se mantuvieron aún más transfiriéndolos a medio nuevo de la misma composición y se observó floración en los cultivos hasta mayo de 2015.

35 Ejemplos 3:

El segundo lote de explantes del ejemplo 2 se usó para verificar la eficiencia del TDZ.

Se usaron cormos con un peso de ~10 g para los experimentos. Los explantes se prepararon recortando los lados y la base de los cormos y haciendo pequeños cubos de aproximadamente 1 cm³ que contienen los brotes apicales latentes o ligeramente germinados el 22/10/2014.

40 Se esterilizó la superficie de los explantes tratándolos con detergente neutro Labolene durante 15 min seguido de lavado con Savlon al 20% durante 5 minutos. Además, los explantes se trataron con Carnizim al 1% durante 30 minutos seguido de tratamiento con cloruro mercúrico al 0.05% durante 8 minutos en una estación de trabajo estéril (cámara de flujo de aire laminar). Después de cada tratamiento, los explantes se lavaron con agua destilada estéril.

Preparación de medios que tienen TDZ:

45 El medio basal de Murashige y Skoog + sacarosa al 2%, gelificado con agar (0.7%) se complementó con el PGR tiazurón (TDZ) en tres concentraciones, es decir 0.01, 0.05 y 0.1 mg/l y el pH final se ajustó a 5.8. Los medios se esterilizaron en autoclave a 121°C a 6.8 kg (15 lb) de presión durante 20 minutos.

Los explantes esterilizados en la superficie se inocularon en estos medios en condiciones asépticas. Los cultivos se

mantuvieron durante 5 semanas en el medio en una sala de incubación mantenida a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante el día (la temperatura disminuía $4\text{-}5^{\circ}\text{C}$ durante la noche en invierno), y 16 h de luz a una intensidad de $11.7 \approx \text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ seguido por el período de oscuridad de 8 h.

5 Los brotes estériles de los cultivos cultivados en medio con TDZ de 5-7 cm de longitud se transfirieron a medio nuevo de la misma composición después de hacer un corte vertical en el brote en germinación en la estación de trabajo estéril. Ayuda a que el brote se abra y crezca más.

Estos cultivos se incubaron adicionalmente en las mismas condiciones de incubación durante 4-5 semanas. La floración se observó en la última semana de diciembre de 2014.

10 Los cultivos se mantuvieron aún más transfiriéndolos a un medio nuevo de la misma composición y se observó floración en los cultivos incubados en medio que contenía TDZ hasta mayo de 2015.

Ejemplos 4:

15 El azafrán (estigmas secos) de flores producidas en cultivo en el campo del mismo campo de azafrán en Cachemira de donde se obtuvieron los cormos para los experimentos se comparó con el azafrán (estigmas secos) de flores desarrolladas *in vitro* por el procedimiento de inducción de floración *in vitro*/proliferación de primordios florales *in vitro* respecto al contenido de compuestos fitoquímicos por análisis de HPLC.

Las condiciones analíticas de HPLC eran las siguientes *Reference Journal of Chromatography A*, 664 (1994) 55-61.

El análisis por HPLC indicaba que todos los picos presentes en la muestra de azafrán natural de Cachemira (Fig. 5 (a)) también estaban presentes en la muestra de flores desarrolladas *in vitro*, Fig. 5(b).

20 Se concluyó que el azafrán producido por el método descrito en la presente invención contiene crocina, picrocrocina y safranal. Todos estos se pueden detectar por UV a 254 nm.

La configuración experimental se repitió en los años posteriores 2015, 2016 y se encontró que era reproducible según el procedimiento de la invención.

Referencias:

