



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 350 070**

② Número de solicitud: 200803727

⑤ Int. Cl.:

A01H 1/04 (2006.01)

A01H 4/00 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **29.12.2008**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **18.01.2011**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
18.01.2011

⑦ Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES

⑦ Inventor/es: **Arbeloa Matute, Arancha;**
Marín Velázquez, Juan Antonio y
Andreu Puyal, Pilar

⑦ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑤ Título: **Método para la detección precoz de patrones de frutales tolerantes al estrés salino.**

⑤ Resumen:

Método para la detección precoz de patrones de frutales tolerantes al estrés salino.

La presente invención se refiere a un método para determinar la respuesta al estrés salino de patrones frutales que reduce el tiempo de selección clásica convencional y que se puede llevar a cabo en laboratorio mediante el crecimiento de raíces aisladas *in vitro* en presencia de concentraciones estresantes de cloruro sódico (NaCl). Este método aúna rapidez en la respuesta y un modelo experimental simplificado.

ES 2 350 070 A1

DESCRIPCIÓN

Método para la detección precoz de patrones de frutales tolerantes al estrés salino.

5 La presente invención se refiere a un método para determinar la respuesta al estrés salino de patrones frutales que reduce el tiempo de selección clásica convencional y que se puede llevar a cabo en laboratorio mediante el crecimiento de raíces aisladas *in vitro* en presencia de concentraciones estresantes de cloruro sódico (NaCl). Este método aún a rapidez en la respuesta y un modelo experimental simplificado.

10 Estado de la técnica anterior

15 La tolerancia de un cultivo a la reducción de la producción por salinidad es un carácter complejo, que involucra respuestas al estrés iónico y osmótico a nivel celular, la coordinación de esas respuestas a nivel de organismo y su interacción con el medio circundante (Cheeseman (1988). *Plant Physiol* 87: 745-755; Yeo (1998). *Sci. Hort.* 78:159-174).

20 Una de las aproximaciones al estudio de la tolerancia al estrés ha sido con el empleo de métodos estadísticos y mapeo genómico, con lo que se consigue asociar el fenotipo de un carácter cuantitativo con marcadores genéticos. Esto se consigue con el análisis de loci de caracteres cuantitativos o QTL (*Quantitative Trait Locus*) (Quarrie (1996). *Plant Growth Regulation* 20: 167- 178). Uno de los problemas que plantea esta aproximación es que la identidad de los caracteres relacionados con la tolerancia a estrés salino no es el mismo para todos los cultivos y se desconocen QTL marcadores de estrés salino válidos para todas las especies o híbridos de patrones de árboles frutales.

25 La tolerancia al estrés salino está regulada por multitud de genes. Este carácter poligénico es el principal obstáculo para la mejora genética de las plantas de cultivo. Hasta la fecha actual no ha resultado fácil encontrar métodos apropiados para la selección de plantas tolerantes al estrés salino.

30 Una aproximación para la mejora de la tolerancia ha sido la selección o adaptación de suspensiones celulares o callos (cultivo de tejidos y multiplicación *in vitro*) bajo condiciones de salinidad y aprovechamiento de la variación somaclonal para posterior regeneración de plantas con mayor tolerancia. En algunos casos, este método dio fruto a individuos más tolerantes pero sin interés agronómico y en otros casos a cultivares que no han tenido una difusión comercial importante (Flowers y Yeo (1995). *Australian Journal of Plant Physiology* 22: 875-884).

35 La mejora de la tolerancia a la salinidad de especies leñosas por medio de la detección de los ejemplares tolerantes es difícil y costosa debido a que los ensayos en campo son lentos y los tratamientos de salinidad difíciles o con riesgo de salinización de la parcela. Para no perder sus características genéticas, que son diferentes a las de sus semillas, las especies leñosas se reproducen vegetativamente, ya que con el uso de plantas de semilla, a pesar de que la respuesta es más rápida, se desconoce el comportamiento agronómico de la planta evaluada y, por tanto, su interés; si se utilizan plantones en maceta los resultados se demoran hasta la preparación de la planta, que no siempre es posible, y hasta la obtención de la respuesta a la sal.

40 A pesar de la sensibilidad de los frutales a la salinidad, la elección de un patrón tolerante permite el cultivo en condiciones de baja salinidad (Ziska *et al.* (1991). *Tree Physiology* 8: 47-57) por lo que la determinación del grado de tolerancia de los patrones tiene un gran interés ya que permitiría el cultivo en zonas con salinidad moderada.

45 Explicación de la invención

50 La presente invención se refiere a un método para determinar la respuesta al estrés salino de patrones frutales que reduce el tiempo de selección clásica convencional y que se puede llevar a cabo en laboratorio mediante el crecimiento de raíces aisladas *in vitro* en presencia de concentraciones estresantes de cloruro sódico (NaCl). Este método aún a rapidez en la respuesta y un modelo experimental simplificado y es fácilmente adaptable a otros estreses abióticos y otras especies.

55 Mediante la aplicación del método de la presente invención es posible determinar y distinguir entre patrones tolerantes y sensibles a la salinidad de especies leñosas utilizando tanto la medida del crecimiento de las raíces tras su cultivo *in vitro* como la medida del contenido de granos de almidón en cortes transversales de las raíces en la zona de respuesta de los tejidos, tras su cultivo durante un tiempo determinado, a un rango de concentración de NaCl (ver más adelante).

60 El método de la presente invención aprovecha las ventajas de un modelo experimental simplificado, basado en las raíces, que son los órganos que están en contacto directo con el suelo, y por tanto con el NaCl. Por otra parte se evalúa la respuesta a un nivel de organización más sencillo, el histológico y celular, que manifiestan una respuesta más rápida que la de la planta completa, que integraría diferentes mecanismos fisiológicos. La aplicación de este método permite reducir el tiempo de selección en especies frutales.

65 En la presente invención se demuestra que los patrones del grupo ciruelo son los patrones más tolerantes a la salinidad y que los patrones del tipo cerezo están entre los menos tolerantes. Estos datos se corresponden con los datos de tolerancia a la salinidad de planta entera que demuestran la misma relación de tolerancia entre los patrones del

ES 2 350 070 A1

grupo ciruelo y los del grupo cerezo, según se concluye de diversos trabajos que estudian la tolerancia de diversas especies de *Prunus* (Day (1953). *Calif. Agric. Exp. Sta. Serv. Bull.* 736; Egea (1970). *ITEA* 1: 157-164; Ottman y Byrne (1988). *HortScience* 23: 375-378; Massai y Gucci (1998). *Acta Hort.* 465: 363-369; Kotuby-Amacher *et al.* (2000). *Electronic Publication AG-SQ-03. Utah State University Extension. Logan*; Bolat *et al.* (2006). *J. Plant Nutr.* 29: 553-564). De este modo, los resultados obtenidos en el cultivo *in vitro* de ápices de raíz aislados queda validado y por tanto, se puede afirmar que los patrones de frutales tolerantes al estrés salino seleccionados *in vitro* también serán tolerantes en planta entera.

