



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 349 102**

② Número de solicitud: 200803544

⑤ Int. Cl.:
A01H 4/00 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **15.12.2008**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **28.12.2010**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
28.12.2010

⑰ Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES

⑱ Inventor/es: **Caro Pérez, Encarnación;**
Westendorp Figuerola, Nieves;
Vidoy Mercado, Isabel;
López Encina, Carlos;
Carmona Martín, Elisabeth;
Barceló Muñoz, Araceli y
González Padilla, Isabel María

⑳ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑳ Título: **Procedimiento para la propagación *in vitro* del espárrago.**

㉑ Resumen:

Procedimiento para la propagación *in vitro* del espárrago. Procedimiento de propagación de espárrago (del género *Asparagus*) mediante técnicas de cultivo de tejidos vegetales.

Se describe un procedimiento de propagación *in vitro* del espárrago enfocado hacia el acortamiento del proceso de micropropagación conforme y hacia la obtención de un método eficaz y consistente, que nos permita obtener unos altos porcentajes de éxito en la clonación para una mayoría de genotipos, y reducir el tiempo necesario para la obtención de copias clonales de genotipos agrónomicamente interesantes.

El procedimiento de propagación *in vitro* del espárrago objeto de la presente invención consiste en el cultivo y desarrollo de estructuras gemantes ya preexistentes en el rizoma, cultivándose yemas axilares que ofrecen por ello una mejor garantía de estabilidad somacional, asimismo las raíces se forman a partir de un tejido de parénquima que se conserva en la parte basal de la zona gemante del rizoma que se utiliza como explanto. El procedimiento objeto de la presente invención, probado en genotipos muy diferentes incluyendo incluso una especie silvestre de espárrago *A. maritimus*, una variedad población ("Morado de Huétor") y varios cultivares de *Asparagus officinalis* ("UC-157", "Baitoru", y "Atlas") funciona bien en todos los genotipos evaluados y alcanza además unos rendimientos de enraizado bastante altos en todos los genotipos ensayados y en un periodo de tiempo bastante corto, obteniéndose plántulas de 3-4 semanas y en 6-8 semanas

plantas de calidad y características idóneas para su trasplante y aclimatación, con un elevado rendimiento en la recuperación de plántulas de calidad al final del proceso de micropropagación.

ES 2 349 102 A1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la propagación *in vitro* del espárrago.

5 **Sector de la técnica**

Agricultura.

10 Sector viverista: Procedimiento de propagación de espárrago (del género *Asparagus*) mediante técnicas de cultivo de tejidos vegetales.

Estado de la técnica

15 El espárrago cultivado (*Asparagus officinalis* L.) es una especie monocotiledónea perteneciente a la familia de las *Liliaceas*, originaria del próximo oriente y desde hace al menos dos mil años cultivada como alimento y como planta medicinal. La especie es diploide (n=10), perenne y dioica, y por tanto de fecundación alógama.

20 A nivel mundial, el cultivo del espárrago es de gran importancia económica siendo su superficie cultivada similar al de otras hortalizas como ajo, pimiento, zanahoria o berenjena. La producción mundial de espárrago es de 6.657.000 tm siendo China el mayor productor con 5.906.000 tm seguido de Perú con 206.000 tm. España es el sexto mayor productor de espárrago con 47.000 tm de las que 16.500 tm se dedican a la exportación (FAO, 2005).

25 El espárrago es uno de los cultivos hortícolas de regadío de mayor interés económico en España, tanto por su consumo a nivel nacional, como por sus posibilidades de exportación en fresco a otros países de la UE, en fechas en las que prácticamente no hay producción en otras áreas de Europa, y tiene gran importancia social debido al elevado número de jornales que requiere su recolección y manipulación posterior, en épocas del año con altos niveles de desempleo en el sector agrícola. En España, como en otros países mediterráneos, también se consumen especies silvestres de espárrago *Asparagus albus* L., *Asparagus acutifolius* L. o *Asparagus aphyllus* L., que crecen espontáneamente en Cataluña, Aragón y Andalucía.

30 El espárrago (género *Asparagus*) es una especie que normalmente se multiplica mediante semillas y en ocasiones por división vegetativa de su rizoma. La tradicional propagación por semillas puede producir plantaciones con una gran variabilidad genética y por lo tanto plantaciones con una productividad limitada y heterogénea al no presentar todos los individuos una calidad uniforme. La opción de una división vegetativa para la multiplicación del espárrago, 35 tiene habitualmente un rendimiento muy bajo, requiere una gran cantidad de mano de obra para su realización y puede favorecer la transmisión de enfermedades, lo que hace este método muy poco rentable para las empresas viveristas productoras de plantones de espárrago.

40 Para solucionar estos problemas y tener un sistema fiable para la propagación clonal masiva de genotipos de calidad en espárrago, se han aplicado dos técnicas alternativas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, que son el desarrollo de embriones somáticos y la micropropagación clonal conforme. Ambos métodos tienen sus ventajas e inconvenientes.

45 El desarrollo de embriones somáticos consiste en la inducción *in vitro* mediante reguladores de crecimiento (auxinas) de unas estructuras adventicias de tipo bipolar, es decir con un meristemo caulinar y otro meristemo opuesto radicular y por lo tanto muy parecidas a un embrión cigótico, pero originadas a partir de células somáticas. Este método presenta problemas de conversión en planta, debidos a problemas en la maduración de los embriones somáticos y generación de procesos de embriogénesis secundaria cíclica y por derivación de los cultivos a la formación de tejidos de callo; también presenta problemas de inducción de variabilidad genética no deseada que se produce debido a la agresividad de los métodos utilizados en la inducción de la embriogénesis somática y que resulta en la proliferación de estructuras embriogénicas anormales y fuera de tipo no utilizables a efectos de propagación, además, para la producción en masa de embriones somáticos es necesario un equipamiento técnico complejo (bioreactores).

55 La micropropagación clonal del espárrago para obtener copias conformes de genotipos específicos, se realiza mediante técnicas como el cultivo de meristemos y el cultivo de secciones nodales con yemas axilares. Este método tiene la desventaja de ser un método lento e ineficiente y no válido para todos los genotipos.

60 El cultivo de meristemos de esta especie fue puesto a punto por Murashige *et al.* (1972) y Hasegawa *et al.* (1973), obteniendo protocolos de buen rendimiento, aunque la dificultad técnica y la gran cantidad de tiempo necesario para el aislamiento de los meristemos, desaconsejan la aplicación de dichos métodos para su utilización a gran escala por inviabilidad. Posteriormente Yang y Cloré (1973) desarrollaron técnicas de micropropagación para el espárrago a partir de secciones nodales, consistentes en la inducción de ramificación axilar. Estos trabajos fueron seguidos por otros para mejorar y refinar los diversos aspectos del proceso de micropropagación, así Yang y Cloré (1974a), Chin (1982), Desjardins (1984), Khunachack *et al.* (1987) y Doré (1988) incluyeron diversos suplementos (sacarosa) y retardantes de crecimiento (Desjardins *et al.*, 1987) en los medios de cultivo con objeto de mejorar las tasas de enraizado y obtener un mayor número de plántulas de buena calidad adecuadas para su aclimatación y trasplante. La conjunción de estas técnicas de cultivo de secciones nodales paulatinamente refinadas y mejoradas por estos autores finalmente

concluyó en el desarrollo y la publicación de un procedimiento de micropropagación (Desjardins, 1992) que desde entonces es el método utilizado de forma general para la micropropagación clonal del espárrago. Este procedimiento de micropropagación (Desjardins, 1992) presenta varios problemas: no es aplicable a todas las variedades y especies de espárrago y en muchos casos cuando el procedimiento funciona lo hace con un rendimiento muy bajo en lo que se refiere a la capacidad de inducción *di novo* de zonas gemantes análogas a las garras (crowns) que se producen de forma natural en el rizoma, y a la capacidad de enraizado de estas zonas gemantes. Además este proceso de formación de zonas gemantes *di novo* y el enraizado precisa de mucho tiempo para su desarrollo y la obtención de plántulas (de 4 a 14 meses dependiendo del genotipo) y en muchos casos también se encuentran problemas en la aclimatación de dichas plántulas micropropagadas, posiblemente por falta de calidad de las plantas recuperadas tras el largo proceso de micropropagación, que requiere la utilización de al menos dos medios diferentes para su realización. Es decir que el método de micropropagación de Desjardins (1992) es utilizable pero es un método lento, dependiente del genotipo, de bajo rendimiento y con unos resultados muy erráticos ya que depende de la inducción y formación *di novo* de una estructura gemante adventicia y de un enraizado posterior lo que se suele producir de forma impredecible y errática, lo que complica enormemente la programación de un trabajo de micropropagación, y de hecho limita su aplicación a unos pocos genotipos con excelente comportamiento morfogénico *in vitro*.

La patente de Yukimasa *et al.* (1990) propone la utilización de crowns o explantos de zoca (nudos gemantes), previamente inducidos *in vitro* a partir de un explanto de sección nodal de turión, brote aéreo joven sin ramificación axilar, recién brotado desde el rizoma, para realizar la micropropagación en masa de espárrago.

