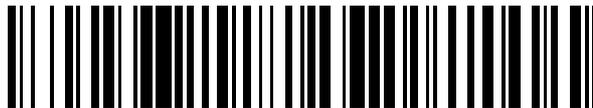


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 404 429**

21 Número de solicitud: 201130888

51 Int. Cl.:

A01H 4/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A2

22 Fecha de presentación:

30.05.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

27.05.2013

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)
C/ Serrano, 117
28006 Madrid ES**

72 Inventor/es:

**HERNÁNDEZ CORTÉS, José Antonio;
CLEMENTE MORENO, José María;
DÍAZ VIVANCOS, Pedro y
PIQUERAS CASTILLO, Abel**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

54 Título: **TRATAMIENTOS PARA INCREMENTAR EL VIGOR DE PLANTAS LEÑOSAS EN CONDICIONES IN VITRO Y SU MÉTODO DE APLICACIÓN**

57 Resumen:

Tratamientos para incrementar el vigor de plantas leñosas en condiciones in vitro y su método de aplicación.

La presente invención proporciona tratamientos eficaces, para aumentar el crecimiento de plantas leñosas (preferentemente melocotonero y ciruelo) en condiciones in vitro. La presente invención muestra como la adición de benzotiazol (BTH) o ácido L-2-oxo-4-tiazolidina carboxílico (OTC), a bajas concentraciones, al medio de cultivo para la micropropagación de dichas plantas, actúa promoviendo el crecimiento de los explantos de forma muy significativa.

En un aspecto particular la invención se refiere a un método de tratamiento para incrementar el vigor en plantas leñosas en condiciones in vitro que comprende los siguientes pasos, (i) establecimiento de cultivo de explantos in vitro de plantas leñosas, (ii) subcultivo de dichos explantos en medio y condiciones idóneas para el cultivo in vitro, (iii) adición al medio de cultivo a baja concentración de uno de los dos compuestos BTH u OTC respetuosos con el medio ambiente y metabolizables por las plantas y el (iv) subcultivo de los explantos en el medio que contiene los compuesto en condiciones idóneas para el cultivo in vitro.

ES 2 404 429 A2

DESCRIPCIÓN

Tratamientos para incrementar el vigor de plantas leñosas en condiciones *in vitro* y su método de aplicación.

SECTOR DE LA TÉCNICA

- 5 La presente invención se encuadra dentro del campo de la Agricultura. Es aplicable en empresas que se dediquen a la micropropagación de plantas leñosas así como a viveristas.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

10 Las técnicas de micropropagación *in vitro* son útiles para producir grandes cantidades de material propagado, y en muchos casos son la respuesta a los problemas que presentan los métodos tradicionales de propagación vegetativa. También suponen una técnica muy útil para el estudio de la fisiología del estrés, sobre todo en aquellas plantas con un ciclo vegetativo largo y crecimiento lento como las leñosas. La micropropagación de frutales (plantas leñosas) se ha venido utilizando desde los años 70 y es una excelente herramienta para estudiar el efecto de diferentes condiciones de estrés sobre el metabolismo de las mismas a más corto plazo que en condiciones de invernadero o de campo. En este sentido

15 constituyen una excelente alternativa para el estudio de respuestas a diferentes situaciones de estrés en programas de mejora genética, y la evaluación de resistencias a situaciones de estrés. Un problema significativo en estos programas de mejora vegetal es la complejidad del método analítico requerido, que combina la dificultad entre el desarrollo de las plantas en invernadero o en el campo y el espacio y tiempo consumidos así como el caro mantenimiento de las plantas.

20 La micropropagación es una técnica que proporciona plantas de características homogéneas y certificadamente sanas. La utilización de esta técnica se basa en la existencia de un método de regeneración *in vitro* de plantas completas, de su multiplicación y de su aclimatación o adaptación a condiciones exteriores. La disponibilidad de protocolos para la regeneración eficiente de plantas vigorosas con un buen crecimiento es un requisito clave para su desarrollo. Tanto para una eficiente multiplicación

25 como para asegurar una exitosa aclimatación de la plantas a condiciones *ex vitro* es necesario disponer de un cultivo estable y plántulas con un buen crecimiento y vigor. Sin embargo, y especialmente en frutales, el establecimiento y multiplicación de los cultivos *in vitro* puede plantear dificultades de crecimiento y elongación de brotes a partir de los explantos iniciales. Otro de los problemas cruciales en la micropropagación de leñosas es la pérdida de la capacidad de enraizamiento, siendo la aclimatación un aspecto clave en el proceso de micropropagación de frutales leñosos. En este sentido, cualquier

30 tratamiento que aumente el vigor del explanto va a proporcionar una mayor probabilidad de éxito para la aclimatación de plantas leñosas. Tal y como ha descrito Gonzalez-Padilla et al. (2003), la altura de los explantos y el número de hojas son factores determinantes para el éxito de la aclimatación *ex vitro* de plantas de ciruelo en invernadero, mientras que no parece ser tan determinante la longitud y el número de raíces.

35

Se han descrito varias estrategias para mejorar la elongación de los explantos. Una de ellas es la etiolación, es decir la exposición de los explantos a la ausencia de luz. Es un método eficaz pero si la incubación en oscuridad se prolonga podría causar la muerte de los explantos (Piqueras y Debergh 1999). Otra estrategia consiste en incubar los explantos ya establecidos en un medio en ausencia de hormonas

40 (Piqueras y Debergh 1999). También se ha utilizado el tiazurón (TDZ) que tiene un fuerte efecto en la proliferación de tallos en especies leñosas (Huetteman y Preece 1993). Sin embargo, TDZ puede estimular la inducción de callos y la organogénesis de los tallos, que eventualmente puede amenazar la uniformidad de las plantas micropropagadas generando variaciones somaclonales (Mok et al 1987). Otro método descrito para aumentar elongación de tallos *in vitro*, es la aplicación del sistema de doble capa.

45 Este método puede conseguir al mismo tiempo la elongación y enraizamiento de los explantos. Sin embargo, se trata de un sistema complejo y costoso (De Riek et al 1997). Más recientemente, Kalinina y Brown (2007) han empleado un medio de cultivo para la micropropagación de explantos de melocotonero GF305 en el que utilizaban fructosa y ácido ferúlico. De esta forma, se reducía la necrosis apical y mejoraba la elongación y la supervivencia de los explantos. Clemente-Moreno y colaboradores han

50 empleado un medio similar para la micropropagación de melocotonero GF305, y han descrito que ese efecto beneficioso en el crecimiento del melocotonero GF305, en relación a otros medios de cultivo usados, puede ser debido a que el ácido ferúlico es un inhibidor competitivo de la actividad peroxidada (POX) (Clemente-Moreno et al., 2011), así como a sus propiedades antioxidantes (Graf 1992). Las peroxidadas están relacionadas con la síntesis de ligninas y la lignificación es parte de la diferenciación de la pared celular e irreversiblemente inhibe la elongación celular (Pomar et al. 2002). En este sentido,

55 algunos autores han descrito una correlación negativa entre el aumento de la actividad peroxidasa (POX) y crecimiento (Fry 1979, Li and Kao 2001).

Por lo tanto actualmente no existen estrategias que permitan la elongación de plantas *in vitro* de forma eficaz, por ello, es necesario desarrollar nuevos métodos o aplicaciones para inducir vigor en los procesos

de micropropagación de plantas leñosas y para mejorar el proceso de aclimatación a condiciones *ex vitro*, que a su vez permita la obtención de plantas más resistentes a estreses ambientales.

El benzotriazol (BTH) es un análogo funcional del ácido salicílico. Las aplicaciones que se han descrito para este compuesto están relacionadas con la protección frente a infecciones por hongos (mildew, Görlach *et al.*, 1996), bacterias (*Pseudomonas syringae* Lawton *et al.*, 1996) o virus de plantas como el virus del mosaico del tabaco (TMV) (Friedrich *et al.*, 1996) o el virus del mosaico del calabacín (CMV) (Anfoka, 2000). Además se ha descrito una protección frente a estrés oxidativo inducido por tratamiento con herbicidas (Körzer *et al.*, 1999).