La salinización de los suelos donde crecen frutales causa graves pérdidas económicas en los países mediterráneos, por lo que la posibilidad de disponer de materiales vegetales que sean resistentes al estrés salino supone un gran apoyo al sector frutícola.

El método de la presente invención tiene aplicación industrial en los sectores viverista o en el sector de los mejoradores de especies leñosas. En estos sectores industriales se puede aplicar el método de la presente invención como un criterio de selección precoz en sus programas de mejora, para poder seleccionar el material vegetal antes de realizar ensayos en el campo.

En este sentido, el principal aspecto de la presente invención es un método para la detección de patrones de frutales tolerantes al estrés salino que comprende:

- a. Cultivar *in vitro* un fragmento apical de la raíz de un patrón de frutal en un medio de crecimiento que contiene una concentración de entre 40 y 80 mM de cloruro sódico (NaCl),
- b. medir la longitud de la raíz del apartado (a) en un tiempo comprendido entre 14 y 28 días desde que se inició el cultivo,
- c. comparar la longitud de la raíz con la longitud de la raíz de un control de referencia.

El término “patrón” tal como se entiende en la presente invención hace referencia a una planta sobre la que se injerta el árbol frutal de la variedad deseada que formará la parte aérea. El patrón también se conoce como portainjerto. Por tanto, el árbol frutal cultivado se caracteriza por estar formado por la unión de dos individuos por medio del injerto. El patrón o portainjerto es el que constituye el sistema radical y una parte del tronco, sobre el cual se injerta la yema, estaquilla o púa del otro (variedad de árbol frutal deseada) que formará en definitiva la copa o parte aérea y producirá los frutos. El patrón se usa para aportar resistencias a la variedad de frutal injertada frente a estreses causados principalmente a la parte radicular de la planta. Además, hay patrones que aumentan el vigor de la parte aérea, otros posibilitan la variación en la entrada en fructificación, influyen en la productividad, calidad de la fruta o maduración.

El término “tolerantes al estrés salino” hace referencia a la mayor capacidad de resistencia del patrón de la presente invención frente a determinadas concentraciones de NaCl (se describe más adelante) respecto de la resistencia que muestra el patrón control (se describe más adelante).

La salinidad afecta al crecimiento y producción de los cultivos al reducir el potencial hídrico de la solución del suelo, disminuyendo así la disponibilidad de agua, y al crear un desequilibrio nutritivo, dada la elevada concentración de elementos (Na^+ , Cl^-) que pueden interferir con la nutrición mineral y el metabolismo celular. En consecuencia, los diversos efectos observados a distinta escala, desde reducción de turgencia y crecimiento hasta la pérdida de la estructura celular por desorganización de membranas e inhibición de la actividad enzimática, son el producto combinado de estrés hídrico, toxicidad iónica y desequilibrio nutricional.

Las diferentes características genotípicas de los patrones (por mínimas que sean) pueden causar diferencias fenotípicas relacionadas con el aumento de la tolerancia al estrés salino. El método de la presente invención permite seleccionar el/los patrón/es tolerantes al estrés salino en una etapa temprana, antes de que se lleve a cabo su plantación o experimentación en campo. Los patrones tolerantes pueden activar múltiples mecanismos: aumento de la capacidad de obtener y/o retener agua, restitución de la homeostasis iónica que son consecuencia de cambios bioquímicos (síntesis de ácido abscísico, solutos osmoprotectores o cambios en la actividad de canales o transportadores de membranas), fisiológicos (alteración de la permeabilidad de las membranas a los iones y al agua, cierre estomático, disminución de transpiración y fotosíntesis, etc.) o por la activación y transcripción de genes entre cuyos efectos está la modificación de rutas biosintéticas que resultan en ajuste osmótico y la protección de las estructuras celulares.

Una planta leñosa es cualquier planta vascular con un tallo perenne, por encima de la superficie del suelo, y cubierto de una capa de espesa corteza, que es, el tallo soporte del crecimiento continuo vegetativo por encima del suelo.

Un árbol frutal (se emplea indistintamente el término frutal) es una planta leñosa productora de frutos. El término árbol frutal es usado en horticultura para designar a los árboles frutales como los que proveen frutos como alimento del ser humano.

ES 2 350 070 A1

5 Según una realización preferida del método de la presente invención los frutales son frutales que producen frutos con hueso. Los frutos con hueso son frutos simples indehiscentes cuyo interior es succulento. Los frutos con hueso se denominan drupa. La drupa contiene una sola semilla. El mesocarpio de la drupa suele ser carnoso como en el caso del melocotón, ciruelo o cerezo. En el caso de la almendra, el interés del fruto es la semilla. El endocarpio de la drupa es pétreo.

Una parte de este árbol frutal, yema, estaquilla o púa, sin limitarse a estas partes en exclusiva, se injerta sobre el patrón definido anteriormente.

10 Las condiciones de cultivo *in vitro* del método de la presente invención se describen en el ejemplo 1. Para ello se corta un fragmento apical de la raíz de un patrón de frutal que proviene de cultivos en condiciones axénicas y se cultiva en un medio de crecimiento que comprende nutrientes necesarios para que las raíces puedan mantener su metabolismo tal como se describe en el ejemplo 1. El medio de crecimiento contiene, además, una concentración de entre 40 y 80 mM de NaCl. En una realización más preferida el medio de crecimiento contiene una concentración de entre 50 y 70 mM de NaCl.

15 En el siguiente paso del método se mide la longitud de la raíz del apartado (a) en un tiempo comprendido entre 14 y 28 días desde que se inició el cultivo. Una vez que se han obtenido las medidas de longitud de los fragmentos de las muestras de raíz de patrones de frutales, se comparan con las medidas de la longitud de la raíz de un control de referencia. El control de referencia es un patrón del mismo genotipo cuyos fragmentos de raíz se cultivan en un medio de cultivo sin NaCl, de tal forma que los patrones más tolerantes muestran un crecimiento mayor o igual al 50% del crecimiento de la raíz del control de referencia, mientras que los patrones menos tolerantes muestran crecimientos en esas condiciones inferiores al 50% del crecimiento de la raíz del control sin sal, y estas diferencias de crecimiento son estadísticamente significativas. El método se debe realizar con los valores promedio de un número representativo de raíces del mismo genotipo que se cultivan, tanto en condiciones de estrés salino, como en las mismas condiciones sin sal, lo que origina el valor control de referencia. El método se realiza con un diseño experimental adecuado que minimice el error experimental debido al azar y que permita su evaluación.

20 Como control de referencia también puede utilizarse un patrón del mismo genotipo cuya respuesta al estrés salino es conocida. La respuesta al estrés salino del control, en términos de longitud de raíz y/o número de granos de almidón, puede ser la respuesta deseada de los patrones que se han de seleccionar o una respuesta mínima, tomando en consideración un número representativo de muestras de raíces.