El procedimiento objeto de la presente invención trata exactamente de evitar la fase de inducción de zonas gemantes *in vitro*, puesto que este es el cuello de botella tanto de este método (Yukimasa *et al.*, 1990) como del método de Desjardins (1992) y métodos anteriores. Todos estos métodos implican la inducción adventicia de estructuras gemantes y por lo tanto pueden ocasionar variaciones somaclonales que modifiquen el genotipo original, es decir que podrían comprometer la micropropagación clonal. Y además es necesario, en muchos casos, inducir de forma adventicia el enraizado del material y en muchas ocasiones y dependiendo del genotipo, los porcentajes de enraizado son bajos e incluso nulos y requieren de un largo periodo de cultivo *in vitro* en muchos casos superior a 6 meses. En el método de Yukimasa *et al.* (1990) el tiempo mínimo que los autores proponen para obtener una plántula susceptible de ser transplantada y aclimatada es de 8 semanas sin incluir ningún tiempo de endurecimiento, además todos los trabajos de micropropagación se realizan con el cultivar Hokkai 100, excepto en el Ejemplo 1 en el que se utiliza el cultivar Mary Washington 500, para estudiar la formación de una zona gemante ("crown") y donde no se indican otros resultados de propagación, recuperación de plantas ni de aclimatación para este cultivar. Puesto que la micropropagación *in vitro* del espárrago es muy dependiente del genotipo, este método de micropropagación de Yukimasa *et al.* (1990), podría fácilmente no ser utilizable para otros cultivares de *Asparagus officinalis* u otras especies de *Asparagus* (como *A. maritimus*, *A. verticillatus*, *A. robustus*, *A. cooperi*).

Por todo ello la micropropagación conforme del espárrago plantea varios problemas importantes:

- 1) Los métodos existentes (Murashige *et al.*, 1972; Yukimasa *et al.*, 1990; Desjardins, 1992) no pueden aplicarse a un número amplio de genotipos de espárrago, es decir no se pueden utilizar para propagar vegetativamente todas la variedades y líneas genéticas de la especie *Asparagus officinalis* o sus híbridos y tampoco son aplicables a otras especies del género *Asparagus* (*A. maritimus*, *A. verticillatus*, *A. robustus*, *A. cooperi*), o al menos su uso no se ha descrito para dichas especies.
- 2) Los métodos existentes (Murashige *et al.*, 1972; Yukimasa *et al.*, 1990; Desjardins, 1992) no son ni eficientes ni fiables, a menudo la tasa de éxito es muy baja y los métodos funcionan de manera errática, estando los resultados estrechamente ligados al genotipo.
- 3) Las épocas disponibles para el inicio de los cultivos *in vitro* están fuertemente limitadas por la componente estacional del desarrollo del espárrago, al iniciarse los cultivos sólo en la época en la que las plantas emiten turiones.
- 4) Los métodos de micropropagación existentes (Murashige *et al.*, 1972; Yukimasa *et al.*, 1990; Desjardins, 1992) son extremadamente lentos y aproximadamente requieren entre 5 y 14 meses para su completo desarrollo.
- 5) Los métodos existentes de micropropagación (Murashige *et al.*, 1972; Yukimasa *et al.*, 1990; Desjardins, 1992) no son utilizables a nivel de propagación comercial, por su dificultad técnica, escaso rendimiento y/o coste final.

Por todo lo expuesto, hasta el momento no se ha resuelto la necesidad de desarrollar procedimientos de propagación *in vitro* del espárrago que sean eficientes y fiables, aplicables a un amplio número de genotipos, no limitados por un componente estacional, que permitan acortar el tiempo total para la producción de plantas por debajo de los 5 meses y utilizables a nivel comercial. Este ha sido el objeto de la presente invención y su novedad radica en que permite desarrollar un procedimiento para la propagación *in vitro* del espárrago que es aplicable a múltiples genotipos y especies de espárrago, es eficiente y fiable, poco dependiente del genotipo y los explantos pueden ser obtenidos durante casi todo el año, ampliándose la ventana de tiempo que permite obtener el material para el inicio. Además, el procedimiento de propagación *in vitro* del espárrago objeto de la presente invención acorta sustancialmente el tiempo

total de producción de plantas a unos 3 meses, no es técnicamente complejo en su realización, los rendimientos de conversión en plantas son adecuados y permiten su utilización a nivel comercial y facilita y permite la conservación de germoplasma de espárrago mediante crioconservación.

5 Descripción de la invención

Breve descripción de la invención

El objeto de la presente invención se refiere a un procedimiento de propagación *in vitro* del espárrago enfocado hacia el acortamiento del proceso de micropropagación conforme y hacia la obtención de un método eficaz y consistente, que nos permita obtener unos altos porcentajes de éxito en la clonación para una mayoría de genotipos, y reducir el tiempo necesario para la obtención de copias clonales de genotipos agrónomicamente interesantes.

El procedimiento de propagación *in vitro* del espárrago objeto de la presente invención consiste en el cultivo y desarrollo de estructuras gemantas ya preexistentes en el rizoma, cultivándose yemas axilares que ofrecen por ello una mejor garantía de estabilidad somaclonal, asimismo las raíces se forman a partir de un tejido de parénquima que se conserva en la parte basal de la zona gemante del rizoma que se utiliza como explanto. El procedimiento objeto de la presente invención, probado en genotipos muy diferentes incluyendo incluso una especie silvestre de espárrago *A. maritimus*, una variedad población (“Morado de Huétor”) y varios cultivares de *Asparagus officinalis* (“UC-157”, “Baitoru”, y “Atlas”) funciona bien en todos los genotipos evaluados y alcanza además unos rendimientos de enraizado bastante altos en todos los genotipos ensayados y en un periodo de tiempo bastante corto, obteniéndose plantas completas en 3-4 semanas y en 6-8 semanas plantas de calidad y características idóneas para su trasplante y aclimatación, con un elevado rendimiento en la recuperación de plántulas de calidad al final del proceso de micropropagación.

El procedimiento de propagación *in vitro* de plantas de espárrago objeto de la presente invención se basa en la puesta en cultivo y micropropagación a partir de yemas subterráneas de espárrago obtenidas de la zoca (garra) de la planta. Estas yemas subterráneas deben ser de un tamaño de entre 0.4-1.0 cm, deben estar sanas y bien hidratadas, y para su uso deben ser individualizadas de las otras yemas que estén a su alrededor en el rizoma y separadas de los fragmentos de raíz de la zoca, las yemas deben estar en dormancia. Este sistema reduce sustancialmente el tiempo necesario para completar el proceso de micropropagación, al evitar uno de los pasos más lentos e imprevisibles de los procedimientos preexistentes: el desarrollo de una estructura gemante (garra=crown) a partir del brote axilar crecido *in vitro*.

Además, el método objeto de la presente invención permite simplificar y abaratar el proceso de micropropagación, si se aplica un óptimo procedimiento de descontaminación de los explantos primarios que permitan el establecimiento *in vitro* en condiciones asépticas del material.

En un aspecto la presente invención se refiere a un procedimiento de propagación *in vitro* del espárrago caracterizado porque comprende una preparación del explanto y desinfección (i), seguido de la aplicación de un pretratamiento (ii), a continuación se realiza el establecimiento del explanto para su incubación y multiplicación (iii) y finalmente se transplantan y aclimatan las plántulas micropropagadas (vi).

La aplicación del procedimiento de propagación *in vitro* de espárrago para la propagación de cualquier especie cultivada o silvestre del género *Asparagus*, o de cualquier variedad o genotipo de espárrago constituye un aspecto particular de la presente invención.

En otro aspecto particular la presente invención se refiere a cualquier especie cultivada o silvestre del género *Asparagus* o cualquier variedad o genotipo de espárrago propagado *in vitro* mediante el procedimiento objeto de la presente invención.

Breve descripción de las figuras

Figura 1

Esquema del sistema de micropropagación del espárrago mediante cultivo de yemas del rizoma

Se detallan los pasos sucesivos para la realización del procedimiento de micropropagación. A:

Obtención del material vegetal (zoca de espárrago), B: Limpieza y preparación de los explantos C: Yemas de rizoma, D: Disección y obtención de los explantos, E: Desinfección de los explantos, pretratamiento, establecimiento y desarrollo *in vitro*, F: Cultivo, G: Multiplicación, H: Obtención de las plántulas, I: Trasplante de plantas micropropagadas, J: Aclimatación en invernadero.

Figura 2

Cepellón de espárrago

5 Aspecto de un cepellón de espárrago obtenido al extraer mecánicamente una parte de la zoca de la planta de espárrago, desgajándola del cepellón principal, en un proceso denominado “casqueado” en la zona esparraguera de Huétor-Tájar.

Figura 3

10

Zoca, garra o crown de espárrago

Aspecto de las garras (compuesta por brotes secos, raíces y rizoma (con zonas con racimos de yemas) tras la eliminación de la tierra del cepellón y un primer lavado.

15

Figura 4

Zonas gemantes del rizoma una vez eliminados los brotes, la tierra, las raíces y las zonas necróticas del rizoma

20

Aspecto de los racimos de yemas del rizoma, limpios y preparados para la primera desinfección.