El ácido L-2-oxo-4-tiazolidina carboxílico (OTC) es un precursor artificial de la cisteína (Williamson and Meister, 1981), cuya aplicación produce un aumento en los niveles del tripéptido glutatión reducido (GSH). Las aplicaciones que se han descrito para este compuesto en plantas están relacionadas con protección frente a la infección por virus de plantas: tabaco frente al virus del mosaico del tabaco (Tobacco mosaic Virus TMV) (Gullner *et al.*, 1999); calabaza frente al virus del mosaico amarillo de la calabaza (Zucchini Moaci Virus ZYMV) (Zechmann *et al.*, 2007) o guisante frente a PPV (Clemente-Moreno *et al.*, 2010).

Sin embargo, no se han descrito otras aplicaciones de estos compuestos para el crecimiento de plantas en condiciones *in vitro*. No existe mucha información acerca del efecto de ambos productos en el crecimiento de plantas e incluso se ha descrito un efecto negativo de la aplicación del BTH en el crecimiento de algunas especies vegetales en condiciones de campo, invernadero o cámara de crecimiento. En plantas de guisante crecidas en medios hidropónicos se ha descrito una reducción del crecimiento de la parte aérea, con un tratamiento con BTH 0.25 mM mientras que con OTC 1 mM se ha descrito un aumento en un 10% (Clemente-Moreno *et al.* 2010). En plantas de tomate no se observaron cambios significativos en el crecimiento por efecto del BTH, mientras que en coliflor, el BTH reducía el crecimiento en un rango del 5.9% al 38.3% dependiendo de la concentración usada (Anfoka *et al.*, 2000; Godard *et al.*, (1999). Sin embargo, no existen datos acerca de la aplicación de BTH o de OTC en cultivos en condiciones *in vitro* ni tampoco sobre los posibles efectos de la fisiología y el crecimiento de plantas micropropagadas, particularmente en leñosas.

El objeto de la presente invención se centra en el desarrollo de aplicaciones para inducir vigor en los procesos de micropropagación de plantas leñosas y para mejorar el proceso de aclimatación a condiciones *ex vitro*, que a su vez permita la obtención de plantas más resistentes a estreses ambientales, las aplicaciones desarrolladas se basan en el uso del BTH o el OTC y su novedad radica en que nunca antes BTH u OTC se habían aplicado en el medio de cultivo, a baja concentración, para favorecer el crecimiento de plantas micropropagadas. En este sentido, cualquier tratamiento que aumente el vigor del explanto va a proporcionar una mayor probabilidad de éxito para la aclimatación de plantas leñosas, y en concreto de melocotonero GF305, planta usada de forma común como portainjertos y como indicadora de la infección por algunos tipos de virus, incluyendo Plum pox virus (PPV) y el Apple chlorotic leaf spot virus (ACSLV, virus de la mancha clorótica de la hoja de manzano) (Hernández *et al.* 2004; Diaz-Vivancos *et al.* 2006; García-Ibarra *et al.* 2011).

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Explicación de la Invención

La presente invención proporciona tratamientos eficaces, para aumentar el crecimiento de plantas leñosas (preferentemente melocotonero y ciruelo) en condiciones *in vitro*. La presente invención muestra como la adición de benzotriazol (BTH) o ácido L-2-oxo-4-tiazolidina carboxílico (OTC), a bajas concentraciones, al medio de cultivo para la micropropagación de dichas plantas, actúa promoviendo el crecimiento de los explantos de forma muy significativa.

En un aspecto particular la invención se refiere a un método de tratamiento para incrementar el vigor en plantas leñosas en condiciones *in vitro* que comprende los siguientes pasos, (i) establecimiento de cultivo de explantos *in vitro* de plantas leñosas, (ii) subcultivo de dichos explantos en medio y condiciones idóneas para el cultivo *in vitro*, (iii) adición al medio de cultivo a baja concentración de uno de los dos compuestos BTH u OTC respetuosos con el medio ambiente y metabolizables por las plantas y el (iv) subcultivo de los explantos en el medio que contiene los compuesto en condiciones idóneas para el cultivo *in vitro*.

Otro aspecto de la invención protege el método de tratamiento para incrementar el vigor en plantas leñosas en condiciones *in vitro* anteriormente descrito, caracterizado por que dicho establecimiento de cultivo de explantos *in vitro* de plantas leñosas (i) se puede realizar a partir de yemas preformadas de tallos jóvenes, o bien a partir de hipocotilos de semillas o bien a partir de cualquier otro tejido vegetal idóneo para el establecimiento de cultivo *in vitro* de plantas leñosas.

En la presente invención se entiende por "condiciones idóneas" o "tejido vegetal idóneo" para el cultivo *in vitro* de explantos de plantas leñosas, aquellas condiciones y tejidos conocidos en el estado de la técnica,

y que favorezcan el establecimiento de sistemas celulares en suspensión, con posibilidad de incrementar el rendimiento de los principios activos presentes en dichas plantas y controlar su producción, manteniendo un alto margen de sanidad y estabilidad genética del material propagado.

5 Otro aspecto de la invención protege el método de tratamiento para incrementar el vigor en plantas leñosas en condiciones *in vitro* anteriormente descrito, caracterizado por que dicho subcultivo de los explantos en medio y condiciones idóneas para el cultivo *in vitro* (ii) y/o (iv) se puede realizar durante un periodo mínimo de entre 4 a 5 semanas, siendo este intervalo no limitante.

10 Otro aspecto particular de la invención se refiere a que el tratamiento para incrementar el vigor en plantas leñosas en condiciones *in vitro* que incluye la adición al medio de cultivo de BTH a bajas concentraciones, dichas concentraciones se seleccionan preferentemente entre 1 y 100 μM , más preferentemente entre 1 y 35 μM , y aún más preferentemente entre 5 y 25 μM o entre 10 y 20 μM .

15 La invención en otro aspecto particular se refiere a que el tratamiento para incrementar el vigor en plantas leñosas en condiciones *in vitro* que incluye la adición al medio de cultivo de OTC a bajas concentraciones, dichas concentraciones se seleccionan preferentemente entre 2 y 100 μM , y aún más preferentemente entre 10 y 100 μM .

20 Los tratamientos de la invención no son contaminantes y son respetuosos con el medio ambiente. En la presente invención se entiende por “respetuosos con el medio ambiente” también llamado “respetuoso con la naturaleza” o “verde” aquellos compuestos que repercuten poco o nada en el medio ambiente, asegurando la compatibilidad entre el uso de dichos compuestos y la preservación de la biodiversidad y de los ecosistemas.

25 Además, se utiliza a una muy baja concentración. En la presente invención se entiende por “bajas concentraciones” de los dos compuestos BTH u OTC, a aquellas concentraciones de dichos compuestos que se encuentran como mínimo entre 1 y 100 μM , no siendo limitante este intervalo. En una realización particular, dichas concentraciones pueden ser: 5-10 μM BTH para melocotonero, 10-20 μM BTH para ciruelo; 50 μM OTC para melocotonero y 100 μM OTC para ciruelo.

30 Un aspecto interesante de esta invención es el bajo precio del BTH y la baja concentración a la que se usa. El OTC es un producto más caro, pero la baja concentración en la que se aplica no encarece mucho su uso. Además, se ha descrito que ambos productos aumentan la capacidad antioxidante de las plantas (aumento de enzimas antioxidantes, aumento de GSH, cisteína...) lo que las prepara para una posible respuesta frente a condiciones de estrés en condiciones tanto *in vitro* como *ex vitro*.

35 La aclimatación a condiciones *ex vitro* es en sí misma una condición estresante para las plantas. En la aclimatación las plantas sufren el paso de un ambiente estéril y con una alta humedad relativa a un ambiente más seco y con posibilidad de ataques patogénicos. Por ello cualquier tratamiento que incremente la capacidad de tolerancia a estreses de las plantas mejorara su adaptación a condiciones *ex vitro*.