25 Según otra realización preferida del método, se seleccionan los patrones de frutales, preferiblemente frutales que producen frutos con hueso, cuya longitud media de las raíces es mayor o igual al 50% de la longitud media de las raíces del control de referencia. El término "longitud media" hace referencia al valor promedio de las longitudes de las raíces de cada ejemplar de patrón evaluado.

30 El estrés salino afecta negativamente al crecimiento de las raíces y la acumulación de almidón se ve aumentada como material de reserva de energía frente a condiciones adversas. En el caso de las raíces procedentes de patrones control, el crecimiento de las mismas se ve más afectado que las raíces de patrones más tolerantes.

Otra realización preferida es el método de detección de patrones de frutales tolerantes a estrés salino que además comprende:

- 35
- 45 d. analizar el contenido de almidón de las raíces del apartado (b) hasta los primeros 20 mm medidos desde el ápice de la raíz y
 - 50 e. comparar el contenido de almidón de las raíces con el contenido de almidón de las raíces de un control de referencia.

55 El análisis del almidón de la raíz consiste en realizar el corte en una zona adecuada de la raíz (tal como se describe más adelante) y fijar el almidón del corte, preferiblemente en glutaraldehído, teñir y observar los granos de almidón en un microscopio. Se pueden tomar microfotografías digitales y realizar un conteo de al menos 20 raíces por tratamiento. Según una realización más preferida del método, se analiza el almidón en la zona comprendida entre 5 y 15 mm medidos desde el ápice de la raíz.

60 Se establece una escala mediante la cual se determina que los fragmentos de raíz de los patrones más tolerantes muestran un contenido de entre 0-5 de granos de almidón (contenido escaso o ausente), mientras que los fragmentos de raíz procedentes de patrones menos tolerantes muestran un contenido mayor de 5 granos de almidón (contenido abundante) distribuidos por el corte. El control de referencia es el mismo que el que se ha definido para el caso de la medida de la longitud de raíz.

65 Según otra realización más preferida, el medio de crecimiento contiene una concentración de entre 10 y 30 mM de NaCl y, según otra realización aún más preferida, el medio de crecimiento contiene una concentración de entre 15 y 25 mM de NaCl.

ES 2 350 070 A1

Otra realización preferida es el método mediante el cual se seleccionan los patrones de frutales cuya longitud de raíz es mayor o igual al 50% de la longitud media de las raíces del control de referencia y la cantidad de granos de almidón es de entre el n° medio de granos de almidón de las raíces del control de referencia y el n° medio más 5. El término “n° medio” hace referencia al valor promedio del número de granos de almidón contados en las raíces de cada ejemplar de patrón evaluado.

Como control de referencia también puede utilizarse un patrón del mismo genotipo cuya respuesta al estrés salino es conocida. La respuesta al estrés salino del control, en términos de número de granos de almidón, puede ser la respuesta deseada de los patrones que se han de seleccionar o una respuesta mínima. En este caso, la selección de los patrones tolerantes se llevará a cabo mediante un criterio de selección, basado en el número de granos de almidón, adaptado al contenido de granos de almidón del control de referencia, teniendo en cuenta las consideraciones acerca del comportamiento de los patrones de la presente invención frente al cultivo *in vitro* y el contenido de NaCl.

La medida de la cantidad de almidón en la zona definida anteriormente de la raíz, está relacionada con la concentración de sal, es decir, se encuentra más almidón a medida que se incrementa la cantidad de sal añadida al medio de cultivo, de igual forma que sucede con el crecimiento de las raíces, pero estas dos medidas no están correlacionadas necesariamente entre sí, en la zona y en el momento de la evaluación, ya que responden, en su inicio, a distintos mecanismos. Por una parte, en las plantas enteras, las raíces son órganos receptores natos de azúcares, que son formados en las partes verdes por medio de la fotosíntesis. Cuando los tejidos son cultivados *in vitro*, mantienen el mecanismo de absorción de azúcares que son utilizados como fuente de energía y de carbono para el crecimiento, y bajo condiciones de estrés, se sintetiza almidón (Thorpe *et al.* (1986). *Physiol. Plant.* 66: 58-62). Así, se correlaciona la concentración de NaCl en el medio de cultivo y el metabolismo del almidón.

La medida de la cantidad de almidón asegura que los patrones de frutales tolerantes, seleccionados mediante la medida de la longitud de raíz, son adecuados. Además, la medida de la cantidad de almidón ayuda a seleccionar aquellos patrones tolerantes cuyo crecimiento de los fragmentos de la raíz no responde de manera óptima al tratamiento con NaCl, es decir, que los fragmentos de raíz de los patrones de frutales tienen valores de longitud de raíz menores del 50% de la longitud del control de referencia. En este caso, la medida de la cantidad de granos de almidón en los fragmentos de raíz de los patrones de frutales sometidos a estrés salino ayuda a la identificación de los patrones tolerantes. La cantidad de granos de almidón también puede usarse en los casos en los hay gran variabilidad de respuesta en el crecimiento de las raíces, por falta de homogeneidad de las raíces o por factores no controlados.

El contenido de almidón de reserva en las raíces cultivadas muestra un gradiente desde el ápice, donde no está presente, hasta la zona basal, donde se acumula principalmente en las células del córtex. En el ápice existe almidón formando pequeños granos con funciones distintas a las de reserva de energía (estanolitos para el geotropismo) que no puede ser confundido. Este gradiente encontrado hace difícil comparar raíces, ya que varía en función del desarrollo de la raíz, y su desarrollo varía de una raíz a otra y del ápice a la base. En la presente invención se ha determinado que la zona de maduración de la raíz tiene lugar en una zona comprendida en los primeros 20 mm desde el ápice de la raíz y más preferiblemente entre 5 y 15 mm del ápice. La medida de los granos de almidón en esta zona permite la comparación entre diferentes raíces independientemente de su longitud, ya que esta zona mantiene en todas las raíces el mismo estado fisiológico y anatómico, por ser la zona donde los tejidos se diferencian y se vuelven funcionales (zona de maduración).