Figura 5

Detalle de yemas de rizoma una vez desinfectadas y preparadas para la disección

25

Aspecto de un racimo de yemas del rizoma después de la primera desinfección y antes de su disgregación y disección para obtener el explanto primario del procedimiento objeto de la presente invención.

Figura 6

30

Explantos de yema de rizoma preparados para su establecimiento in vitro

Aspecto de los explantos de yema de rizoma tras la disección y la desinfección, preparados para su establecimiento *in vitro*.

35

Figura 7

Desarrollo in vitro de las yemas de rizoma

40

Aspecto de las plántulas desarrolladas a partir de yemas de la zoca A al inicio del proceso de incubación, y B al final del periodo de incubación en el medio de multiplicación.

Figura 8

45

Aclimatación de las plantas de espárrago micropropagadas

Plántulas obtenidas *in vitro* después de 4 semanas en un túnel de aclimatación en invernadero.

Descripción detallada de la invención

50

La presente invención se refiere a un procedimiento de propagación *in vitro* del espárrago enfocado hacia el acortamiento del proceso de micropropagación conforme y hacia la obtención de un método eficaz y consistente, que nos permita obtener unos altos porcentajes de éxito en la clonación para una mayoría de genotipos, y reducir el tiempo necesario para la obtención de copias clonales de genotipos agronómicamente interesantes.

55

El problema técnico de la mayoría de los procedimientos de micropropagación de espárrago desarrollados hasta el momento es que para su propagación *in vitro* el espárrago necesita varios requisitos, entre los que destaca que para el desarrollo de plantas completas y de trasplante viable requiere la formación de una zona gemante en cualquier parte del explanto de la que se desarrollen raíces de dos tipos nutricias y de reserva. En caso contrario, las plantitas obtenidas por cultivo *in vitro* mueren en la fase de aclimatación y el proceso no es viable.

60

La inducción de esa zona gemante (aerial-crown o crown en inglés, zoca o garra en español) en el explanto de sección nodal que se establece *in vitro*, o en cualquier parte de un brote que se cultive *in vitro*, es el principal cuello de botella y el principal problema a resolver en la micropropagación de cualquier tipo de espárrago. Esta inducción y la subsecuente formación de raíces no ocurre en muchos casos, es muy dependiente del genotipo y consume una gran cantidad de tiempo y esfuerzo mecánico. Incluso con una serie de mejoras desarrolladas por nuestro equipo en los procedimientos existentes, el sistema mas utilizado (Desjardins, 1992) es lento y muy poco eficiente, excepto para unos pocos genotipos.

65

Como alternativa al cultivo de secciones nodales, se propone un procedimiento consistente en la puesta en cultivo y micropropagación a partir de yemas subterráneas de espárrago obtenidas de la zoca (garra) de la planta. Este sistema reduce sustancialmente el tiempo necesario para completar el proceso de micropropagación, al evitar uno de los pasos más lentos e imprevisibles del procedimiento preexistente: el desarrollo de una estructura gemante (garra=crown) a partir del brote axilar crecido *in vitro*. El procedimiento aplica un óptimo método de descontaminación de explantos primarios que permite el establecimiento *in vitro* en condiciones asépticas del material lo que simplifica y abarata el proceso de micropropagación.

El procedimiento de propagación *in vitro* del espárrago objeto de la presente invención permite un acortamiento y simplificación del proceso de micropropagación del espárrago cultivado, a 2 meses *in vitro* más 1 mes de aclimatación, y la utilización de un único medio de cultivo para todo el proceso, mediante el desarrollo y optimización de un procedimiento innovador y muy eficiente para la micropropagación clonal de genotipos de espárrago, a partir de yemas subterráneas obtenidas del rizoma (zoca o garra) de la planta. Además permite solucionar la mayor parte de los problemas técnicos planteados por las tecnologías desarrolladas hasta el momento dado que es aplicable a múltiples genotipos y especies de espárrago, es un procedimiento eficiente y fiable, poco dependiente del genotipo, los explantos pueden ser obtenidos durante casi todo el año, ampliándose la ventana de tiempo para el inicio del material *in vitro*, sus rendimientos de conversión en plantas son adecuados y permiten ser utilizados a nivel comercial (una vez efectuados los ajustes necesarios para cada caso). Además, este procedimiento facilita y permite la conservación de germoplasma de espárrago (crioconservación).

El procedimiento de propagación *in vitro* del espárrago objeto de la presente invención consta de las siguientes etapas:

1. *Preparación del explanto y desinfección:* Se extrae de una planta de espárrago un trozo del rizoma completo (raíz, tallo subterráneo y tallo aéreo) (Fig. 2). De este material se eliminan tallos aéreos y raíces así como el material deteriorado o necrótico del rizoma. Este material se lava, a continuación se separa en grupos de yemas más pequeños, se vuelve a lavar y una vez limpio, se divide nuevamente en secciones más pequeñas (Fig. 3). A continuación, debe ser tratado con una solución fungicida, tras la que se aplica una solución desinfectante (Fig. 1).

Tras esta desinfección se procede a la extracción y disección de las yemas utilizando una lupa, con un escalpelo se van eliminando capas de brácteas hasta que su tamaño sea de 1-3 mm. El explanto así preparado debe incluir la yema con varias brácteas y su correspondiente meristemo apical y un trozo de tejido parenquimático en la base de dicha yema siendo en esta zona parenquimática basal donde se formarán los meristemos de raíz y primordios radiculares. (Fig. 4). Estas yemas son tratadas con una solución antioxidante, tras el cual se tratan de nuevo con una solución fungicida y a continuación se desinfectan, para ser finalmente lavadas en condiciones asépticas (Fig. 5).

2. *Pretratamiento:* Una vez preparados y desinfectados los explantos son sometidos a un pretratamiento-pulso con una solución compuesta por una formulación mineral MS suplementada con sacarosa y ácido naftalenacético (ANA), ajustada al pH adecuado, durante un corto periodo de tiempo (desde unos minutos a unas horas).

3. *Establecimiento del explanto e incubación para la multiplicación:* Una vez preparados los explantos, desinfectados y pretratados se introducen en medio de cultivo hasta la mitad y en posición vertical, con el extremo de la yema hacia arriba y se incuban a una temperatura entre 24-26°C, con la intensidad luminosa y fotoperiodo adecuado durante un periodo de en torno a 6 semanas. El medio utilizado para esta incubación tiene como base una formulación mineral de Murashique y Skoog (1962) (MS), suplementado con vitaminas según Nitsch y Nitsch (1969) y con citoquininas, auxinas, retardantes de crecimiento, sacarosa y agar (Fig. 6). Durante esta fase los explantos que muestren cualquier tipo de contaminación serán eliminados. Durante la incubación en el medio de establecimiento-multiplicación por un periodo de 4 a 6 semanas se produce la multiplicación de los explantos y su desarrollo a plántulas completas, al final de este periodo las plantitas deben alcanzar un tamaño mínimo de 10-15 cm. Las plántulas de este tamaño pueden ser extraídas de los contenedores de cultivo para su trasplante y aclimatación (Fig. 7).

La tasa de multiplicación es de 1-2 plantas por yema cultivada, esta tasa se puede aumentar incrementando los tiempos de incubación y mediante subdivisión de la zona gemante y posterior subcultivo. Lo que supone repetir el proceso de micropropagación descrito en la tercera etapa (establecimiento del explanto e incubación para la multiplicación).

4. *Aclimatación:* Las plantas desarrolladas *in vitro* de 6 a 10 semanas, con brotes de un tamaño aproximado de 10 cm de longitud y 6 cm de raíces se trasplantan a macetas con un sustrato a base de turba y perlita, con adición de un fertilizante de liberación lenta y se aclimatan en túneles de aclimatación provistos de un sistema de niebla artificial sobre bancadas provistas de calefacción. Para la aclimatación las plantas se someten a periodos sucesivos de disminución de la humedad relativa mediante apertura temporal de la cubierta plástica del túnel. Aumentando los tiempos de apertura paulatinamente conforme avanza el proceso de aclimatación. El objetivo es activar el metabolismo de la planta mediante la inducción de un estrés hídrico controlado. Este proceso se realiza durante un periodo entre 3 y 5 semanas (Fig. 8).

ES 2 349 102 A1

Finalizado el proceso las plantas de espárrago propagadas *in vitro* obtenidas mediante el procedimiento descrito están listas para su trasplante al campo de cultivo.

Mediante el procedimiento de propagación *in vitro* del espárrago objeto de la presente invención se consigue un acortamiento del proceso de micropropagación conforme, el método es eficaz y consistente, permite obtener unos altos porcentajes de éxito en la clonación para una mayoría de genotipos, reduciendo el tiempo necesario para la obtención de copias clonales de genotipos agrónomicamente interesantes.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no deben ser considerados en sentido limitativo de la misma.

Ejemplo N° 1

Propagación in vitro de espárrago del genotipo o variedad "Morado de Huétor"

Como material de partida se utilizaron plantas de espárrago de la variedad población "Morado de Huétor".