- Abdullaev FI (2002). Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of Saffron (*Crocus sativus* L.). *Exp. Biol. Med.* 227, 20-25
- Basker D y Negbi M (1983). Uses of saffron. *Econ. Bot.* 37, 228-236
- Chen Chen S., Wang X., Zhao B., Yuan X., Wang Y (2003). Production of crocin using *Crocus sativus* callus by two-stage culture system, *Biotechnol. Lett.* 25: 1235-1238
- Ebrahimzadeh H, Rajabian T y Karamian R (2000). *In vitro* production of floral buds and stigma-like structures on floral organ of *Crocus sativus* L. *Pakistan Journal of Botany* 32: 134-150.
- Fakhrai F y Evans PK (1990). Morphogenic Potential of Cultured Floral Explants of *Crocus sativus* L. for the *In Vitro* Production of Saffron. *Journal of Experimental Botany*, 41(1): 47-52.
- Han LL y Zang XY (1993). Morphogenesis of the style stigma like structures from floral explants of *Crocus sativus* L. and identification of the pigments. *Acta Botanica Sinica*, 35: 157-160.
- Himeno H, Matshima H y Sano KS (1988). Scanning electron microscopic study on the *in vitro* organogenesis of saffron stigma and style-like structures. *Plant Science* 58: 93-101.
- Hori H, Enomoto K y Nakaya M (1988). Induction of callus from pistils of *Crocus sativus* L. and production of color compounds in the callus, *Plant Tissue Cult. Lett.* 5:72-77.
- Husaini AM, Kamili AN, Wani MH, Teixeira da Silva JA y Bhat GN ((2010). Sustainable saffron (*Crocus sativus* Kashmirianus) production: Technological and policy interventions for Kashmir, *Functional Plant Science and Biotechnology*, 4: 116-127.
- Jia YJ, Chen F, Lin HH, Cao YL, Li Y y Wang S (1996). Induction of style-stigma-like structure and regeneration of plantlets from corm of *Crocus sativus* in vitro. *J. Sichuan Univ. Nat. Sci. Edition* 33:747-750.
- Jun Z, Xiaobin C y Fang C (2007) Factors influencing *in vitro* flowering from styles of saffron. *Acta Horti*, 739:313-320
- Kirtikar KR y Basu BD (1933). *Indian Medicinal Plants*, edited by L. M. Basu, 2nd ed., Allahabad: Central Council for Research in Ayurveda & Siddha, (Deptt. of AYUSH, Min. of Health & Family Welfare), Govt. of India.
- Kohda H, Yamasaki K, Koyama A, Miyagawa H, Fujioka N, Omori Y, Ohta Y, Itoh H y Hosono T (1993) Process for Culturing Saffron Stigma Tissues. United States Patent N 5, 217, 897.

- Koyama A, Ohmori Y, Fujioka N, Miyagawa H, Yamasaki K y Kohda H (1988). Formation of stigma-like structure and pigment in cultured tissues of *Crocus sativus*. *Planta Med*, 54: 375-376.
- Loskutov AV, Beninger CW, Ball TM, Hosfield GL, Nair M y Sink KC (1999) Optimization of *in vitro* conditions for stigma-like- structure production from half-ovary explants of *Crocus sativus* L. *In vitro. Cell Dev. Biol. Plant* 35: 200~205
- Lu WL, Tong XR, Zhang Q y Gao WW (1992). Study on *in vitro* regeneration of style-stigma-like structure in *Crocus sativus* L. *Acta Bot. Sin.*, 34: 251-256.
- Mir JI, Ahmed N, Wani SH, Rashid R, Mir H y Sheikh MA (2010). *In vitro* development of microcorms and stigma like structures in saffron (*Crocus sativus* L.) *Physiol Mol Biol Plants*, 16(4): 369~373.
- Namin MH, Ebrahimzadeh H, Ghareyazie B, Radjabian T y Namin HH (2010). Initiation and origin of stigma-like structures (sls) on ovary and style explants of saffron in tissue culture *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 52/1: 55~60, 2010.
- Namera A, Koyoma N, Fujioka K, Yamasaki H y Konda H (1987). Formation of stigma like structures and pigments in cultured tissues of *Crocus sativus*. *Japanese Journal of Pharmacognosy*, 41: 260~262.
- Otsuka M, Saimoto HS, Murata Y y Kawashima M (1992).Method for producing saffron stigma-like tissue and method for producing useful components from saffron stigma like tissue. Patentes de Estados Unidos US 5085995, A28.08.89 US 399037, P 04.02.92.8 pp.
- Sano K y Himeno H (1987) *In vitro* proliferation of saffron (*Crocus sativus* L.) stigma. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 11: 159-166.
- Sarma KS, Maesato K, Hara T y Sonoda Y (1990). *In vitro* production of stigma-like structures from stigma explants of *Crocus sativus* L. *Journal of Experimental Botany* 41: 745~748.
- Sarma KS, Sharada K, Maesto K, Hara T y Sonoda Y (1991). Chemical and sensory analysis of saffron produced through tissue cultures of *Crocus sativus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 26: 11~16.
- Srivastava R, Ahmed H, Dixit RK, Dharamveer y Saraf SA (2010). *Crocus sativus* L.: A comprehensive review, *Pharmacogn. Rev.*, 4, 200~208.
- Visvanath S, Ravishankar GA y Venkataraman LV (1990). Induction of crocin, crocetin, picrocrocin and safranal synthesis in callus culture of saffron-*Crocus sativus* L. *Biotechnol. Applied Biochem*, 12: 336-340.