Según otra realización preferida, los patrones de frutales son del género *Prunus*. Las especies que comprenden el género *Prunus* son, sin limitarse, *P. adenopoda*, *P. alabamensis*, *P. alleghaniensis*, *P. americana*, *P. andersonii*, *P. angustifolia*, *P. arborea*, *P. armeniaca* (albaricoquero), *P. avium* (cerezo dulce), *P. carolinae*, *P. caroliniana*, *P. cerasifera*, *P. cerasus* (guindo), *P. ceylanica*, *P. clementis*, *P. cocomilia*, *P. domestica*, *P. dulcis* (almendro), *P. emarginata*, *P. ernestii*, *P. fasciculata*, *P. fremontii*, *P. fruticosa*, *P. geniculata*, *P. glandulosa*, *P. gracilis*, *P. havardii*, *P. hortulana*, *P. insititia* (ciruelo), *P. ilicifolia*, *P. japónica*, *P. laurocerasus*, *P. lusitanica*, *P. maackii*, *P. mahaleb*, *P. marítima*, *P. maximowiczii*, *P. mexicana*, *P. minutiflora*, *P. mume*, *P. munsoniana*, *P. murrayana*, *P. myrtifolia*, *P. nigra*, *P. occidentalis*, *P. gadus*, *P. pedunculata*, *P. pensylvanica*, *P. pleuradenia*, *P. pumila*, *P. rivularis*, *P. salicina*, *P. serótina*, *P. persica* (melocotonero), *P. serrulata*, *P. spinosa*, *P. subcordata*, *P. subhirtelia*, *P. tomentosa*, *P. susquehanae*, *P. tenella*, *P. texana*, *P. tomentosa*, *P. triloba*, *P. umbellata*, *P. virginiana* o cualquiera de sus híbridos.

En una realización aún más preferida, los patrones de frutales se seleccionan de la lista que comprende *Prunus insititia*, *Prunus cerasifera x munsoniana*, *Prunus cerasus* o *Prunus dulcis x persica*.

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.

Descripción de las figuras

Figura 1

5 *Muestra los valores promedio de los incrementos relativos de la longitud de las raíces a concentraciones crecientes de NaCl*

Los patrones de tipo ciruelo Adesoto 101 y Marianna 2624 (*Prunus insititia* L., *Prunus cerasifera* x *munsoniana*) (símbolos blancos), muestran mayores incrementos relativos de la longitud de las raíces a 60 mM que los patrones del tipo cerezo Mastro de Montañana y CAB 6P (*Prunus cerasus*) y que el híbrido almendro x melocotonero GF 677 (*Prunus dulcis* x *persica*) (símbolos negros) (n=10, 3 repeticiones). Incr. (%): Incrementos medidos en porcentaje respecto de patrones crecidos en ausencia de NaCl (control).

Figura 2

15 *Muestra el incremento relativo de la longitud de las raíces de los diferentes patrones a 60 mM de NaCl*

Los círculos blancos muestran los datos individuales de los incrementos relativos a la longitud de las raíces del control cuando los fragmentos de raíz son cultivados a 60 mM de NaCl, mientras que los círculos negros representan los valores promedio con sus correspondientes barras de error estándar (n=30).

Figura 3

25 *Muestra las curvas mejor ajustadas (líneas continuas) a los datos del incremento relativo de la longitud de las raíces, agrupadas según el grado de tolerancia de los patrones, frente a la concentración de NaCl in vitro*

El grupo de patrones más tolerantes (A) comprende los ciruelos “Adesoto 101” y “Marianna 2624”, mientras que el grupo de patrones menos tolerantes (B) comprende los cerezos “Mastro de Montañana” y CAB 6P y el híbrido almendro x melocotonero GF 677. Se incluyen bandas de predicción de los datos, asociadas al intervalo de confianza del 95% (líneas discontinuas), y bandas de confianza (líneas de puntos), asociadas al error estándar de la media (SEM).

Para el grupo A: $y=98.6980+0.01998x-0.003036x^2$, con un coeficiente de determinación, $R^2=0.4349$; para el grupo B $y=103.5-1.210*x+0.003641x^2$, $R^2=0.5828$.

Figura 4

Muestra la longitud de las raíces y contenido de almidón de secciones de raíz tomadas a 10 mm del ápice de los patrones “Adesoto 101” y “Mastro de Montañana” cultivadas a 20 mM y 60 mM de NaCl

40 El contenido de almidón se cuantifica según el número de granos de almidón: ausente (0); escaso (de entre 1-5) y abundante (más de 5).

Ejemplos

45 A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos que describen el método para la detección de patrones de frutales tolerantes al estrés salino.

Ejemplo 1

50 *Materiales y métodos*

1.1. Material vegetal

55 Los patrones del género *Prunus* de diferentes especies utilizadas en este trabajo fueron: “Adesoto 101” (*P. insititia* L.) y “Marianna 2624” (*P. cerasifera* x *munsoniana*), ambos del tipo ciruelo; “Mastro de Montañana” y CAB 6P, ambos patrones de tipo cerezo (*P. cerasus* L.) y el patrón híbrido almendro x melocotonero GF 677 (*P. dulcis* x *persica*).

1.2. Cultivo de raíces y tratamientos con NaCl

60 Las raíces se obtuvieron de brotes micropropagados *in vitro* durante más de 1 año, siguiendo métodos ya descritos (Andreu y Marín (2005). *Scientia Horticulturae* 106: 258-267) usando un medio MS (Murashige y Skoog (1962). *Physiologia Plantarum* 15:473-497) modificado con 0.4 mg.l-1 de tiamina-HCl, y un 3% de sacarosa, el pH se ajustó a 5.5 y se gelificó con Difco-Bacto agar al 0.7%. Los brotes se enraizaron en el mismo medio, pero con los macronutrientes a la mitad de la concentración, sin BAP y con 5.0 μ M de IBA. El medio de enraizamiento se dispensó en contenedores de polipropileno de 700 ml de capacidad (Sigma P4928) y se autoclavaron 20 minutos a 121°C.

Se tomaron ápices de 10 mm de longitud de raíces cortadas en una placa de Petri colocada sobre papel milimetrado. Se cultivaron 10 ápices de raíz por tratamiento en “Baby Food Jars” (Sigma V8630) con tapas Magenta de

ES 2 350 070 A1

polipropileno (Sigma B8648) con 30 ml de medio líquido con la misma composición que la descrita previamente para la micropropagación de los brotes, pero sin reguladores de crecimiento (Marín y Marín (1998). *Plant Cell Reports* 18: 350-355) y se colocaron en oscuridad en un agitador orbital a 90 r.p.m. en una cámara de cultivo a 24°C. El estrés salino se aplicó añadiendo al medio 4 concentraciones de NaCl: 0 (control), 20, 60 y 180 mM. La conductividad eléctrica total a 25°C de los medios de cultivo obtenidos fue de 6.0, 8.2, 12.5, y 23.6 dS·m⁻¹, respectivamente. El experimento completo se repitió 3 veces.

Los cultivos de raíces se evaluaron a las 3 semanas y la longitud de las raíces se midió sobre un papel milimetrado. Para los estudios anatómicos se realizaron cortes de raíz a mano alzada con una cuchilla de afeitar y se observaron en fresco o tras una fijación en glutaraldehído al 2.5% en tampón fosfato 0.03M (pH 7.2). Se tiñeron con I2KI (Johansen (1940). *Plant Microtechnique*. Mc Graw- Hill Book. New York-London) para observar el almidón en un microscopio Olympus AX60. Se tomaron microfotografías digitales con una cámara Olympus Camedia Z7070. Se observaron, al menos, 20 raíces por tratamiento de “Adesoto 101” (patrón del tipo ciruelo, más tolerante al estrés salino) y de “Masto de Montañana” (patrón de tipo cerezo, menos tolerante) y se midió su longitud.