1. Preparación del explanto y desinfección

Se extrajo de una planta de espárrago de la variedad "Morado de Huétor" un trozo del rizoma completo (raíz, tallo subterráneo y tallo aéreo). De este material se eliminaron tallos aéreos y raíces así como el material deteriorado o necrótico del rizoma (este rizoma o tallo subterráneo es de color marrón claro, de forma aplanada y desde el punto de crecimiento inicial de la plántula germinada de la semilla, se desarrolla de forma centrípeta en una serie de extensiones redondeadas y aplanadas ricas en tejido parenquimático, desde las que se desarrollan raíces y grupos en roseta de yemas subterráneas de forma periforme cubiertas de brácteas). Tras esta primera separación, el material vegetal resultante se lavó con abundante agua corriente, hasta eliminar toda la tierra y detritos que llevaba adheridos, para ello se disgregó el material con las manos en pequeños trozos "naturales" y finalmente se separaron en grupos de yemas más pequeños con ayuda de unas tijeras o un escalpelo. El material así preparado se lavó inmediatamente con abundante agua jabonosa varias veces hasta que el agua resultante del lavado quedó limpia tras el aclarado. A continuación el material se volvió a dividir en porciones más pequeñas y se introdujo en una solución con fungicida (Benomilo al 0.1%) y aclarado durante 20-30 minutos en agitación. Luego se aclaró una vez en agua corriente. Después se desinfectó en una solución de hipoclorito sódico al 2% en vacío.

Tras la desinfección se procedió a la extracción y disección de las yemas, de las que con ayuda de un escalpelo y bajo una lupa se fueron eliminando capas de brácteas hasta que su tamaño quedó entre 1-3 mm. Los explantos preparados incluían la yema con varias brácteas, con su correspondiente meristemo apical y un trozo de tejido parenquimático en la base de la misma, quedando morfológicamente con una forma parecida a un bulbo. A continuación, mientras se desarrollaba el proceso de disección las yemas preparadas se introdujeron en una solución antioxidante compuesta por 150 mg/l de ácido cítrico y 100 mg/l de ácido ascórbico. A continuación la yemas se envolvieron en una gasa estéril y se trataron de nuevo con fungicida (Benomilo al 0.05%) en agitación y durante 15 minutos. Posteriormente las yemas se aclararon con agua corriente y se desinfectaron de nuevo con una solución de hipoclorito sódico al 2% en vacío. Luego, y ya en el interior de una cabina de flujo laminar y en condiciones asépticas, las yemas se lavaron tres veces durante 5 minutos con agua destilada estéril y quedaron preparadas para su establecimiento *in vitro*. El porcentaje de desinfección obtenida fue del 95% (Tabla 1).

2. Pretratamiento

Los explantos se sometieron a un pretratamiento-pulso en una solución compuesta por una formulación mineral basal MS suplementada con 30 g/l de sacarosa y 10 mg/l de ANA durante 1 hora, la solución se ajustó previamente a un pH 5.7, tras lo que se esterilizó en frío mediante un sistema Millipore.

3. Establecimiento del explanto e incubación para la multiplicación

Una vez establecidos los explantos *in vitro* en condiciones asépticas se incubaron durante 6-10 semanas en una cámara de cultivo a $25\pm 1^\circ\text{C}$ y una intensidad luminosa de $42 \mu\text{E m}^2 \text{s}^{-1}$, con un fotoperíodo de 16/8. Cuando las plántulas obtenidas *in vitro* alcanzaron un tamaño mínimo de unos 10-15 cm el material se extrajo de los contenedores de cultivo para su trasplante y aclimatación. En la Tabla 3 se recogen los porcentajes de enraizado obtenidos.

Se utilizó un único medio de cultivo cuya base es una formulación mineral de Murashigie y Skoog (1962) suplementada con la vitaminas de Nitsch y Nitsch (1969) y con una combinación de auxinas y citoquininas: ANA (ácido naftalenacético) mas Kinetina, ANA mas 2iP (2-isopentenil adenina), ANA mas Kinetina mas 2iP e incluso ANA o AIA (ácido indolacético) sin citoquininas, y con i-inositol 100 mg/l, Thiamina 100 mg/l, ancymidol (entre 0.5 y 3 mg/l), sacarosa (60 g/L), gelificado con agar (7-8 g/l). Los explantos de espárrago se introdujeron en el medio de cultivo hasta la mitad y en posición vertical, con el extremo distal de la yema hacia arriba y se incubaron a $25\pm 1^\circ\text{C}$ y con una intensidad luminosa de 2000lux y un fotoperiodo de 16 horas de luz 18 de oscuridad durante 6 semanas.

Los rangos de aplicación del AIA están entre 0,05 y 1 mg/l.

ES 2 349 102 A1

Los rangos de aplicación del 2iP están entre 0.1 y 1 mg/l.

Los rangos de aplicación del ANA están entre 0.05 y 1 mg/l.

5 Los rangos de aplicación de la Kinetina están entre 0.05 y 1 mg/l.

Los rangos de aplicación del ancymidol están entre 0.5 y 3 mg/l.

10 Los rangos de aplicación de la sacarosa están entre 30 y 60 g/l.

Se utilizaron distintas proporciones entre ANA y Kinetina (1:1, 3:5, 3:7, 5:7, 5:10, 6:10).

15 La combinación que dio los mejores resultados en el mayor porcentaje de genotipos ensayados de esta variedad población, fue 0.5 mg/l de ANA mas Kinetina 0.7 mg/l, mas 2 mg/l de ancymidol, con 60 g/l de sacarosa (medio MGE) (Tabla 2).

Este medio puede ser modificado para adaptarlo a genotipos que no se desarrollen bien en esta combinación de reguladores mediante la sustitución del ANA por AIA o adición de AIA.

20 La tasa de multiplicación fue de 1-2 plantas por yema cultivada, esta tasa se pudo aumentar incrementando los tiempos de incubación y mediante subdivisión de la zona gemante y su posterior subcultivo, reiniciando el proceso desde el punto 2.

4. *Aclimatación*

25 Las plantas desarrolladas *in vitro* de 6 a 10 semanas, con brotes de un tamaño aproximado de 10 cm de longitud y raíces de 6 cm se extrajeron de los recipientes de cultivo, se lavaron bajo el grifo con abundante agua, cuidando de eliminar todos los restos del medio de cultivo y se pasaron a macetas con un sustrato preparado mezclando turba y perlita en una proporción de 7:3, añadiéndose unos 10 gránulos por maceta de fertilizante de liberación lenta (tipo Ficote). Las macetas se introdujeron en túneles de aclimatación provistos de un sistema de niebla artificial sobre bancadas provistas de calefacción.

30 El proceso de aclimatación se desarrolló de la siguiente manera: Las plántulas se sometieron a periodos de disminución de la humedad relativa mediante apertura temporal de la cubierta plástica del túnel. Los tiempos de apertura se fueron incrementando paulatinamente conforme avanzaba el proceso de aclimatación. De este modo se activó el metabolismo de la planta mediante la inducción de estrés hídrico controlado. Una vez por semana se realizó un tratamiento fitosanitario de tipo preventivo con un fungicida sistémico (Benomilo 50% p/p). El riego de las plantas con agua corriente también se realizó una vez por semana. La tasa de recuperación de planta fue del 95% (Tabla 4).

40

Ejemplo N° 2

Propagación in vitro de espárrago de la variedad UC-157

45

Como material de partida se utilizaron plantas de espárrago de la variedad UC-157.

50 Las etapas 1: Preparación del explanto y desinfección se realizó tal y como se ha descrito para el ejemplo N° 1, la Tabla 1 recoge los porcentajes de éxito obtenidos en la desinfección de explantos. Las variaciones se produjeron en la etapa 2: Pretratamiento: En este caso se utilizó una solución compuesta por una formulación mineral basal MS suplementada con 60 g/l de sacarosa y 10 mg/l de ANA durante 1 hora, dicha solución fue ajustada a un pH 5.7, tras lo que se esterilizó en frío mediante un sistema Millipore, como en el ejemplo N° 1.

55 En la etapa 3: Establecimiento del explanto e incubación para la multiplicación se procedió tal y como se ha descrito en el Ejemplo N° 1, la Tabla 3 recoge el porcentaje de enraizado obtenido. La combinación que dio los mejores resultados en este genotipo UC-157, fue 0.3 mg/l de ANA mas Kinetina 0.5 mg/l, mas 1.3 mg/l de ancymidol, con 40 g/l de sacarosa (Tabla 2). La tasa de multiplicación fue de 1-2 plantas por yema cultivada, por lo tanto se alcanzaron valores similares a los obtenidos en el Ejemplo N° 1 para la variedad "Morado de Huétor".

60 En la etapa 4: Aclimatación se procedió tal y como se ha descrito en el Ejemplo N° 1, La tasa de recuperación de planta fue del 80% (Tabla 4).

65

ES 2 349 102 A1

Ejemplo N° 3

Propagación in vitro de espárrago Asparagus maritimus

5 Como material de partida se utilizaron plantas de espárrago de una especie silvestre el *Asparagus maritimus*.

Las etapas, 1: Preparación del explanto y desinfección se realizó tal y como se han descrito para el Ejemplo N° 1, la tabla 1 recoge los porcentajes de éxito obtenidos en la desinfección de explantos. Las variaciones se produjeron en la etapa 2: Pretratamiento en este caso se utilizó una solución compuesta por una formulación mineral basal MS
10 suplementada por una combinación de 60 g/l de sacarosa y 5 mg/l de ANA durante 1 hora y la solución se ajustó previamente a un pH 5.7, tras lo que se esterilizó en frío mediante un sistema Millipore, como en el ejemplo N° 1.