Zeng Y, Yan F, Tang L y Chen F (2003). Increased crocin production and induction frequency of stigma-like-structure from floral organs of *Crocus sativus* by precursor feeding. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 72: 185-191.

Zhao J, Chen F, Yan F, Tang L y Xu Y(2001) *In vitro* regeneration of style-stigma-like structure from stamens of *Crocus sativus*. *Acta Bot. Sin.* 43: 475-479

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de inducción de la floración *in vitro* continuo, independiente de la temporada, para producir flores enteras con estigmas reales de crocus del azafrán (*Crocus sativus* L) usando cormo latente/explantos que comprende;
 - (a) Uso de cormos enteros o cortados en cubos pequeños de 1 cm³ que contienen el brote ligeramente germinado,
 - 5 (b) Esterilización de la superficie de (a) e incubación de los explantes de cormos esterilizados en la superficie en condiciones estériles en medio de Murashige y Skoog (MS) durante un periodo de 5-8 semanas;
 - (c) Transferencia del cultivo a dicho medio MS nuevo e incubación en condiciones estériles durante 1 a 2 semanas hasta que los brotes germinados tengan una longitud de 7-8 cm;
 - 10 (d) Incubación de los brotes germinados después de hacer un corte vertical en el brote en el mismo medio MS en condiciones estériles durante 2-3 semanas para producir flores enteras con estigmas reales;

en donde dicha(s) incubación(es) se lleva(n) a cabo en la sala de incubación/cámara de crecimiento a una temperatura en el intervalo de 9-30°C a 11.7 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF bajo fotoperíodo de 16 horas y una humedad relativa de 50-90% seguido de un período de oscuridad de 8 h en dicho medio de cultivo MS que tiene sacarosa como fuente de carbono y reguladores de crecimiento de las plantas (PGR).
- 15 2. El procedimiento de floración *in vitro* continuo, independiente de la temporada según la reivindicación 1, en donde los PGR se seleccionan de 6-bencilaminopurina (BAP) o tidiazurón (TDZ).
3. El procedimiento de floración *in vitro* continuo, independiente de la temporada según la reivindicación 1, en donde los PGR están en el intervalo de 0.01 a 2 mg/l.
- 20 4. El procedimiento de floración *in vitro* continuo, independiente de la temporada según la reivindicación 1, en donde la sacarosa en el medio MS está en el intervalo de 2-3%.
5. El procedimiento de floración *in vitro* continuo, independiente de la temporada según la reivindicación 1, en donde el pH del medio MS está en el intervalo de 5.6-5.8.
- 25 6. El procedimiento de floración *in vitro* continuo, independiente de la temporada según la reivindicación 1, en donde el medio basal está en concentración completa o con los elementos principales (N, P, K, Mg, Ca, etc.) u opcionalmente en la mitad de la concentración (50%) y elementos secundarios (I, Na, Mn, Zn, Mo, Cu, Co, Fe, etc.) en concentración completa (100%) y con vitaminas de otro medio basal.
7. El procedimiento de floración *in vitro* continuo, independiente de la temporada según la reivindicación 1, en donde dicho medio MS opcionalmente comprende agar-agar del 0.5% al 0.7% cuando se usa en estado semisólido.
- 30 8. El procedimiento de floración *in vitro* continuo, independiente de la temporada según la reivindicación 1, en donde la temperatura de incubación es preferiblemente de 9-21°C.
9. El procedimiento de floración *in vitro* continuo, independiente de la temporada según la reivindicación 1, en donde la floración se produce más allá de octubre-noviembre hasta mayo.
10. El procedimiento de floración *in vitro* continuo, independiente de la temporada según la reivindicación 1, en donde el número de flores producidas por cormo está en el intervalo de, pero no limitado a 3-8.