1.3. Análisis de datos

Para comparar el efecto de la sal en el crecimiento de las raíces entre repeticiones y patrones, se calculó el incremento relativo de la longitud de cada raíz como porcentaje del incremento promedio de las raíces control. Se realizaron análisis de regresión utilizando el programa estadístico R (R Development Core Team (2008). *R Foundation for Statistical Computing*, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>).

Ejemplo 2

Medida del crecimiento de las raíces

Las raíces cultivadas en medio líquido crecieron con diferentes tasas de crecimiento que dependieron del genotipo y de la concentración de cloruro sódico (NaCl). La longitud de las raíces tras 3 semanas de cultivo mostró una variabilidad considerable en cada patrón. En ausencia de NaCl (tratamiento control), el patrón “Masto de Montañana” mostró el mayor crecimiento de raíces (45.6 mm de promedio) seguido de CAB 6P (37.4 mm), GF 677 (31.8 mm), “Adesoto 101” (31.0 mm) y “Marianna 2624” (24.1 mm). El incremento de la longitud de las raíces disminuyó en todos los patrones a medida que la concentración de sal aumentó, pero no de un modo uniforme, es decir en los patrones del grupo ciruelo, descrito anteriormente como más tolerante, la disminución del crecimiento fue menor que en el resto de patrones al aumentar el estrés salino. La comparación del crecimiento de las raíces entre los distintos patrones se realizó tras calcular los incrementos relativos de las longitudes de las raíces (crecimiento de las raíces expresados como porcentajes del crecimiento promedio de las raíces control de cada patrón). La Fig. 1 muestra cómo los incrementos relativos de la longitud de las raíces de los diferentes patrones disminuyeron a concentraciones de NaCl crecientes, siguiendo dos modelos de crecimiento diferentes que alcanzaron la mayor diferencia a una concentración de 60 mM de NaCl. Mientras los patrones del tipo ciruelo (“Adesoto 101” y “Marianna 2624”) mostraron un crecimiento de raíces similar al control, a esta concentración de NaCl, el resto de los patrones (los patrones de cerezo “Masto de Montañana” y CAB 6P, y el patrón híbrido almendro x melocotonero GF677) solo alcanzaron un 40% del crecimiento del control.

Las diferencias en el incremento relativo de la longitud de las raíces a 60 mM de NaCl fueron estadísticamente significativas según el análisis de la varianza (ANOVA) resumido en la Tabla 1.

TABLA 1

Análisis ANOVA del incremento relativo de la longitud de las raíces de los diferentes patrones a 60 mM de NaCl

	DF	SS	F	Pr(>F)
Patrón	4	65937	11.818	2.45·10⁻⁸ ***
Error	145	202254		

En esta tabla y en las sucesivas se incluyen los parámetros más representativos del análisis de varianza: grados de libertad del factor o tratamiento (DF); suma de cuadrados (SS); estadístico F (F) y la probabilidad de que el valor F sea obtenido bajo condiciones de ausencia de diferencias significativas entre tratamientos (aquí patrones) y su nivel de significación estadística: n.s., no significativo; *, significativo al 5%; **, significativo al 1%; ***, significativo al 0.1%).

Además, las diferencias en el incremento relativo de las raíces fueron estadísticamente significativas entre el grupo de los patrones más tolerantes al estrés salino (patrones del tipo ciruelo) y los menos tolerantes (patrones del tipo cerezo e híbrido). Sin embargo, no hubo diferencias en el incremento relativo de las raíces de los patrones dentro de cada grupo (Tabla 2, Fig. 2).

TABLA 2

Separación de medias del incremento relativo de la longitud de las raíces de los diferentes patrones a 60 mM de NaCl (Bonferroni's adjusted t-test)

	Adesoto 101	Marianna 2624	Masto	CAB 6P
Marianna 2624	1.00 n.s.	-	-	-
Masto	$5.1 \cdot 10^{-5}$ ***	$4.9 \cdot 10^{-4}$ ***	-	-
CAB 6P	$3.3 \cdot 10^{-5}$ ***	$2.4 \cdot 10^{-4}$ ***	1.00 n.s.	-
GF 677	$2.1 \cdot 10^{-4}$ ***	$1.83 \cdot 10^{-3}$ **	1.00 n.s.	1.00 n.s.

Los valores representan la probabilidad de que los valores del test t sean mayores que el correspondiente valor de t para cada comparación de medias ($Pr > t$) (n.s.: no significativo; **, ***: significativo al 1% y al 0.1% respectivamente). Los patrones del grupo más tolerante (Adesoto 101 y Marianna 2624) muestran diferencias muy significativas con los patrones del grupo menos tolerante (Masto de Montañana, CAB 6P y GF 677), sin embargo, dentro de cada grupo las diferencias no son significativas.

Estos resultados muestran que en las condiciones experimentales descritas y a una concentración de NaCl de 60 mM ha sido posible determinar el grado de tolerancia al estrés salino de los patrones y que esta tolerancia está de acuerdo con los resultados descritos previamente en estudios con plantas enteras. La realización del análisis de regresión de los incrementos de longitud de las raíces frente a la concentración de NaCl mostró que tanto la sal como el tipo de patrón tuvieron un efecto muy significativo en el crecimiento de las raíces (Tabla 3).

TABLA 3

Análisis ANOVA de regresión del incremento relativo de la longitud de las raíces de los diferentes patrones y de la concentración de NaCl

	DF	SS	F	Pr(>F)
Concentración	1	841763	575.40	$2.2 \cdot 10^{-16}$ ***
Concentración2	1	4609	3.15	0.076 n.s.
Patrón	4	29192	4.99	$5.84 \cdot 10^{-4}$ ***
Concentración:Patrón	4	1531	0.26	0.9025 n.s.
Concentración2:Patrón	4	54653	9.34	$2.54 \cdot 10^{-7}$ ***
Error	585	855800		

(n.s.: no significativo; ***: significativo al 0.1%)

El análisis de regresión entre el incremento relativo de la longitud de las raíces y la concentración de NaCl indicó que los patrones mostraron diferente comportamiento frente al incremento de sal, ya que, además del efecto significativo de la concentración de sal y del patrón, existía una interacción altamente significativa entre el cuadrado de la concentración de sal y el patrón (Tabla 3), lo que indica que existen diferentes tipos de respuesta a la sal según el patrón. El análisis de regresión conjunto de los patrones, agrupados según su grado de tolerancia permitió distinguir significativamente dos tipos de comportamiento en los patrones, ya que la interacción entre el cuadrado de la concentración y el grupo de patrones se mantenía altamente significativa, indicando que el estrés salino afectó de forma diferente a cada grupo de patrones según su grado de tolerancia (Tabla 4).