En la etapa 3: Establecimiento del explanto e incubación para la multiplicación se procedió tal y como se ha descrito en el Ejemplo N° 1. La combinación que dio los mejores resultados en este genotipo silvestre *A. maritimus*,
15 fue 0.6 mg/l de ANA mas Kinetina 0.8 mg/l, mas 1 mg/l de ancymidol, con 40 g/l de sacarosa (Tabla 2). La tasa de multiplicación fue de 1-2 plantas por yema cultivada, por lo tanto se alcanzaron valores similares a los obtenidos en el Ejemplo N° 1 y

Ejemplo N° 2 para las variedades “Morado de Huétor” y “UC159”. La Tabla 3 recoge el porcentaje de enraizado
20 obtenido.

En las etapa 4: Aclimatación se procedió tal y como se ha descrito en el Ejemplo N° 1, La tasa de recuperación de planta fue del 80% (Tabla 4).

25 El procedimiento de propagación *in vitro* del espárrago objeto de la presente invención también se ha probado con éxito en los cultivares de *Asparagus officinalis* “Baitoru” y “Atlas”.

30 TABLA 1

Porcentaje de éxito en la desinfección de explantos obtenidos de diferentes genotipos/variedades de espárrago

35 Genotipo/Variedad	% de desinfección
“Morado de Huétor”	95
40 “UC-157”	90
<i>Asparagus maritimus</i>	100

45

50

55

60

65

ES 2 349 102 A1

TABLA 2

Resultados de la multiplicación de los genotipos "Morado de Huétor", "UC-159" y *Asparagus maritimus* (Datos a las 6 semanas de incubación)

Genotipo	% brotación	Nº medio brotes	Longitud media de brotes (cm)	Nº de raíces	Longitud media de raíces (cm)
"Morado de Huétor"					
(Medio MGE): 0.5 mg/l ANA + 0.7 mg/l Kinetina 0.7 mg/l + 2 mg/l Ancymidol + 60g/l sacarosa	90%	2.7	6.6	5.5	6.8
"UC-159"					
0.3 mg/l ANA + 0.5 mg/l Kinetina + 1.3 mg/l ancymidol + 40g/l sacarosa	85%	1.2	7.2	4.8	7.5
<i>Asparagus maritimus</i>					
0.6 mg/l de ANA + 0.8 mg/l Kinetina + 1 mg/l ancymidol + 40g/l sacarosa	90%	2.2	7.5	8.6	9.6

TABLA 3

Porcentaje de enraizado de diferentes genotipos de espárrago

Genotipo/Varietal	% de enraizado
"Morado de Huétor"	65
"UC-157"	80
<i>Asparagus maritimus</i>	80

TABLA 4

Porcentaje de recuperación de planta micropropagada tras 4 semanas de aclimatación

Genotipo/Variiedad	% de recuperación de planta
"Morado de Huétor"	95
"UC-157"	80
<i>Asparagus maritimus</i>	80

Referencias

Boletín de Información Agraria y Pesquera, nº 141. (1999)

Consejería de Agricultura y pesca. Junta de Andalucía.

Benmoussa, M., Mukhopadhyay, S. y Desjardins, Y. (1996)

Optimization of callus culture and shoot multiplication of *Asparagus densiflorus*

Plant Cell, Tissue and Organ Culture 47: 91-94.

Chin, C.K. (1982)

Promotion of shoot and root formation in asparagus *in vitro* by ancymidol

HortScience 17: 590-591.

Desjardins, Y. (1984)

In vitro rooting of nodal sections of *Asparagus officinalis* L.

MScThesis, University of Guelph, pp. 96.

Desjardins, Y. (1992)

Micropropagation of *Asparagus (Asparagus officinalis* L)

En: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 19: High-Tech and Micropropagation III. Y.P.S. Bajaj (Ed.). pp. 26-41. *Springer-Verlag*. Berlín. Heidelberg.

Desjardins, Y.; Tiessen, H. y Harney, P.M. (1987)

The effect of sucrose and ancymidol on the *in vitro* rooting of nodal sections of asparagus.

HortScience 22: 131-133.

Doré, C. (1988).

Nouveau regard sur le comportement de l'asperge (*Asparagus officinalis* L.) multipliée *in vitro*.

Agronomie 8: 843-850.

Encina, C.L., Cazorla, J.M., Padilla, I.G. y Caro, E. (1997).

Multiplicación *in vitro* de espárragos autóctonos de Huétor-Tájar.

V Congreso de Fisiología Vegetal, pp. 339. Córdoba. España.

Falavigna, A. (2000)

Asparago da sviluppare.

5 *L' Informatore agrario* 46: 44-48.

FAOSTAT (2005)

Agriculture Database. <http://www.fao.es>

10

Ghosh, B. y Sen, S. (1994)

Micropropagation of *Asparagus cooperi* as affected by growth regulators.

15 *Biología Plantarum* 36: 527-534.

Ghosh, B. y Sen, S. (1996)

Plant regeneration in *Asparagus verticillatus* L.

20

Journal Herbs, Spices & Medicinal Plants 4: 9-17.

Harada, T. y Yakuba, T (1984).

25 Studies on the morphogenesis of asparagus: X. influence of light and growth regulators on callus and organ formation in the *in vitro* culture of segments from seedling shoots.

Journal Fac. Agr. Hokkaido Univ. Vol. 61 Pt. 4: 457-467.

30 **Hasegawa, P.M., Murashige, T. y Takatori, F.H. (1973).**

Propagation of asparagus through shoot apex culture II. Light and temperature requirements, transplantability of plants, and cyto-histological characteristics.

35 *Journal American Society for Horticultural Science* 98:143-148.

Khunachack, A., Chin, C.K., Le, T. y Gianfagna, T. (1987).

Promotion of asparagus shoots and root growth by growth retardants.

40

Plant Cell, Tissue and Organ Culture 11: 97-111.

Knaflewsky, M. (1996).

45 Genealogy of asparagus cultivars. In: Nichols, M. and Swain, D. (Eds),

Proceedings VIII Int. Asparagus Symp. pp. 87-91.

Kumar Kar, D. y Sen, S. (1985).

50

Propagation of *Asparagus racemosus* through tissue culture.

Plant Cell, Tissue and Organ Culture 5: 89-95.

55 **MAPA (2006).**

Anuario de estadística agraria (on line).

Murashige, T. y Skoog, F. (1962).

60

A revised médium for rapid growth and bioassays with tobáceo tissue culture.

Physiologia Plantarum 15, 473-497.

65 **Murashige, T., Shabe, M.N., Hasegawa, P.M., Takatori, F.H. y Jones, J.B. (1972).**

Propagation of asparagus through shoot apex culture I. Nutrient médium for formation of plantlets.

Journal American Society for Horticultural Science 97:158-161.

Nayak, S. y Sen, S. (1998).

5 Regeneration of *Asparagus robustus* Hort..

Journal Herbs, Spices and Medicinal Plants 5:43-50.

Nitsch, J.P. y Nitsch, C. (1969).

10

Haploid plants from pollen grains.

Science 163, 85-87

15

Rigau, A. (1988).

Cultivo de espárragos. Ed. Sintes. pp. 130.

Stajner, N., Bohanec, B. y Jakse, M. (2002).

20

In vitro propagation of *Asparagus maritimus* - A rare Mediterranean salt-resistant species.

Plant Cell, Tissue and Organ Culture 70: 269-274.

25

Yang, H.J. y Clore, W.J. (1973).

Rapid propagation of asparagus through lateral bud culture.

HortScience 8: 141-143.

30

Yang, H.J. y Clore, W.J. (1974).

Development of complete plantlets from moderately vigorous shoot of stocks plants of asparagus *in vitro*.

35

HortScience 9:138-139.

Yukimasa, H., Shigeru, T., Rie, M., Atsuko, K. (1990).

Patente: Method of multiplying plant belonging to the genus asparagus.

40

Nº de Patente: EP0375218.

Solicitante: Mitsui Petrochemical Ind. (JP).

45

Nº de solicitud: EP19890312806 19891208.

50

55

60

65

ES 2 349 102 A1

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de propagación *in vitro* del espárrago **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:

- (i) Preparación del explanto y desinfección.
- (ii) Pretratamiento.
- (iii) Establecimiento del explanto e incubación para la multiplicación.
- (iv) Aclimatación.

2. Procedimiento de propagación *in vitro* del espárrago según reivindicación 1 **caracterizado** porque dicha preparación de explantos y desinfección (i) comprende las siguientes etapas:

- (i.i). Disgregado manual de los rizomas y eliminación de brotes y raíces.
- (i.ii). Lavado con abundante agua corriente y detergente.
- (i.iii). Desinfección con un fungicida.
- (i.iv). Lavado con agua corriente.
- (i.v). Desinfección con una solución desinfectante.
- (i.vi). Extracción y disección de las yemas del rizoma.
- (i.vii). Separación de las yemas y colocación en una gasa estéril.
- (i.viii). Tratamiento con solución antioxidante.
- (i.ix). Desinfección con un fungicida.
- (i.x). Lavado con agua corriente.
- (i.xi). Desinfección con solución desinfectante.
- (i.xii). Lavados finales.