En otro aspecto particular la invención se refiere al uso del método de tratamiento objeto de la presente invención para optimizar e incrementar el crecimiento y brotación de explantos de frutales de hueso, en un aspecto particular del género *Prunus* y en un aspecto más específico melocotonero o ciruelo.

40 Los datos disponibles en la bibliografía indican que el tratamiento con BTH o con OTC en condiciones de campo, en invernadero o en cámara de crecimiento, aumenta la resistencia a diferentes situaciones de estrés biótico. Sin embargo, este tipo de estudios no se han realizado en condiciones *in vitro*. Por ello, un aspecto interesante de la presente aplicación, además de obtener explantos con mayor vigor, es la posible mayor resistencia de los mismos a diferentes situaciones de estrés ambiental cuando éstos sean aclimatados a condiciones *ex vitro*.

45 Por lo tanto otro aspecto particular de la invención se refiere al uso del tratamiento para incrementar las defensas de los explantos de melocotonero a estreses bióticos y abióticos, mediante la inducción del gen *NPR1*, al aumento de la capacidad antioxidante de los explantos de melocotonero mediante su incremento en el estado redox del glutatión y a la optimización del crecimiento de los explantos *in vitro* para su posterior aclimatación a condiciones *ex vitro*.

50 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

55 La presente invención proporciona un tratamiento para estimular el crecimiento de plantas leñosas en condiciones *in vitro*, descrito en melocotonero y ciruelo. La invención se basa en la adición a muy baja concentración de dos compuestos químicos, metabolizables por las plantas y respetuosos con el medio ambiente, al medio de cultivo. Los tratamientos BTH u OTC, (de forma independiente) se adicionan al medio de micropropagación por filtración.

En primer lugar, se puso a punto un método para la micropropagación de plantas de melocotonero, a partir de yemas preformadas, y de ciruelo a partir de hipocótilos de semillas.

5 Adicionalmente los explantos de melocotonero GF305 utilizados procedían de plantas sanas y de plantas infectadas por PPV (Plum Pox Virus), virus causante de la enfermedad de la sharka. Este hecho nos permitió evaluar además del efecto de la aplicación de los tratamientos sobre el crecimiento de los brotes de melocotonero, el efecto de la infección y su interacción con los tratamientos respecto a la respuesta defensiva de las plantas.

10 El medio de cultivo, esterilizado en autoclave a 121 °C durante 20 minutos y atemperado, se vierte en tarros de cristal y se mantiene en agitación. La adición de los compuestos se realiza a las concentraciones deseadas, una vez vertido el medio y antes de su solidificación a partir de disoluciones madre 10 mM. Las disoluciones madre de OTC o de BTH se esterilizan mediante filtración por filtros de 45 µm estériles.

15 Los explantos de melocotonero (sano e infectado) y ciruelo se dejaron crecer en presencia y ausencia de BTH y/o OTC durante 4 semanas. Pasado este tiempo se evaluó el efecto de los tratamientos en cuando al crecimiento de los explantos y adicionalmente sobre la presencia viral en el material proveniente de melocotonero infectado. El crecimiento se determinó como el peso fresco por plántula y la presencia viral se confirmó mediante pruebas moleculares (ELISA) (Cambra et al 1994).

20 Los datos mostraron como tanto el tratamiento BTH como el de OTC, a determinadas concentraciones, incrementaron el crecimiento de los explantos de melocotonero, sobre todo la concentración 10 µM de BTH y el OTC 50 µM (Fig 1 y Fig 2).

25 De manera adicional, y para estudiar el efecto de los tratamientos sobre el metabolismo antioxidativo del melocotonero frente a la infección por PPV se realizaron una serie de ensayos. Se evaluó el efecto de los tratamientos con BTH y OTC sobre los niveles de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG). Se empleó un método de determinación de glutatión ya publicado (Zhang and Kirkham, 1996). Los resultados confirmaron los efectos positivos del OTC sobre los niveles de GSH y sobre su estado redox (Figura 3). Igualmente, el BTH aumentó la capacidad antioxidante de los explantos de melocotonero tal y como se recoge en la Figura 3.

30 Se analizó también el efecto de los tratamientos BTH y OTC a baja concentración sobre el contenido endógeno de H₂O₂ en los brotes de melocotonero (Bellicampi et al., 2000). Se emplearon sólo los tratamientos 10 µM BTH y 50 µM OTC, que eran los que mejor efecto sobre el crecimiento mostraron. En un trabajo previo se ha descrito la posible función del H₂O₂ en la regulación del crecimiento de plantas de guisante (Barba-Espín et al 2010). Este mismo efecto se observa en las plantas infectadas tratadas con BTH u OTC: Los explantos que más crecen presentan un mayor contenido de H₂O₂ (Figura 4). Así, los explantos infectados crecidos con 50 µM OTC presentaban un aumento de 1.7 veces de H₂O₂, mientras que en los explantos infectados tratados con 10 µM BTH el aumento era de cerca de 2.5 veces (Figura 4). Hay que mencionar que no se trata de unos niveles que sean muy dañinos. Igualmente, las plantas sanas tratadas con BTH u OTC, si bien las diferencias no eran significativas, también presentaban unos niveles de H₂O₂ un 20% mayor que los brotes no tratados (Figura 4). En este sentido, es conocido que las especies reactivas de oxígeno (ROS) tienen una función doble: a altas concentraciones son tóxicas, pero a concentraciones bajas (y controlables) producen efectos beneficiosos (Dat et al., 2000, Barba-Espín et al., 2010). De forma interesante, los explantos crecidos en presencia de 10 µM BTH, que eran los que más crecían, eran los que más H₂O₂ acumulaban y presentaron el mayor contenido viral. En este sentido, se ha demostrado que la replicación del virus PPV requiere que el huésped esté creciendo muy activamente (Martínez-Gómez et al 2000). El aumento en los contenidos de H₂O₂ era también evidente por técnicas de histoquímica mediante la tinción con diaminobenzidina (datos no mostrados).

45 Se valoró también el efecto de la aplicación de bajas concentraciones de BTH o de OTC sobre los niveles del antioxidante no enzimático GSH, en las actividades de las principales enzimas antioxidantes (Hernández et al., 2004; Clemente-Moreno et al., 2010). En general, se ha obtenido un aumento de los niveles de las actividades antioxidantes dependiendo del tratamiento usado. BTH incrementó de forma significativa las actividades deshidroascorbato deshidrogenasa (DHAR, 5 µM BTH), POX (5 y 10 µM BTH) y glucosa 6-P-deshidrogenasa (G6PDH, 10 µM BTH) (Figura 5A). Además, también aumentó de forma no significativa otras enzimas como monodeshidroascorbato deshidrogenasa (MDHAR), glutatión reductasa (GR), catalasa (CAT) y glutatión S-transferasa (GST) (Figura 5A). Por su parte, OTC aumentó ascorbato peroxidasa (APX, 10 µM OTC), POX (20 µM OTC) y superóxido dismutasa (SOD, 50 µM OTC) (Fig 5B). El aumento de estas enzimas mejoraría la respuesta de defensa de estas plántulas a condiciones de estrés, como podría ser el proceso de aclimatación a condiciones *ex vitro* o un ataque por patógenos.

Por último, se analizó el efecto de bajas concentraciones de BTH y OTC sobre la expresión del gen NPR1 mediante RT-PCR a tiempo real. El gen NPR1 es un regulador clave en la ruta de señalización que

conduce a la respuesta sistémica adquirida (SAR) (Kinkema et al., 2000). Habida cuenta que 10 µM BTH y 50 µM OTC producían la mayor respuesta en el crecimiento de los explantos de GF305, se analizó en dichos explantos el efecto de PPV así como de los tratamientos mencionados sobre la expresión de NPR1. La infección por PPV inducía la expresión de NPR1 tanto en muestras tratadas como no tratadas, siendo significativamente mayor el efecto del OTC que el del BTH. Sin embargo, en explantos sanos, sólo el tratamiento 50 µM OTC estimulaba de forma significativa la expresión de NPR1 (Fig. 6). Esto indica, en general, que tratamientos con OTC, a baja concentración, podrían favorecer una mejor respuesta de los explantos de melocotonero a situaciones tanto de estrés biótico como abiótico.