ES 2 350 070 A1

TABLA 4

Análisis ANOVA de regresión del incremento relativo de la longitud de las raíces de los diferentes patrones agrupados según su grado de tolerancia y de la concentración de NaCl

	DF	SS	F	Pr(>F)
Concentración	1	839852	567.26	$2.2 \cdot 10^{-16}$ ***
Concentración2	1	8250	5.57	0.0186 *
Tolerancia (T.Grupo)	1	23125	15.62	$8.68 \cdot 10^{-5}$ ***
Concentración:T.Grupo	1	975	0.66	0.4174 n.s.
Concentración2:T.Grupo	1	41748	28.20	$1.55 \cdot 10^{-7}$ ***
Error	594	879437		

(n.s.: no significativo; *,***: significativo al 5% y al 0.1% respectivamente).

Sin embargo, la significación desapareció cuando el análisis se realizó para cada grupo de patrones, indicando que, dentro de cada grupo, los patrones se comportaban de forma similar (Tablas 5 y 6).

TABLA 5

Análisis ANOVA de regresión del incremento relativo de la longitud de las raíces del grupo de patrones más tolerantes al estrés salino frente a la concentración de NaCl

	DF	SS	F	Pr(>F)
Concentración	1	366358	174.17	$2.2 \cdot 10^{-16}$ ***
Concentración2	1	18037	8.58	0.0037 **
Patrón	1	291	0.14	0.71 n.s.
Concentración:Patrón	1	152	0.07	0.79 n.s.
Concentración2:Patrón	1	298	0.14	0.71 n.s.
Error	233	490098		

(n.s.: no significativo; **, ***: significativo al 1% y al 0.1% respectivamente).

TABLA 6

*Análisis ANOVA de regresión del incremento relativo de la longitud de las raíces del grupo de patrones menos tolerantes al estrés salino frente a la concentración de NaCl (n.s.: no significativo; ***: significativo al 0.1%)*

	DF	SS	F	Pr(>F)
Concentración	1	476261	457.60	$2.2 \cdot 10^{-16}$ ***
Concentración2	1	39833	38.27	$1.71 \cdot 10^{-9}$ ***
Patrón	2	82	0.04	0.96 n.s.
Concentración:Patrón	2	325	0.16	0.86 n.s.
Concentración2:Patrón	2	258	0.12	0.88 n.s.
Error	351	365317		

La significación encontrada para el término “concentración elevada al cuadrado” indica que la respuesta de los patrones a la sal se desvía de la linealidad, por lo que este factor debe ser incluido en los análisis.

La realización de una regresión polinomial permitió hallar el mejor ajuste de la respuesta de los patrones al incremento de la concentración salina, siendo en todos los casos un polinomio de segundo grado, pero con diferentes coeficientes según el modelo de comportamiento. Por una parte, los patrones más tolerantes tenían coeficientes negativos para el término elevado al cuadrado, lo que indica un modelo cóncavo; por otra parte, los patrones menos tolerantes mostraron coeficientes positivos en el término elevado al cuadrado, indicando un modelo convexo (Figura 3). Esta diferencia en los modelos de respuesta corresponde a la interacción significativa encontrada en los análisis de la regresión citados anteriormente y está relacionada con el efecto del estrés salino en el crecimiento de las raíces de los patrones que es mayor cuanto menor es su tolerancia, y que ha podido ser determinada en las condiciones experimentales proporcionadas.

15 Ejemplo 3

Medida del contenido de almidón.

Los granos de almidón se acumularon en la zona del córtex a altas concentraciones de NaCl, pero hubo diferencias claras entre patrones (Fig. 4). “Adesoto 101” no acumuló almidón a concentraciones de 0 mM y 20 mM de NaCl, pero cuando la concentración de sal aumentó a 60 mM, hubo presencia de almidón en algunas raíces en cantidad variable y la cantidad de almidón estuvo relacionada con la longitud de las raíces, y portante con su crecimiento. Así, mientras las raíces más activas (más largas) no mostraban granos de almidón, las menos activas (raíces más cortas) mostraron presencia de almidón de escasa a abundante, y el efecto de la longitud de las raíces en la acumulación de almidón en la zona de maduración de la raíz fue muy significativa estadísticamente (Tabla 7).

TABLA 7

ANOVA de regresión del incremento relativo de la longitud de las raíces de “Adesoto 101” en la acumulación de almidón en células de la raíz a 10 mm del ápice cultivadas a 60 mM de NaCl

	DF	SS	F	Pr(>F)
Longitud de la raíz	1	8.8579	25.246	$3.5 \cdot 10^{-5}$ ***
Error	21	8.7717		

(***: significativo al 0.1%).

La longitud de las raíces y el contenido de almidón mostraron, igualmente, un alto coeficiente de correlación negativo ($r = -0.79$; con una probabilidad de $6.3 \cdot 10^{-7}$) a una concentración de NaCl de 60 mM. Cerca del 50% de la variabilidad en el contenido del almidón fue explicado por el efecto de la longitud de las raíces (R^2 ajustada = 0.4825).

Por otra parte, “Masto de Montañana”, mostró granos de almidón incluso en el control (0 mM NaCl). Sin embargo, la concentración de NaCl también tuvo un efecto significativo en la acumulación de almidón (Tabla 8).

TABLA 8

Análisis ANOVA de regresión de concentraciones crecientes de NaCl (0, 20 y 60 mM) en la acumulación de almidón en células de raíces de “Masto de Montañana” a 10 mm del ápice (***: significativo al 0.1%)

	DF	SS	F	Pr(>F)
Concentración de NaCl	2	11.10	16	$3.02 \cdot 10^{-6}$ ***
Error	57	19.75	0.3509	

Ejemplo 4

Análisis de correlación entre la medida de la longitud de las raíces y el contenido de almidón

5 La concentración de sal y la acumulación de almidón mostraron una correlación positiva y significativa de 0.57 (con una probabilidad de $1.53 \cdot 10^{-6}$), y la varianza explicada por esta relación fue del 34% (R^2 ajustado=0.337). Sin embargo, no se encontró un efecto significativo de la longitud de las raíces de “Masto de Montañana” en el contenido de almidón.

10 El análisis conjunto del contenido de almidón de “Adesoto 101” y “Masto de Montañana” mostró un efecto estadísticamente significativo tanto para el tipo de patrón, como para la concentración de sal (Tabla 9) sin interacción, con una varianza explicada del 61% (R^2 ajustada=0.609).