3. Procedimiento de propagación *in vitro* del espárrago según reivindicación 2 **caracterizado** porque dicha desinfección con fungicida (i.iii) se realiza con un fungicida cuya materia activa puede ser Benomilo u otros de similares características a una concentración entre el 0.05 y el 1%, durante un tiempo entre 10 y 40 minutos en agitación.

4. Procedimiento de propagación *in vitro* del espárrago según reivindicación 2 **caracterizado** porque dicha desinfección con fungicida (i.iii) se realiza con un fungicida a base de Benomilo a una concentración del 0.1%, durante un tiempo entre 20-30 min. en agitación.

5. Procedimiento de propagación *in vitro* del espárrago según reivindicación 2 **caracterizado** porque dicha desinfección con solución desinfectante (i.v) se realiza con una solución de hipoclorito sódico a una concentración entre el 0.5 y el 3%, durante un tiempo entre 10 y 25 minutos en vacío.

6. Procedimiento de propagación *in vitro* del espárrago según reivindicación 2 **caracterizado** porque dicha desinfección con solución desinfectante (i.v) se realiza con una solución de hipoclorito sódico a una concentración del 2%, durante un tiempo de 15 minutos en vacío.

7. Procedimiento de propagación *in vitro* del espárrago según reivindicación 2 **caracterizado** porque dicha extracción y disección de las yemas del rizoma (i.vi) se realiza eliminando capas de brácteas hasta que su tamaño queda entre 1 y 3 mm.

8. Procedimiento de propagación *in vitro* del espárrago según reivindicación anterior **caracterizado** porque dicha separación de las yemas (i.vi) se realiza dejando una yema con varias brácteas, con su correspondiente meristemo apical y un trozo de tejido parenquimático en la base de la misma.

9. Procedimiento de propagación *in vitro* del espárrago según reivindicación 2 **caracterizado** porque dicho tratamiento antioxidante (i.viii) se realiza colocando las yemas en una solución antioxidante mientras paulatinamente se procede a su disección.

ES 2 349 102 A1

10. Procedimiento de propagación *in vitro* del espárrago según reivindicación anterior **caracterizado** porque dicha solución antioxidante (i.viii) está compuesta por ácido ascórbico y ácido cítrico.

5 11. Procedimiento de propagación *in vitro* del espárrago según reivindicación anterior **caracterizado** porque dicha solución antioxidante (i.viii) contiene entre 100 y 250 mg/l de ácido cítrico y entre 50 y 200 mg/l de ácido ascórbico.

10 12. Procedimiento de propagación *in vitro* del espárrago según reivindicación 2 **caracterizado** porque dicho tratamiento con fungicida (i.ix) se realiza con un fungicida cuya materia activa puede ser Benomilo u otros de similares características a una concentración entre el 0.01 y el 1%, durante un tiempo entre 5 y 30 minutos en agitación.

13. Procedimiento de propagación *in vitro* del espárrago según reivindicación 2 **caracterizado** porque dicho tratamiento con fungicida (i.ix) se realiza con un fungicida a base de Benomilo a una concentración del 0.05%, durante un tiempo entre 10 y 15 minutos, en agitación.

15 14. Procedimiento de propagación *in vitro* del espárrago según reivindicación 2 **caracterizado** porque dicha desinfección con solución desinfectante (i.xi) se realiza con una solución de hipoclorito sódico a una concentración entre el 0.5 y el 3%, durante un tiempo entre 10 y 25 minutos en vacío.

20 15. Procedimiento de propagación *in vitro* del espárrago según reivindicación 2 **caracterizado** porque dicha desinfección con solución desinfectante (i.xi) se realiza con una solución de hipoclorito sódico a una concentración del 2%, durante 15 minutos en vacío.

25 16. Procedimiento de propagación *in vitro* del espárrago según reivindicación 2 **caracterizado** porque dichos lavados finales (i.xii) se realizan mediante 3 lavados de 5 minutos con agua estéril y en condiciones asépticas en la cabina de flujo laminar.

30 17. Procedimiento de propagación *in vitro* del espárrago según reivindicación 1 **caracterizado** porque dicho pretratamiento (ii) se realiza utilizando una solución compuesta por una formulación mineral MS suplementada con sacarosa y ácido naftalénico (ANA) ajustada a pH adecuado y estéril, durante un tiempo variable entre 30 minutos y 2 horas.

35 18. Procedimiento de propagación *in vitro* del espárrago según reivindicación anterior **caracterizada** porque dicho pretratamiento (ii) se realiza utilizando una solución compuesta por una formulación mineral MS suplementada con sacarosa en una concentración entre 20 g/l y 80 g/l, y una concentración de ácido naftalénico (ANA) entre 3 g/l y 20 g/l ajustada a pH entre 5 y 6, de acuerdo con las necesidades de cada genotipo a propagar, durante 1 hora.

40 19. Procedimiento de propagación *in vitro* del espárrago según reivindicación 1 **caracterizado** porque dicho establecimiento del explanto e incubación para la multiplicación (iii) se realiza durante un periodo de mínimo de 6 semanas incubando los explantos en un medio MS basal, suplementado con las vitaminas de Nitsch y Nistch (1989), i-inositol, tiamina, ancymidol, una combinación de citoquininas, auxinas, ancymidol y sacarosa, en cámara de cultivo con las condiciones adecuadas de luz y temperatura, hasta que las plántulas obtenidas adquieren un tamaño mínimo de entre 10 y 15 cm.

45 20. Procedimiento de propagación *in vitro* del espárrago según reivindicación anterior **caracterizado** porque dicho establecimiento del explanto e incubación para la multiplicación (iii) se realiza en un medio basal MS suplementado con las vitaminas de Nitsch y Nitsch (1989) y agar (entre 5 y 10 g/l), i-inositol (entre 50 y 150 mg/l), tiamina (entre 50 y 150 mg/l), ancymidol (entre 0.3 y 4 mg/l) y una combinación de auxinas y citoquinas, elegida entre cualquiera de las combinaciones ANA más kinetina, ANA más kinetina mas 2iP e incluso ANA o AIA sin citoquininas y suplementado con sacarosa,

50 21. Procedimiento de propagación *in vitro* del espárrago según cualquiera de las reivindicaciones 19 y 20 **caracterizado** porque los rangos de concentración de dicha combinación de auxinas y citoquininas se encuentran entre los siguientes: para el AIA entre 0,05 y 1 mg/l, para 2iP entre 0,1 y 1 mg/l, para ANA entre 0,05 y 1 mg/l, para kinetina entre 0,05 y 1 mg/l y para sacarosa entre 30 y 60 g/l.

55 22. Procedimiento de propagación *in vitro* del espárrago según reivindicación anterior **caracterizado** porque las proporciones de dicha combinación de auxinas más citoquininas se realiza utilizando proporciones entre ANA y kinetina según cualquiera de las combinaciones 1:1, 3:5, 3:7, 5:7, 5:10 ó 6:10.

60 23. Procedimiento de propagación *in vitro* del espárrago según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22 **caracterizado** porque dicho establecimiento del explanto e incubación para la multiplicación (iii) se realiza durante un periodo de entre 6-10 semanas, en cámara de cultivo a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, una intensidad luminosa de $42\ \mu\text{E m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ y un fotoperiodo de 16 horas de luz 8 h de oscuridad.

65 24. Procedimiento de propagación *in vitro* del espárrago según reivindicación 1 **caracterizado** porque dicha aclimatación (iv) se realiza durante un periodo de entre 3 y 5 semanas, colocando las plántulas en macetas con sustrato preparado a base de una mezcla de turba y perlita, con fertilizante de liberación lenta en cantidad adecuada, e incubadas en túneles de aclimatación provistos de un sistema de niebla artificial sobre bancadas con calefacción.

ES 2 349 102 A1

25. Procedimiento de propagación *in vitro* del espárrago según reivindicación anterior **caracterizado** porque dicha aclimatación (iv) se realiza utilizando un sustrato con una mezcla de turba y perlita en proporción 7:3, añadiendo unos 20 gránulos por maceta de fertilizante de liberación lenta (tipo Ficote), e introducción de las plántulas en túneles de aclimatación. A continuación las plántulas se someten a periodos sucesivos de disminución de la humedad mediante apertura de la cubierta del túnel, e incrementando los tiempos de apertura paulatinamente a medida que avanza el proceso de aclimatación.

26. Procedimiento de propagación *in vitro* del espárrago según cualquiera de las reivindicaciones 24 y 25 **caracterizado** porque dicha aclimatación (iv) se realiza aplicando una vez por semana un tratamiento fitosanitario de tipo preventivo con un fungicida sistémico tipo Benomilo a una concentración 50% p/p y riego de plantas con agua corriente.

27. Procedimiento de propagación *in vitro* del espárrago según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26.

28. Aplicación del procedimiento de propagación *in vitro* del espárrago según reivindicación anterior a cualquier especie cultivada o silvestre del genero *Asparagus* o a cualquier variedad o genotipo de espárrago.