También se ensayó el efecto de la aplicación de bajas concentraciones de BTH o de OTC sobre el crecimiento de plantas de ciruelo en condiciones *in vitro*, comprobando que la adición al medio de cultivo de bajas concentraciones de OTC como de BTH tenía efectos beneficiosos en el crecimiento de los explantos de ciruelo (Fig 7, Tabla 1). Si analizamos los tratamientos uno por uno mediante un análisis tipo ANOVA, todos ellos aumentaban el crecimiento de los explantos de forma significativa, excepto el tratamiento 50 µM OTC. Si hacemos un análisis conjunto y aplicamos el Test de Duncan, 10 y 20 µM de BTH y 100 µM de OTC aumentaban de forma significativa el crecimiento de los explantos de ciruelo.

Tabla 1. Efecto de BTH y OTC sobre el crecimiento de explantos de ciruelo. En la parte inferior se muestra el análisis ANOVA realizado comparando el control con cada tratamiento por separado.

	Control	BTH 10 µM	BTH 20 µM	OTC 50 µM	OTC 100 µM
Peso fresco g/explanto	0.308	0.399	0.477	0.374	0.404

Valor de F		9,668	28,369	3,328	5,775
Significación		0.02	<0.001	0.071	0.018

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DEL CONTENIDO DE LAS FIGURAS

Figura 1: Gráfico de barras donde se muestra el efecto de diferentes concentraciones de BTH o de OTC sobre el crecimiento de los explantos de melocotonero GF305 en condiciones *in vitro*. En el eje de abscisas se representan los tratamientos aplicados (BTH 10 µM, BTH 20 µM; OTC 10 µM, OTC 20 µM, OTC 50 µM) y en el eje de ordenadas se representa el crecimiento (en gramos peso fresco) de los explantos tras 4 semanas de cultivo. Letras diferentes implican diferencias significativas según el Test de Duncan.

Figura 2: Fotografía, a modo de ejemplo, de explantos de GF305 crecidos en ausencia (control) o en presencia de la adición de BTH (5 µM ó 10 µM) o de OTC (10 20 ó 50 µM).

Figura 3. Gráfico de barras donde se muestra el efecto de bajas concentraciones de los diferentes tratamientos (BTH o OTC) sobre el estado rédox del glutatión. En el eje de abscisas se representan los tratamientos aplicados (BTH 5 µM, BTH 10 µM; OTC 10 µM, OTC 20 µM, OTC 50 µM) en explantos sanos e infectados y en el eje de ordenadas se representa el estado rédox del glutatión, que se calcula mediante la ecuación: GSH/(GSH+GSSG).

Figura 4. Gráfico de barras donde se muestra el efecto de bajas concentraciones de los diferentes tratamientos (BTH u OTC) sobre los niveles de H₂O₂. En el eje de abscisas se representan los tratamientos aplicados (BTH 10 µM; OTC 50 µM) y en el eje de ordenadas se representa el contenido de H₂O₂ en nmoles por gramo de peso fresco. Letras diferentes implican diferencias significativas según el Test de Duncan.

Figura 5. Gráfico de barras donde se muestra el efecto de bajas concentraciones de BTH (A) u OTC (B) sobre la actividad de las principales enzimas antioxidantes. En el eje de abscisas se representan los tratamientos aplicados (5-10 µM BTH; 10-50; 10-50µM OTC) y en el eje de ordenadas se representa los porcentajes de actividad enzimática con respecto al control.

Figura 6: Efecto de 10 μM BTH y 50 μM OTC en la expresión del gen NPR1 de de melocotonero GF305 *in vitro*.

5 **Figura 7:** Gráfico de barras donde se muestra el efecto de bajas concentraciones de BTH y OTC sobre el crecimiento de plántulas de ciruelo en condiciones *in vitro*. En el eje de abcisas se representan los tratamientos aplicados (BTH 10 μM , BTH 20 μM ; OTC 50 μM , OTC 100 μM) y en el eje de ordenadas se representa el crecimiento (en gramos peso fresco) de las plántulas tras 4 semanas de cultivo. Debajo del eje de abcisas se muestra una foto de las plántulas de ciruelo donde se observa el efecto de los tratamientos en el crecimiento de los mismos. Letras diferentes implican diferencias significativas según el Test de Duncan.

10 **Figura 8:** (A) Efecto del BTH (37.5 y 75 μM) en el crecimiento de las plántulas de GF305 tras 4 semanas de cultivo. (B) Necrosis producida por efecto de 500 μM BTH después de 2 semanas de cultivo.

EJEMPLOS

15 A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores. Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos no pretenden limitar el campo de aplicación de la misma.

Ejemplo 1.

20 **Establecimiento y Micropropagación del cultivo de plantas *in vitro* de melocotonero GF305 y de ciruelo:**

25 Para el establecimiento del cultivo se utilizaron yemas preformadas procedentes de tallos jóvenes de plantas de melocotonero sanas e infectadas por PPV (Plum pox virus) crecidas en un invernadero. Después de eliminar las hojas y los tallos, se trocearon y se esterilizaron por lavado con Domestos^R 15% durante 20 minutos y con etanol al 70% durante 2 minutos, seguido de 5 lavados con agua destilada estéril. Secciones de tallos, conteniendo una yema lateral, se incubaron en un medio de cultivo (Tabla 2) (Clemente-Moreno et al., 2011). Los explantos de ciruelo se obtuvieron a partir de hipocotilos de semillas de ciruelo (*Prunus dolci* cv. Stanley) germinadas en condiciones *in vitro*.

Una vez establecido el cultivo, los explantos se subcultivaron cada 4-5 semanas.

Tabla 2.- Composición del medio de multiplicación utilizado para el melocotonero GF305.

Componentes	Medio Multiplicación (g L ⁻¹)
QL	3.278
Vitaminas MS	0,103
KH ₂ PO ₄	0,2
MES	0,2
Sequestrene	0,01
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	0,3
Fructosa	15
^a Acido ferúlico (FA)	1
^a Bencil Aminopurina (BA)	1
^a ácido Indo Butírico (IBA)	0.01
Agar	9

30 ^aLos datos para el FA, BA e IBA están expresados en mg/l

Ejemplo 2

Selección de las concentraciones de BTH y de OTC en los tratamientos frente a PPV

Para analizar el efecto del BTH y del OTC sobre la presencia o ausencia del virus PPV, se procedió a seleccionar diferentes concentraciones de los compuestos mencionados. Inicialmente se ensayaron concentraciones de BTH en un rango de 35 a 500 μM . Los datos mostraron que niveles de 37,5 y 75 μM producían una necrosis apical en hojas después de 4 semanas de cultivo (Figura 8A). Concentraciones mayores de BTH provocaban la muerte de los explantos. Por ejemplo, 500 μM de BTH producía un descenso en el crecimiento así como necrosis en hojas después de dos semanas de cultivo (Figura 8B) Posteriormente, se ensayaron concentraciones mucho más bajas (5 y 10 μM) y comprobamos cómo había un mayor crecimiento que en las plantas control (ver datos en Figura 1 y Figura 2).

Respecto al OTC, inicialmente ensayamos concentraciones en el rango 0,1-2 mM, en base a datos previos observados en nuestro laboratorio con plantas de guisante (Clemente-Moreno et al 2010). Comprobamos que estos niveles de OTC no mejoraban el vigor de los explantos. Por ello decidimos disminuir la concentración de OTC hasta 10, 20 y 50 μM . Observamos un efecto positivo en el crecimiento de los explantos de GF305, sobre todo con la concentración 50 μM de OTC (Figura 2).