15

TABLA 9

Análisis ANOVA de regresión del incremento relativo de la longitud de las raíces de “Adesoto 101” y de “Masto de Montañana” en la acumulación de almidón en células de la raíz a 10 mm del ápice cultivadas a 60 mM

20

	DF	SS	F	Pr(>F)
Patrón	1	37.694	113.44	$2.2 \cdot 10^{-16}$ ***
Concentración NaCl	1	7.370	22.18	$9.8 \cdot 10^{-6}$ ***
Patrón:Conc. NaCl	1	0.344	1.04	0.3118 n.s.
Error	83	27.580		

30

(n.s.: no significativo; ***: significativo al 0.1%).

35 Igualmente se encontró una correlación significativa entre el contenido de almidón y el tipo de patrón, pero el valor de esta correlación cambiaba según la concentración de NaCl. El coeficiente de correlación entre el tipo de patrón y el contenido de almidón fue mayor a 20 mM que a 60 mM de NaCl y mayor que con los datos mezclados (Tabla 10).

40

TABLA 10

Coefficientes de correlación Kendall entre “Tipo de patrón” y acumulación de almidón en células de la raíz a 10 mm del ápice a diferentes concentraciones de NaCl

45

	Coefficiente de correlación	p-valor
20 mM NaCl	0.83	$5.6 \cdot 10^{-8}$ ***
60 mM NaCl	0.35	0.01321 *
Datos mezclados	0.68	$2.69 \cdot 10^{-11}$ ***

50

(*,***: significativo al 5 % y al 0.1% respectivamente).

55

60 Además, el coeficiente de correlación entre la concentración de NaCl y la acumulación de almidón cambió según el patrón (Tabla 11). Este coeficiente fue mayor en “Adesoto 101” que en “Masto de Montañana”, siendo todavía menor cuando los datos eran mezclados.

65

ES 2 350 070 A1

TABLA 11

Coefficientes de correlación Kendall entre la concentración de NaCl y la acumulación de almidón en células de la raíz de diferentes patrones a 10 mm del ápice

5

	Ceficiente de correlación	p-valor
Adesoto 101	0.51	0.00037 ***
Masto de Montañana	0.41	0.00830 **
Datos mezclados	0.25	0.01463 *

10

15

(* , ** , ***: Significativo al 5%, 1% y al 0.1% respectivamente)

20

De estos resultados se concluye que el patrón ciruelo (más tolerante) acumula menos almidón en la zona de maduración que el patrón cerezo (menos tolerante) y que a 20 mM de concentración de NaCl, esta diferencia es máxima, pudiendo determinarse claramente el grado de tolerancia.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 350 070 A1

REIVINDICACIONES

1. Método para la detección de patrones de frutales tolerantes al estrés salino que comprende:

- a. Cultivar *in vitro* un fragmento apical de la raíz de un patrón de frutal en un medio de crecimiento que contiene una concentración de entre 10 y 80 mM de cloruro sódico (NaCl),
- b. medir la longitud de la raíz del apartado (a) en un tiempo comprendido entre 14 y 28 días desde que se inició el cultivo,
- c. comparar la longitud de la raíz con la longitud de la raíz de un control de referencia.

2. Método según la reivindicación 1 donde el medio de crecimiento contiene una concentración de entre 50 y 70 mM de NaCl.

3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 donde se seleccionan los patrones de frutales cuya longitud media de las raíces es mayor o igual al 50% de la longitud media de las raíces del control de referencia.

4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 que además comprende

- d. analizar el contenido de almidón de las raíces del apartado (b) hasta los primeros 20 mm medidos desde el ápice de la raíz y
- e. comparar el contenido de almidón de las raíces con el contenido de almidón de las raíces de un control de referencia.

5. Método según la reivindicación 4 donde el medio de crecimiento contiene una concentración de entre 10 y 30 mM de NaCl.

6. Método según la reivindicación 5 donde el medio de crecimiento contiene una concentración de entre 15 y 25 mM de NaCl.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 donde se analiza el almidón en la zona comprendida entre 5 y 15 mm medidos desde el ápice de la raíz.

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7 donde se seleccionan los patrones de frutales cuya longitud media de las raíces es mayor o igual al 50% de la longitud media de las raíces del control de referencia y la cantidad media de granos de almidón es de entre el n° medio de granos de almidón de las raíces del control de referencia y el n° medio más 5.

9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 donde los patrones frutales son frutales que producen frutos con hueso.

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 donde los patrones de frutales son del género *Prunus*.

11. Método según la reivindicación 10 donde los patrones de frutales se seleccionan de la lista que comprende *Prunus insititia* L., *Prunus cerasifera* x *Prunus munsoniana*, *Prunus cerasus* L. o *Prunus dulcis* x *Prunus persica*.