29. Espárragos de cualquier variedad o genotipo así como de cualquier especie cultivada o silvestre propagados *in vitro* mediante el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26.

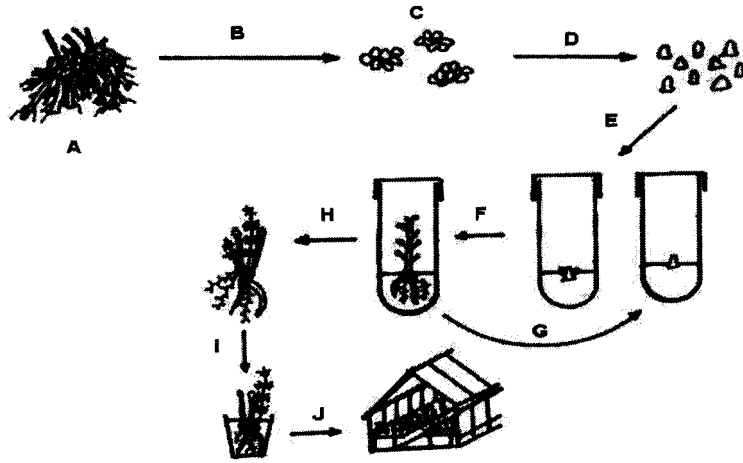


FIG. 1



FIG. 2



FIG. 3

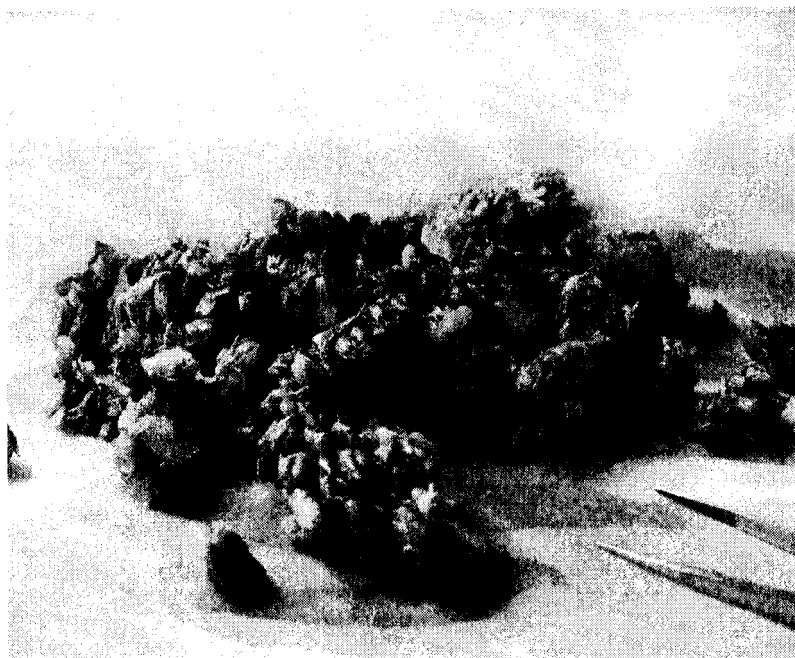


FIG. 4

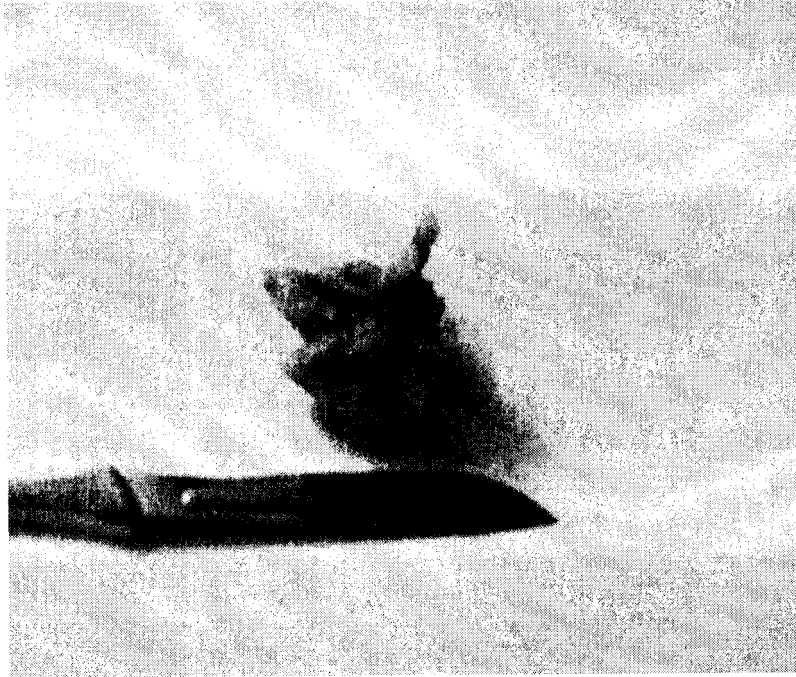


FIG. 5

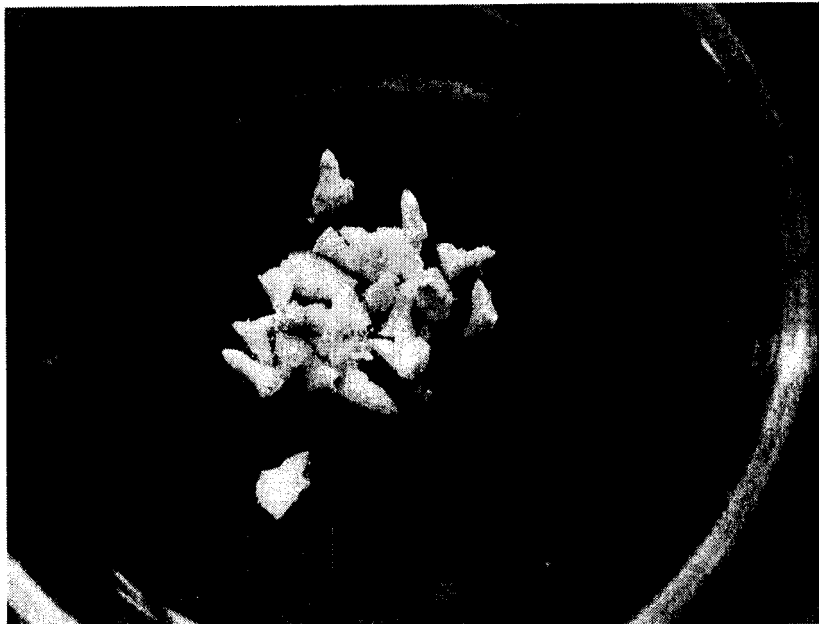
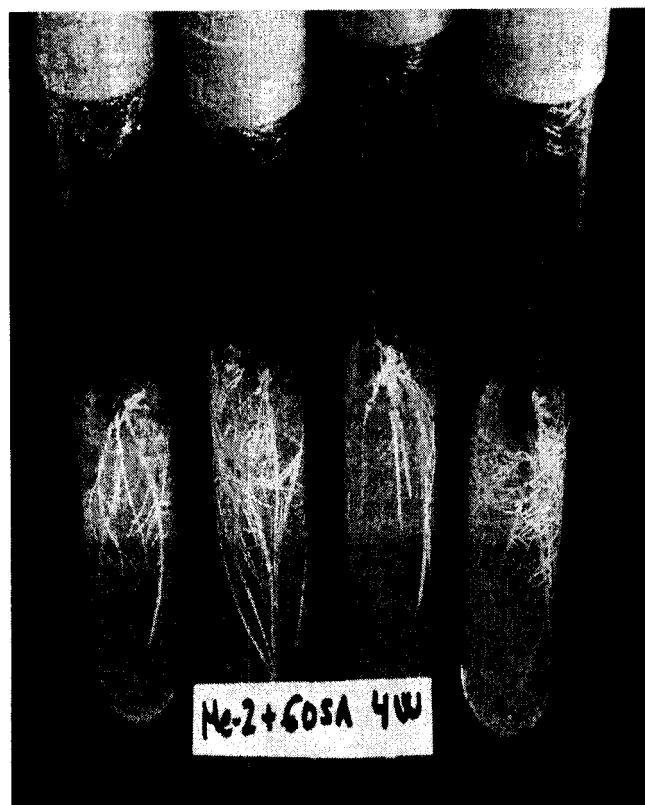
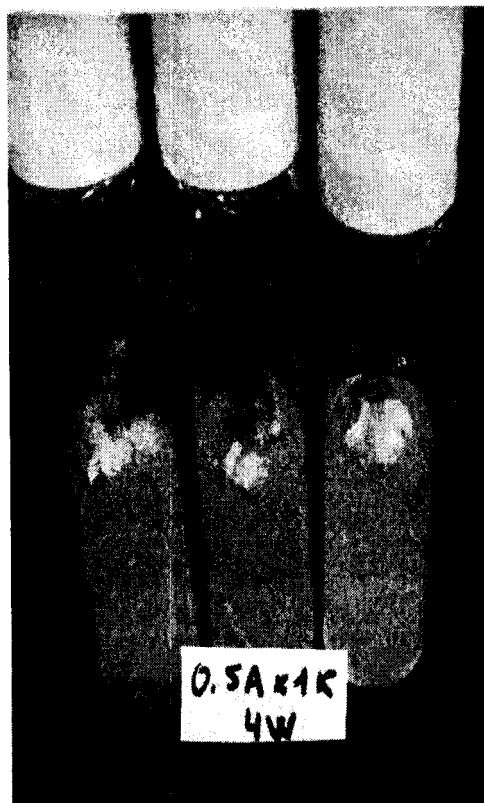