Ejemplo 3

Aplicación de los tratamientos seleccionados a los explantos de melocotonero GF305 sanos e infectados por PPV.

Una vez preparado y esterilizado el medio de cultivo, se deja enfriar antes de solidificar y se le adiciona, por filtración con un filtro de 0.45 μm , las diferentes concentraciones de los tratamientos a partir de una disolución madre de BTH o de OTC 10 mM. Estas disoluciones madre se preparan en agua destilada y se les ajusta el pH a 6,0 con NaOH 1 M.

La cantidad a adicionar a cada tarro (100 ml) se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Cantidades de BTH o de OTC tomadas para la preparación de 100 ml de medio de cultivo a partir de las disoluciones madre de concentración 10 mM.

BTH 10 mM	Concentración Final
5 μl	5 μM
10 μl	10 μM

OTC 10 mM	Concentración Final
10 μl	10 μM
20 μl	20 μM
50 μl	50 μM
100 μl	100 μM

Una vez preparado y solidificados los medios de cultivo, con sus respectivos tratamientos, se procedió al subcultivo de los explantos de GF305 sanos e infectados. Después de 4 semanas de cultivo de los explantos, se analizó el efecto de los tratamientos en el crecimiento de las plántulas obtenidas. Los datos mostraron que el tratamiento BTH 10 mM obtenía el mejor resultado sobre el crecimiento de los explantos. En plántulas sanas, el aumento obtenido era de un 64% mayor que el de las plántulas control. En plántulas infectadas, el aumento era mayor (130%). Se obtuvo también un buen dato con el uso de OTC 50 μM , pero las diferencias eran significativas sólo en plántulas infectadas (44%). En plántulas sanas, aunque las diferencias observadas no fueron significativas, el crecimiento aumentó en un 15% (Figura 1).

El aumento en el crecimiento es un factor muy importante para los experimentos de enraizamiento y aclimatación a condiciones *ex vitro* tal y como ha descrito Gonzalez-Padilla et al (2003) en ciruelo.

Estos datos, demuestran que los tratamientos a baja concentración de BTH y de OTC mejoran el vigor y el crecimiento de especies leñosas (melocotonero y ciruelo) micropropagadas, y puede ser un factor muy importante en el éxito de los procesos de aclimatación a condiciones *ex vitro*, con el consiguiente ahorro económico y de tiempo.

BIBLIOGRAFÍA

- Anfoka, G.H. (2000) Benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester induces systemic resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum*. Mill cv.Vollendung) to *Cucumber mosaic virus*. Crop Protection 19, 401-405.
- 5 Barba-Espin G, Diaz-Vivancos P, Clemente-Moreno MJ., Albacete A., Faize L., Faize M., Pérez-Alfocea F, Hernández J.A. (2010) Interaction between hydrogen peroxide and plant hormones during germination and the early growth of pea seedlings. Plant Cell Environment 33: 981-994.
- Bellicampi, D., Dipierro, N., Salvi, G., Cervone, F. and De Lorenzo, G. (2000) Extracellular H₂O₂ induced by oligogalacturonides is not involved in the inhibition of the auxin-regulated rolB gene expression in tobacco leaf explants. Plant Physiology 122, 1379-1385.
- 10 Cambra, M., Asensio, M., Gorris, M.T., Camarasa, E., Garcia, J.A., García, J.A., Moya, J.J., López-Abella, D., Vela, C. and Sanz, A. (1994) Detection of Plum pox virus using monoclonal antibodies to structural and non-structural proteins. Bulletin EPPO 24, 569-578.
- Clemente-Moreno MJ, Piqueras A, Hernandez JA (2011) Maintenance of Sharka virus PPV (Plum Pox Virus) in micropropagated GF305 peach plants: Implication of peroxidase activity in development J. Plant Growth Regul. (en revisión).
- Clemente-Moreno MJ; Diaz-Vivancos, P; Barba-Espin G, Hernández JA (2010) Benzothiadiazole and L-2-oxothiazolidine-4-carboxylic acid reduced the severity of Sharka symptoms in pea leaves: effect on the antioxidative metabolism at subcellular level. Plant Biology 12: 88-97.
- 20 Dat J., Vandenbeebe S., Vranova E., Van Montagu M., Inzé D. & Van Breusegem F. (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress response. Cellular and Molecular Life Sciences 57, 779-795.
- De Riek J, Piqueras A, Debergh PC (1997) Sucrose uptake metabolism in a double layer system for micropropagation of *Rosa multiflora*. Plant Cell Tissue Organ Cult. 47: 269-278.
- Díaz-Vivancos P; Rubio M; Mesonero V; Periago PM; Ros Barceló A; Martínez-Gómez P; Hernández JA (2006) The apoplastic antioxidant system in *Prunus*: Response to plum pox virus. J Exp Bot 57: 3813-3824.
- 25 Fay MF (1994). In what situations is *in vitro* culture appropriate to plant conservation? Biodivers Conserv 3, 176-183 (1994)
- Friedrich, L., Lawton, K., Ruess, W., Masner, P., Specker, N., Rella, M.G., Meier, B., Dincher, S., Staub, T., Uknes, S., Metraux, J.P., Kessmann, H., and Ryals, J. (1996) A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. The Plant Journal 10, 61-70.
- 30 García-Ibarra A; Clemente-MorenoMJ; Barba-Espín G; Díaz-Vivancos P; Rubio M; Dicenta F; Martínez-Gómez P; Hernández JA (2011). Changes in the antioxidative metabolism induced by Apple chlorotic leaf spot virus infection in peach [*Prunus persica* (L.) Basch]. Environ Exp Bot 70: 277-282.
- 35 Gonzalez Padilla IM, Webb K, Scorza R (2003) Early antibiotic selection and efficient rooting and acclimatization improve the production of transgenic plum plants (*Prunus domestica* L.) Plant Cell Rep 22:38-45.
- Görlach, J., Volrath, S., Knauf-Beiter, G., Hengy, G., Beckhove, U., Kogel, K.-H., Oostendorp, M., Staub, T., Ward, E., Kessmann, H., and Ryals, J. (1996) Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. Plant Cell, 8, 629-643.
- 40 Graf E (1992) Antioxidant potential of ferulic acid. Free Rad Biol Med. 13:435-448.
- Gullner, G., Tóbiás, I., Fodor, J., and Kömives, T. (1999) Elevation of glutathione level and activation of glutathione-related enzymes affect virus infection in tobacco. Free Radical Research 31, S155-161.
- 45 Hernández JA, Rubio M, Olmos E, Ros-Barceló A, Martínez-Gómez P (2004) Oxidative stress induced by long-term plum pox virus infection in peach (*Prunus persica*). Physiol Plant 122:486-495
- Huetteman CA, Preece JE (1993) Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. Plant Cell Tissue Organ Cult. 33: 105-119.
- Kalinina A, Brown DCW (2007) Microprotagation of ornamental *Prunus* spp. And GF305 peach, a *Prunus* viral indicator. Plant Cell Rep 26: 927-935