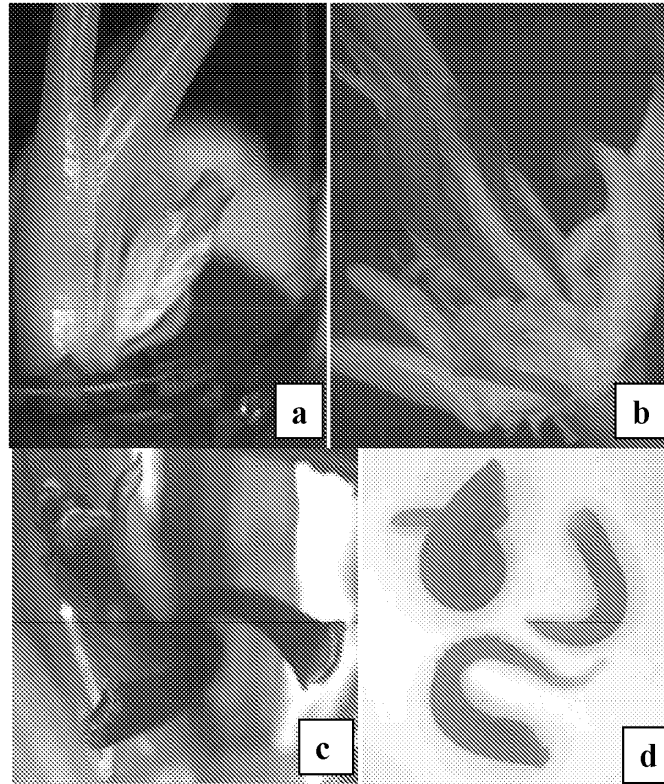


Fig 1

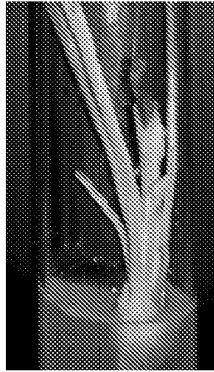


Fig 2

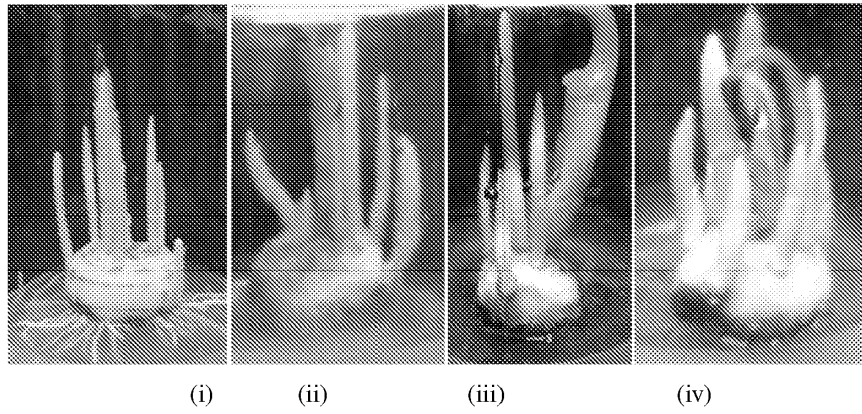


Fig 3

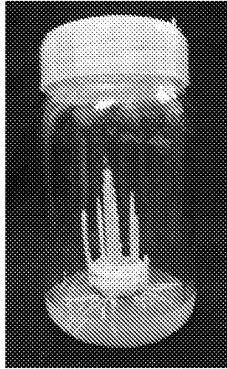


Fig 4

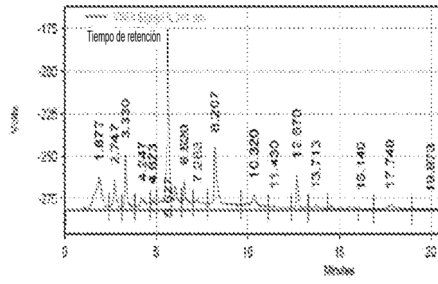


Fig 5(a)

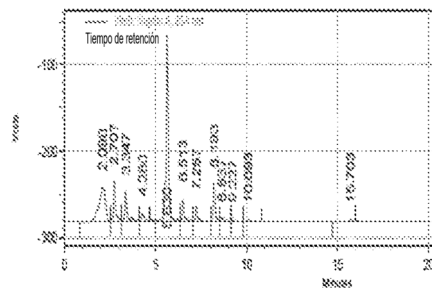


Fig 5(b)