FIG. 6



B

FIG. 7



FIG. 8



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200803544

②② Fecha de presentación de la solicitud: 15.12.2008

③② Fecha de prioridad: **00-00-0000**

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **A01H4/00**(2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X A	EP 0375218 A2 (MITSUI PETROCHEMICAL IND) 27/06/1990, páginas 1 - 8; figura 1.	1, 27-29 2-26
X A	KAR, D.K. Propagation of <i>Asparagus racemosus</i> through tissue culture. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 1985 . Vol. 5, N.º. 1, páginas 89-96. ISSN 0167-6857.	1, 27-29 2-26
X A	VIJAY, N. et al. <i>In vitro</i> propagation of <i>Asparagus racemosus</i> : A plant of ayurvedic medicine. Phytomorphology. 2004. Vol. 54, N.º 3 y 4, páginas 275-279. ISSN 0031-9449	1, 27-29 2-23
X A	HARADA, T. et al. Studies on the morphogenesis of <i>Asparagus</i> . VII. Callus and organ formation in the <i>in vitro</i> culture of cladophylls. Journal of the Faculty of Agriculture Hokkaido University. 1983. Vol.61, N.º 3, páginas 344-350. ISSN 0018-344X.	1, 27-29 2-23

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº: TODAS

Fecha de realización del informe
15.11.2010

Examinador
E. Ulloa Calvo

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A01

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, XPESP, NPL, MEDLINE, EMBASE, COMPDX, INSPEC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita:

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 2-26	SI
	Reivindicaciones 1, 27-29	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 2-26	SI
	Reivindicaciones 1, 27-29	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	EP 0375218 A2 (MITSUI PETROCHEMICAL IND)	27.06.1990
D02	KAR, D.K. Propagation of <i>Asparagus racemosus</i> through tissue culture. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 1985 . Vol. 5, Nº. 1, páginas 89-96.	1985
D03	VIJAY, N. et al. In vitro propagation of <i>Asparagus racemosus</i> : A plant of ayurvedic medicine. Phytomorphology. 2004. Vol. 54, Nº 3 y 4, páginas 275-279.	2004
D04	HARADA, T. et al. Studies on the morphogenesis of <i>Asparagus</i> . VII. Callus and organ formation in the <i>in vitro</i> culture of cladophylls. Journal of the Faculty of Agriculture Hokkaido University. 1983. Vol.61, Nº 3, páginas 344-350.	1983

La solicitud consta de una reivindicación independiente de procedimiento (reivindicación 1), una de uso (reivindicación 28) y una de producto (reivindicación 29). La primera reivindicación describe un método de propagación *in vitro* del espárrago en cuatro etapas: preparación del explanto y desinfección, pretratamiento, establecimiento e incubación, y aclimatación. Las reivindicaciones 2-26 especifican más detalladamente las distintas etapas (2-16 la primera etapa, 17 y 18 la segunda, 19-23 la tercera y 24-26 la cuarta). La reivindicación 28 habla del uso del procedimiento para la propagación *in vitro* de cualquier especie del género *Asparagus*, y la 29 de los espárragos en sí obtenibles por ese método.

El documento D02 describe la propagación clonal de *Asparagus racemosus* por medio del cultivo de tejidos.

El documento D03 anticipa el cultivo *in vitro* del espárrago a partir de distintos explantos.

El documento D04 narra el cultivo *in vitro* del espárrago a partir de cladodios.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

NOVEDAD (Art. 6.1 L.P.)

El objeto técnico de la solicitud se centra en la propagación *in vitro* del espárrago empleando como explanto fragmentos de yemas del rizoma previamente preparadas (tal y como narra a lo largo de toda la descripción, y en concreto en página 12, líneas 15-20). No obstante, la reivindicación independiente 1 es muy general, y no especifica de dónde viene el explanto para la multiplicación. Así, la reivindicación 1 describe un procedimiento de propagación *in vitro* del espárrago que consta de cuatro etapas: preparación del explanto y desinfección, pretratamiento, establecimiento e incubación, y aclimatación. La reivindicación 28 habla del uso del procedimiento para la propagación *in vitro* de cualquier especie del género *Asparagus*, y la 29 de los espárragos en sí obtenibles por ese método.

La propagación clonal del espárrago a partir de distintos explantos es ya conocida en el estado de la técnica, tal y como refleja el propio documento de solicitud de patente, así como los documentos nombrados. Esta propagación conlleva habitualmente una preparación del explanto y desinfección, incubación y aclimatación, y se realiza a partir de distintos explantos: meristemas, secciones nodales, tallos, cladodio, tallos subterráneos (rizoma).

Reivindicaciones 1, 27 y 28

El documento D01 narra la multiplicación clonal del espárrago a partir de un tejido del mismo que emplea como explanto, y que puede ser de la parte aérea, del rizoma (tallo subterráneo) o de otras procedencias (ver página 4, línea 14). Un ejemplo habla de la formación de la garra a partir de un brote de espárrago esterilizado que es cortado y posteriormente incubado utilizando un medio MS basal suplementado con una fuente de carbono (sacarosa), hormonas (auxinas y citoquininas: NAA y kinetina), ancymidol (antigiberilina), vitaminas (tiamina) y aminoácidos, durante 9 semanas a 25°C, pH 5.8 y 3.000 lux. Se citan ejemplos de propagación clonal de esa garra (rizoma) partiendo de trozos que incluyen por lo menos una yema en un medio ASP con auxinas, citoquininas, sacarosa, agar y ancymidol, durante 4 semanas a 25°C y 3.000 lux. Las plántulas obtenidas son posteriormente aclimatadas.

El documento D02 describe la propagación clonal de *Asparagus racemosus* por medio del cultivo de tejidos. Con los tallos como explanto de partida realiza lavados, esteriliza y corta para su incubación en medio MS suplementado con sacarosa y reguladores de crecimiento a 25°C, pH 5.7 y 16 horas de luz. Extrae brotes del callo obtenido que emplea para la multiplicación y posterior enraizamiento. Tras un periodo de aclimatación en macetas y cámara de cultivo, con condiciones controladas, las plantas obtenidas se transfieren al campo.

Los documentos D01 y D02 anticipan procedimientos de propagación *in vitro* del espárrago que comprenden las cuatro etapas genéricas reflejadas en la reivindicación 1. Igualmente incluyen el uso del procedimiento sobre alguna especie del espárrago.

Por tanto, las reivindicaciones 1, 27 y 28 no cumplen con el requisito de novedad y actividad inventiva a la vista de D01 o D02.

Reivindicación 29

La reivindicación 29 tiene por objeto el espárrago propagado *in vitro* por este procedimiento. Si bien, los espárragos obtenidos por este método no difieren en sus características respecto a los obtenidos por otros métodos conocidos (tanto por propagación *in vitro* como por otras formas de propagación). Por tanto, el producto obtenido (espárrago) por este método no tiene novedad ni actividad inventiva a la vista del estado de la técnica conocido (cualquiera de los documentos nombrados D01-D04).

Reivindicaciones 2-26

Las reivindicaciones 2-26 cumplen con el requisito de novedad a la vista del estado de la técnica conocido.

ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 L.P.)

Reivindicaciones 1, 27 y 28

La reivindicación 1 describe un procedimiento de propagación *in vitro* del espárrago que consta de cuatro etapas: preparación del explanto y desinfección, pretratamiento, establecimiento e incubación, y aclimatación.

El documento D03 anticipa el cultivo *in vitro* del espárrago a partir de distintos explantos: brotes apicales, secciones nodales, cladodios o meristemas. Los explantos son previamente desinfectados, lavados y cortados, para luego cultivarlos en un medio MS con agar y suplementado con reguladores de crecimiento (NAA y Kinetina) y nutrientes. Cultiva a 25°C en fotoperiodo 16:8 y pH 5.8.

El documento D04 narra el cultivo *in vitro* del espárrago a partir de cladodios. Realiza una primera esterilización en hipoclorito sódico de los mismos y posteriormente los corta y cultiva en un medio MS suplementado con sacarosa, agar y reguladores de crecimiento (auxinas y citoquininas: NAA, IBA). Mantiene el pH a 5.5, temperatura 25°C y 16 horas de iluminación.

D03 y D04 difieren de las reivindicaciones 1, 27 y 28 en no especificar una etapa posterior de aclimatación (hay que tener en cuenta que el pretratamiento puede ser cualquier cosa, como lavar, cortar,...). Sin embargo, esta técnica es sobradamente conocida por un experto en la materia, y no requiere del ejercicio de actividad inventiva.

Por tanto, y a la vista de D02 o D03, las reivindicaciones 1, 27 y 28 no cumplen con el requisito de actividad inventiva.

Reivindicaciones 2-26

Las reivindicaciones 2-26 cumplen con el requisito de actividad inventiva a la vista del estado de la técnica conocido.