- Körzer, O.C., Lederer, B., Durner, J., and Böger, P. (1999) Antioxidative defense activation in soybean cells. *Physiologia Plantarum* 107, 294-302.
- 5 Lawton, K. A., Friedrich, L., Hunt, M., Weymann, K., Delaney, T., Kessmann, H., Staub, T., and Ryals, J. (1996) Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. *The Plant Journal* 10, 71-82.
- Li CC, Kao CH (2001) Cell wall peroxidase against ferulic acid, lignin, and NaCl-induced root growth of rice seedlings. *J Plant Physiol* 158: 667-671.
- Martínez-Gómez P; Dicenta F (2000a) Evaluation of resistance of apricot cultivars to a Spanish isolate of plum pox potyvirus (PPV). *Plant Breeding* 119: 179-181
- 10 Mok MC, Mok DWS, Turner JE, Mujar CV (1987) Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenylurea derivatives in tissue culture systems. *HortScience* 22: 1509-15011.
- Piqueras A, Debergh C (1999) Morphogenesis in micropropagation. En: *Morphogenesis in Plant Tissue Cultures* (Soh WY, Bhojwani SS, eds.), Kluwer Acad Pub., Dordrech, The Nederland, pp.443-462.
- 15 Pomar F; Caballero N; Pedreño MA; Ros Barceló A. (2002) H₂O₂ generation during the auto-oxidation of coniferyl alcohol drives the oxidase activity of a highly conserved class III peroxidase involved in lignin biosynthesis. *FEBS Lett.* 529: 198-202.
- Williamson, J.M., and Meister, A. (1981) Stimulation of hepatic glutathione formation by administration of L-2-oxothiazolidine-4-carboxylate, a 5-oxo-L-prolinase substrate. *Proceeding of the National Academy of Sciences, USA* 78, 936-939.
- 20 Zechmann, B., Zellnig, G., Urbanek-Krajnc, A., and Müller M. (2007) Artificial elevation of glutathione affects symptom development in ZYMV-infected *Cucurbita pepo* L. plants. *Archives of Virology* 157, 747-762.
- Zhang, J., Kirkham, M.B (1996) Antioxidant responses to drought in sunflower and sorghum seedlings. *New Phytologist* 132,361-373

REIVINDICACIONES

1. Un método de tratamiento para incrementar el vigor en plantas leñosas en condiciones *in vitro* que comprende los siguientes pasos,
 - (i) establecimiento de cultivo de explantos *in vitro* de plantas leñosas,
 - 5 (ii) subcultivo de los explantos en medio y condiciones idóneas para el cultivo *in vitro*,
 - (iii) adición al medio de cultivo a baja concentración de uno de los dos compuestos BTH u OTC respetuosos con el medio ambiente y metabolizables por las plantas,
 - (iv) subcultivo de los explantos en el medio que contiene el compuesto en condiciones idóneas para el cultivo *in vitro*.
- 10 2. El método de tratamiento para incrementar el vigor en plantas leñosas en condiciones *in vitro* según la reivindicación 1, caracterizado por que dicho establecimiento de cultivo de explantos *in vitro* de plantas leñosas (i) se realiza a partir de yemas preformadas de tallos jóvenes, a partir de hipocotilos de semillas o a partir de cualquier otro tejido vegetal idóneo para el establecimiento de cultivo *in vitro* de plantas leñosas.
- 15 3. El método de tratamiento para incrementar el vigor en plantas leñosas en condiciones *in vitro* según la reivindicación 1, caracterizado por que dicho subcultivo de los explantos en medio y condiciones idóneas para el cultivo *in vitro* (ii) se realiza durante un periodo entre 4 y 5 semanas.
- 20 4. El método de tratamiento para incrementar el vigor en plantas leñosas en condiciones *in vitro* según la reivindicación 1, caracterizado por que dicha adición al medio de cultivo a baja concentración de uno de los dos compuestos BTH u OTC respetuosos con el medio ambiente y metabolizables por las plantas se realiza mediante adición al medio de cultivo de BTH a concentraciones entre 1 y 35 μM .
5. El método de tratamiento para incrementar el vigor en plantas leñosas en condiciones *in vitro* según la reivindicación 4, caracterizado por que dicha adición al medio de cultivo de BTH se realiza a concentraciones entre 5 y 25 μM .
- 25 6. El método de tratamiento para incrementar el vigor en plantas leñosas en condiciones *in vitro* según la reivindicación 5, caracterizado por que dicha adición al medio de cultivo de BTH se realiza a una concentración entre 10 y 20 μM .
7. El método de tratamiento para incrementar el vigor en plantas leñosas en condiciones *in vitro* según la reivindicación 1, caracterizado por que dicha adición al medio de cultivo a baja concentración de uno de los dos compuestos BTH u OTC respetuosos con el medio ambiente y metabolizables por las plantas se realiza mediante adición al medio de cultivo de OTC a concentraciones entre 2 y 100 μM .
- 30 8. El método de tratamiento para incrementar el vigor en plantas leñosas en condiciones *in vitro* según la reivindicación 7, caracterizado por que dicha adición al medio de cultivo de OTC se realiza a concentraciones entre 10 y 100 μM .
- 35 9. El método de tratamiento para incrementar el vigor en plantas leñosas en condiciones *in vitro* según la reivindicación 1, caracterizado por que dicho subcultivo de los explantos en el medio que contiene los compuestos en condiciones idóneas para el cultivo *in vitro* (iv) se realiza durante un periodo de 4 a 5 semanas.
- 40 10. El método de tratamiento para incrementar el vigor en plantas leñosas en condiciones *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado por que se aplica para optimizar e incrementar el crecimiento y brotación de explantos de frutales de hueso.
11. El método de tratamiento para incrementar el vigor en plantas leñosas en condiciones *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado por que se aplica para optimizar e incrementar el crecimiento y brotación de explantos de frutales del género *Prunus*.
- 45 12. El método de tratamiento para incrementar el vigor en plantas leñosas en condiciones *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado por que se aplica para optimizar e incrementar el crecimiento y brotación de explantos de melocotonero.
13. El método de tratamiento para incrementar el vigor en plantas leñosas en condiciones *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado por que se aplica para optimizar e incrementar el crecimiento y brotación de explantos de frutales de ciruelo.
- 50

14. El método de tratamiento para incrementar el vigor en plantas leñosas en condiciones *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque se incrementan las defensas de los explantos de melocotonero a estreses bióticos y abióticos, mediante la inducción de la SEQ ID No: 1.
- 5 15. El método de tratamiento para incrementar el vigor en plantas leñosas en condiciones *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque se aumenta la capacidad antioxidante de los explantos de melocotonero mediante su incremento en el estado redox del glutatión.
16. El método de tratamiento para incrementar el vigor en plantas leñosas en condiciones *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque se obtiene una optimización del crecimiento de los explantos *in vitro* para su posterior aclimatación a condiciones *ex vitro*.

10

FIGURA 1

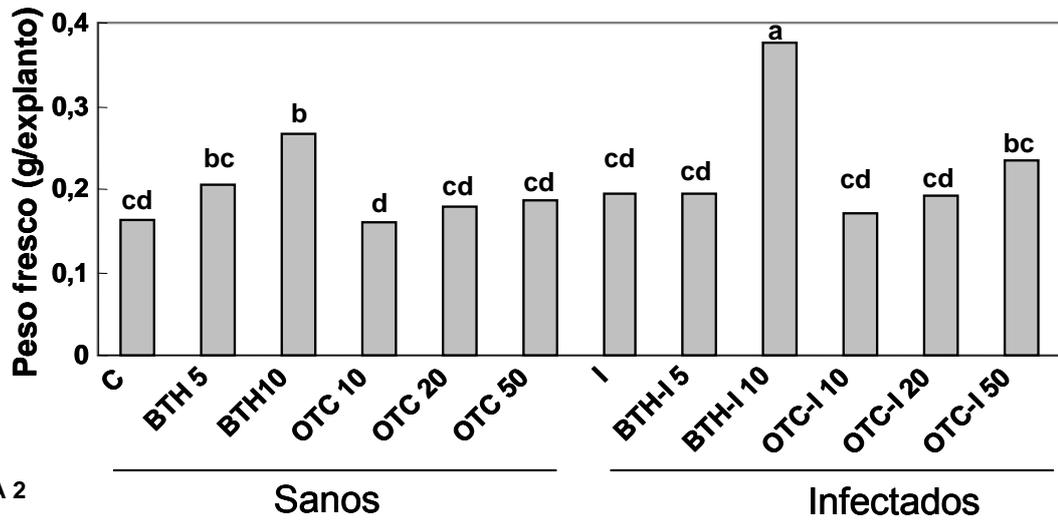
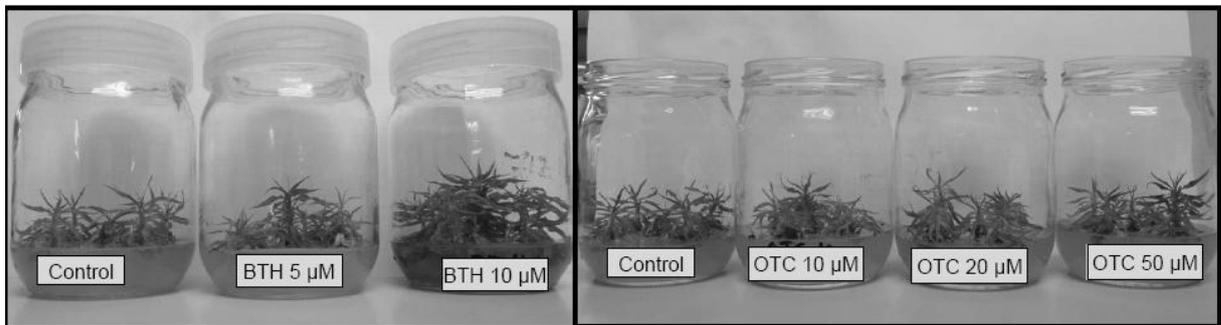
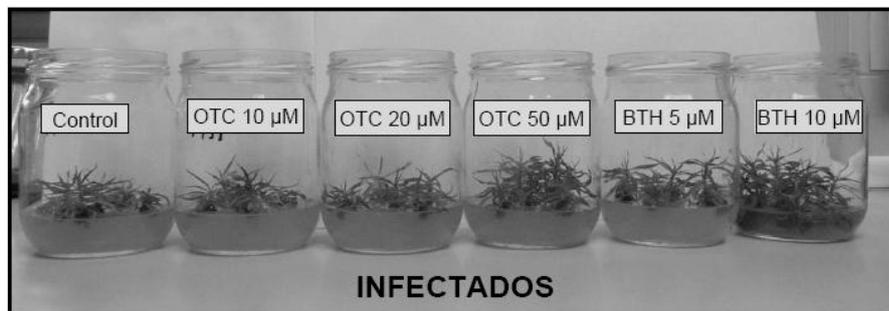


FIGURA 2



SANOS



INFECTADOS

FIGURA 3

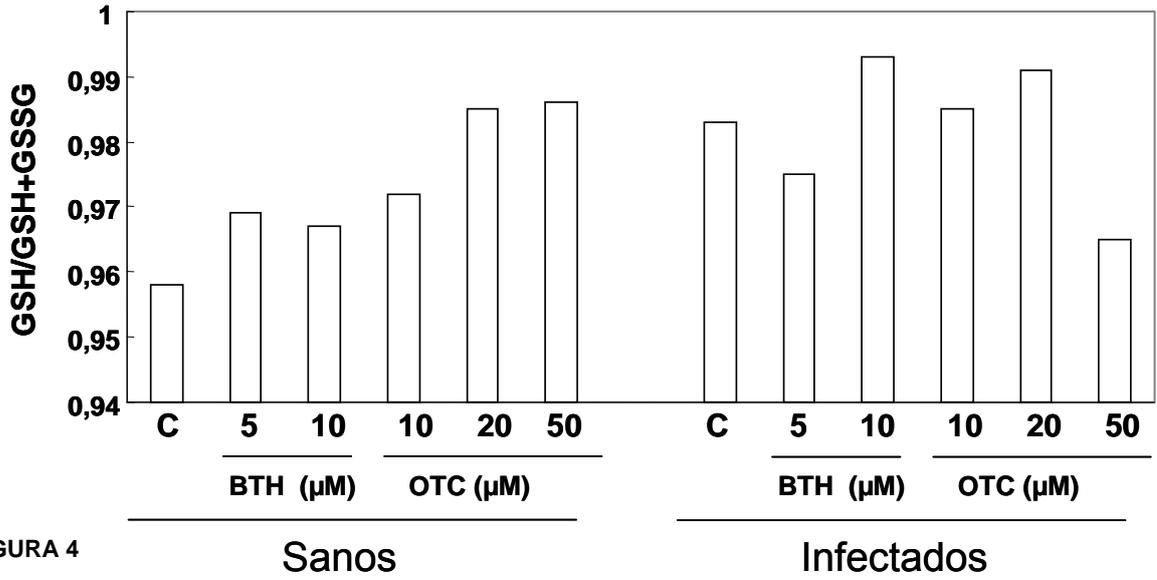


FIGURA 4

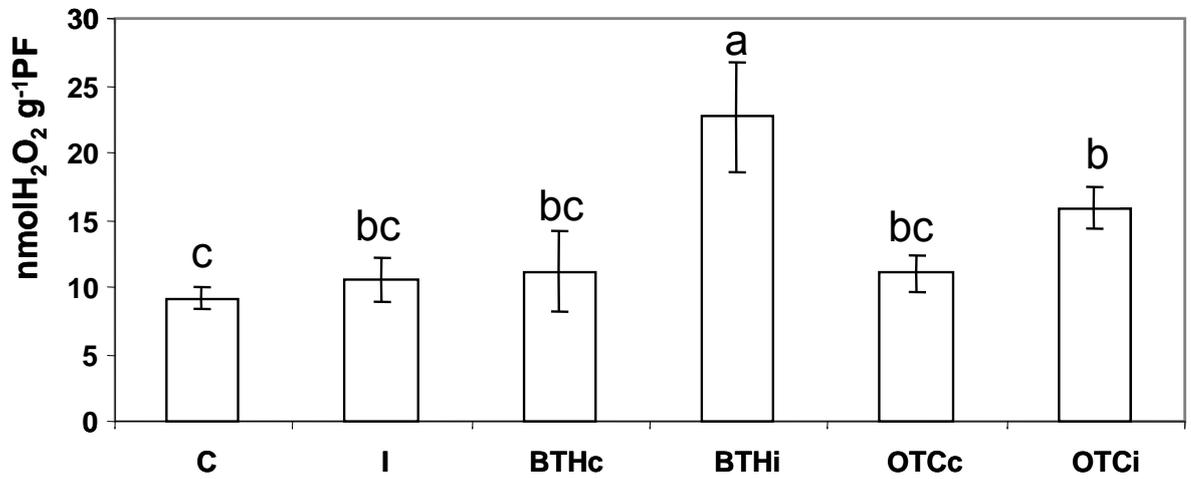


FIGURA 5

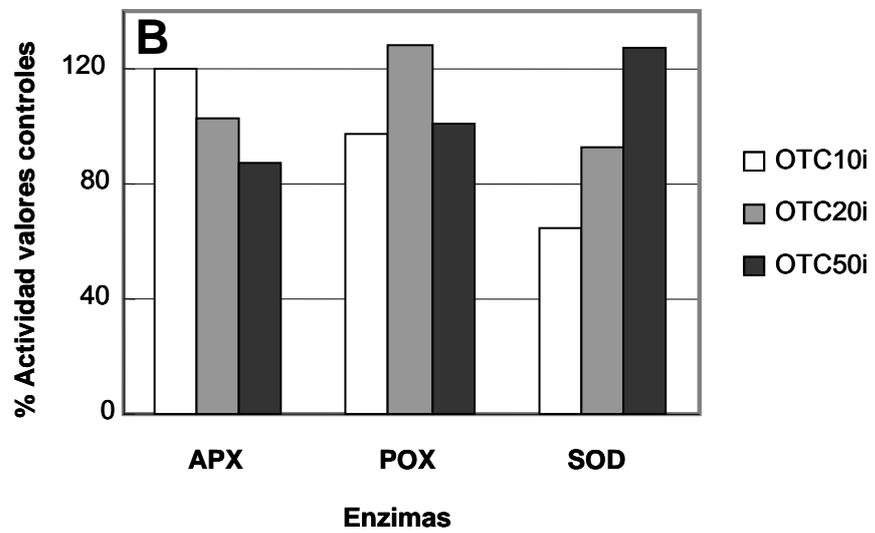
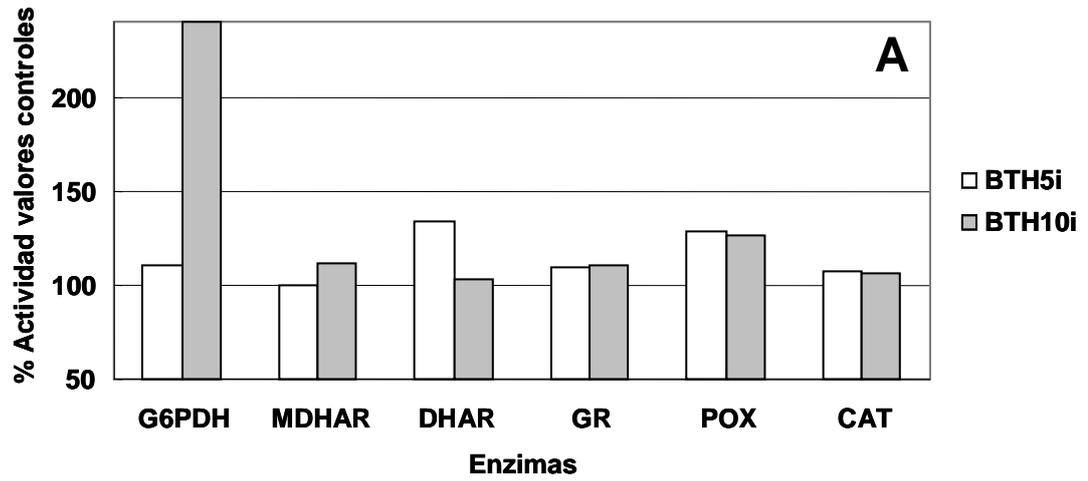


FIGURA 6

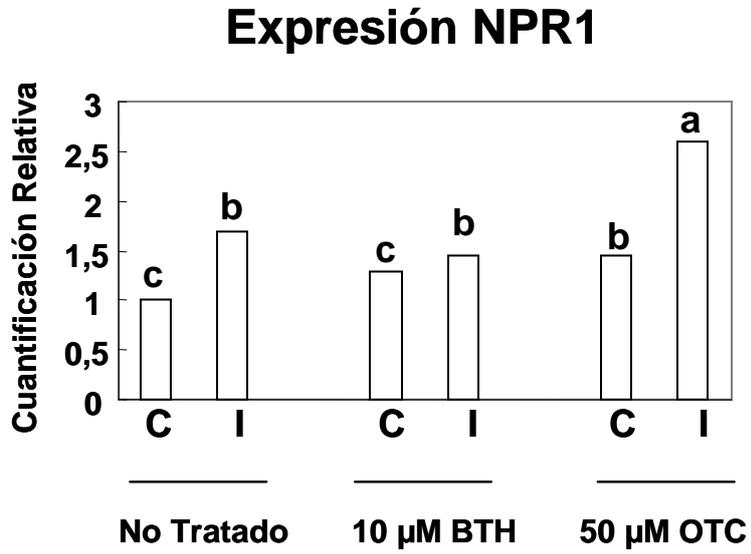


FIGURA 7

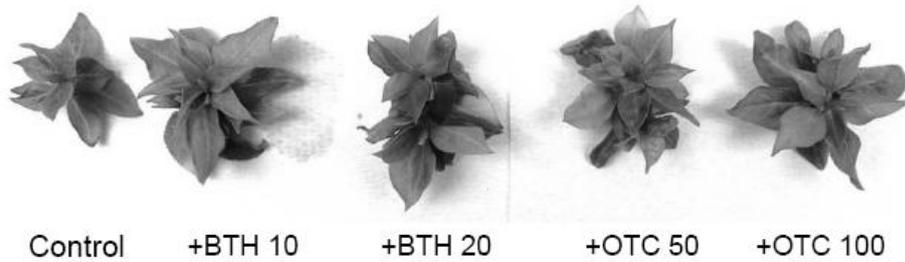
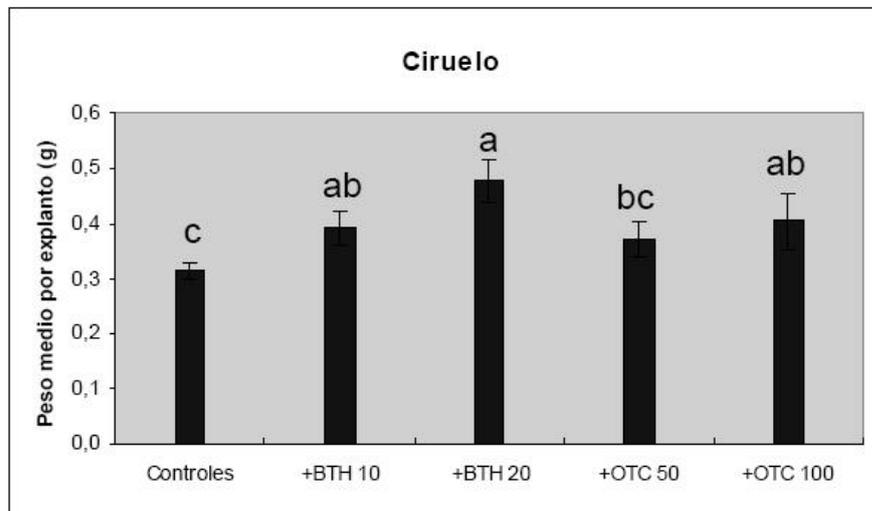
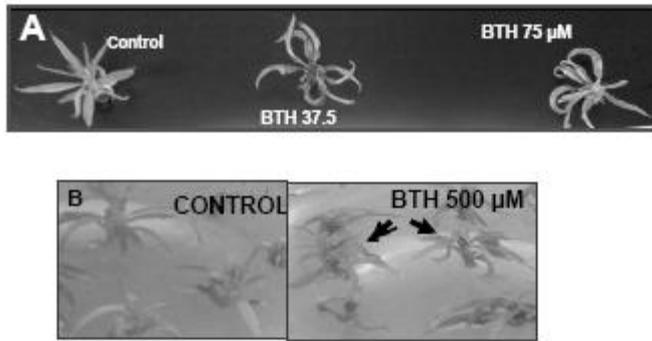


FIGURA 8



Lista de Secuencias

```

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
<120> TRATAMIENTOS PARA INCREMENTAR EL VIGOR DE PLANTAS LENOSAS EN CONDICIONES
IN VITRO Y SU METODO DE APLICACION
<130> P201130888 CSIC
<160> 1
<170> BiSSAP 1.0
<210> 1
<211> 472
<212> RNA
<213> Prunus persica
<220>
<221> source
<222> 1..472
<223> /mol_type="mRNA"
      /note="Prunus persica clone pp-2 NPR1-like protein (NPR1-like) mR
      NA, partial cds"
      /organism="Prunus persica"
<400> 1
ggauuuugau agcaucucuc uugagaagga acuuccugau gagguuuuug agaaaauuuaa    60
aauuuuucgc cgcauuucuc agcaagacug ugacccaaac augccagcag uggacccuuu    120
gcaugaaaag agaaucagga gaaucacaaa ggcauuggac ucagaugaug uugaacuggu    180
gaaacuucuu uuaagugagu cugcuuaaac cuuagaugaa gccaaugcuc uccaauaugc    240
ugcggcuuac ugcgauccua agguugugac ugaagugcuu ggucuggguc uagcugaugu    300
uaaccuccgg aauucucggg guuacacagu acuuacacauu gcugugaugc gcaaagagcc    360
aucauuuaua guauugcuuc ugacuaaagg agcucgugca ucagagcuga caucagaugg    420
ucagagugcu guuaguauuu gccggagguu gacaaggccg aaggauuauc au          472

```