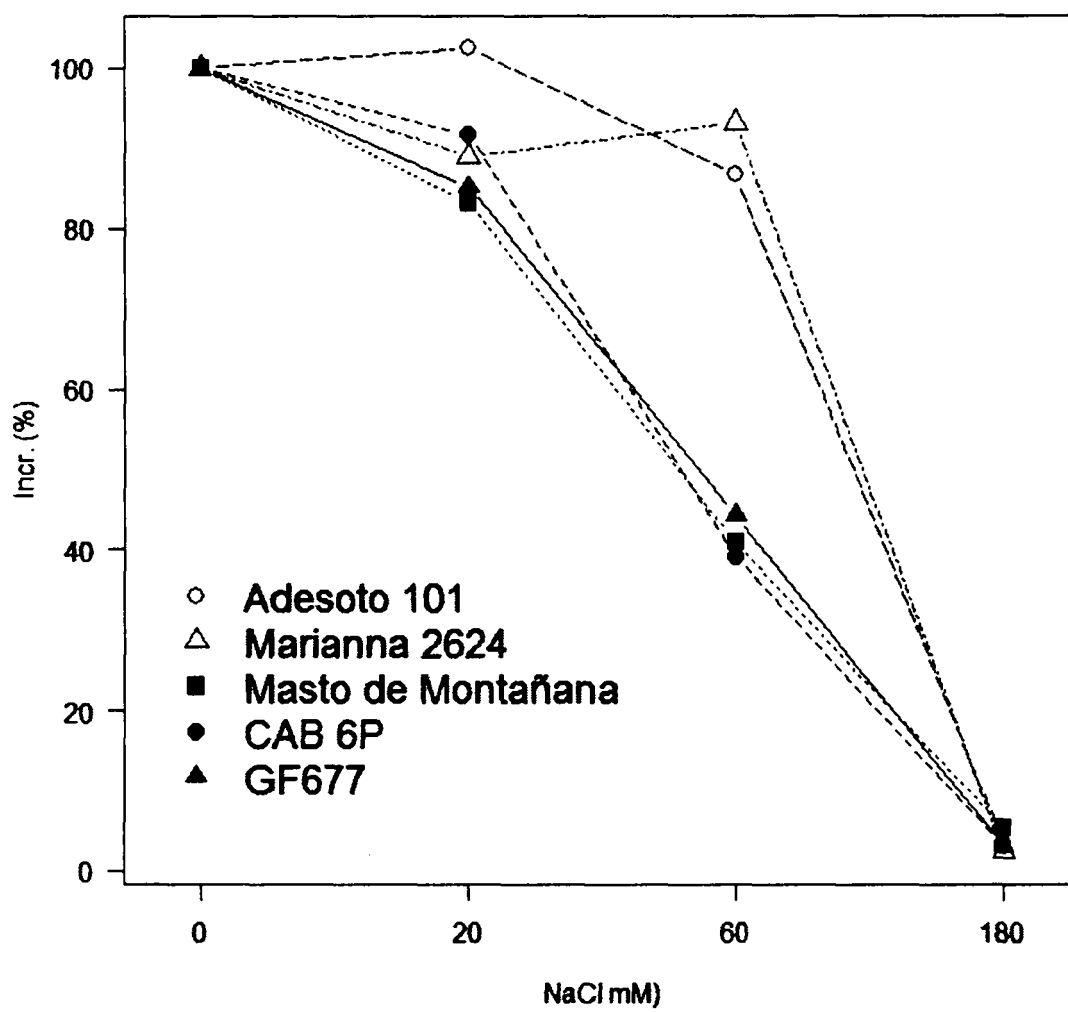


FIG. 1

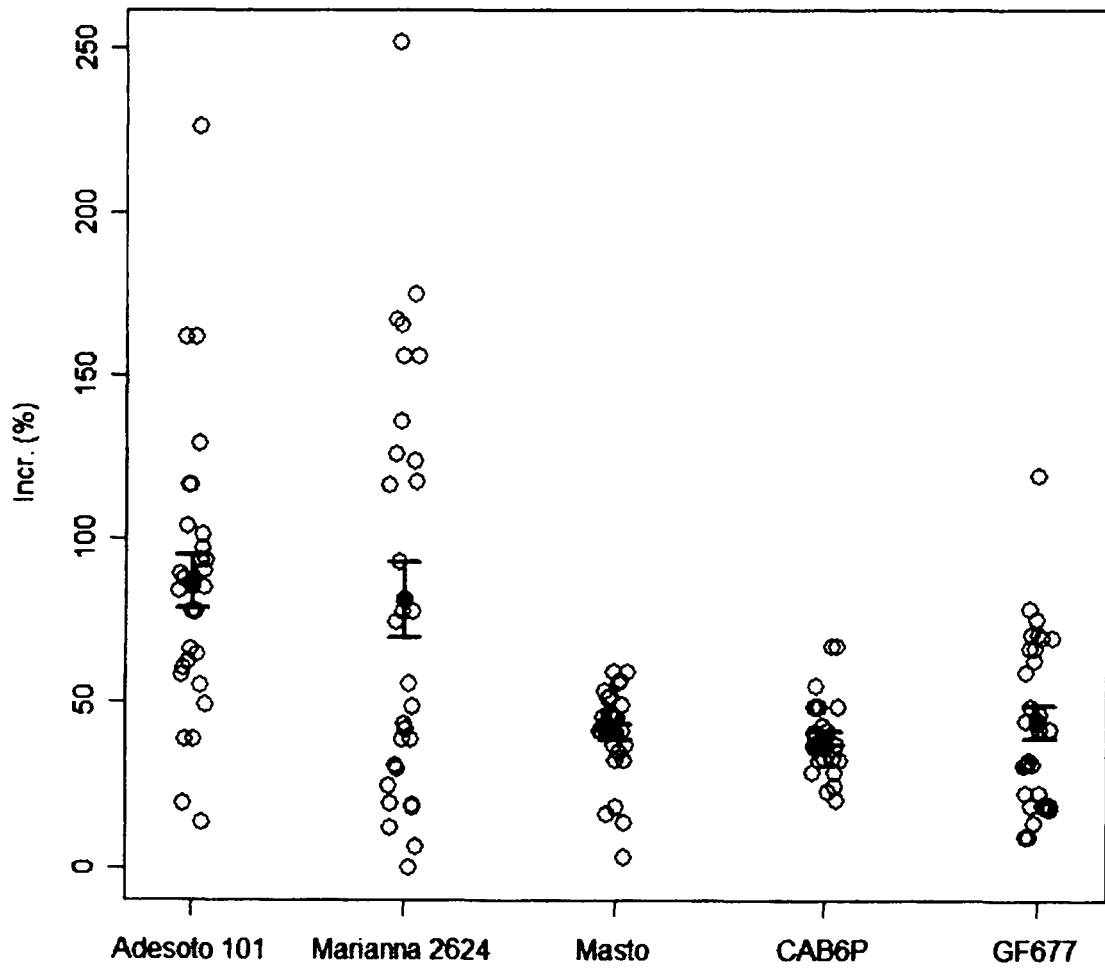


FIG. 2

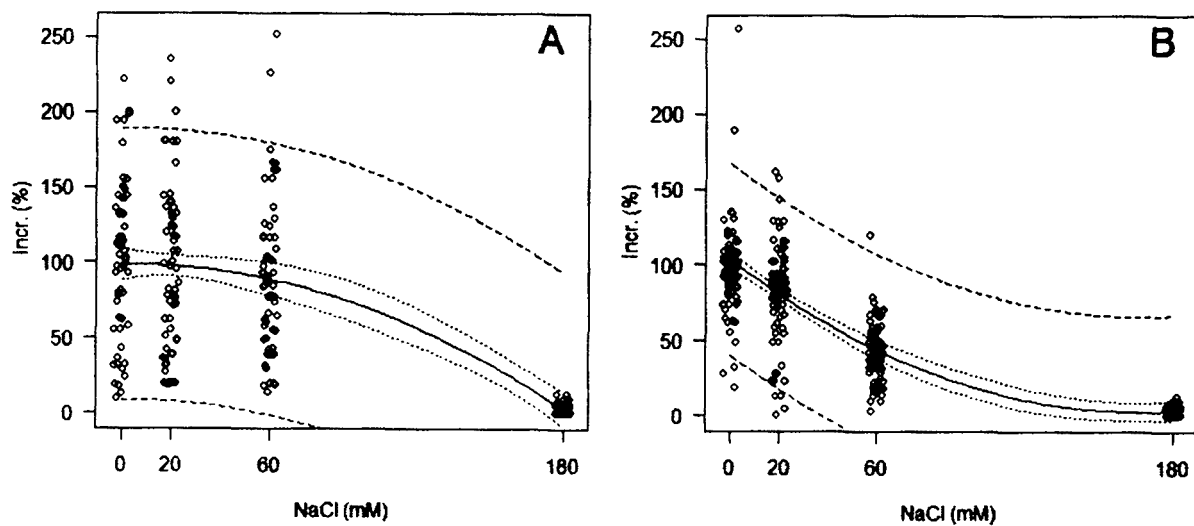


FIG. 3

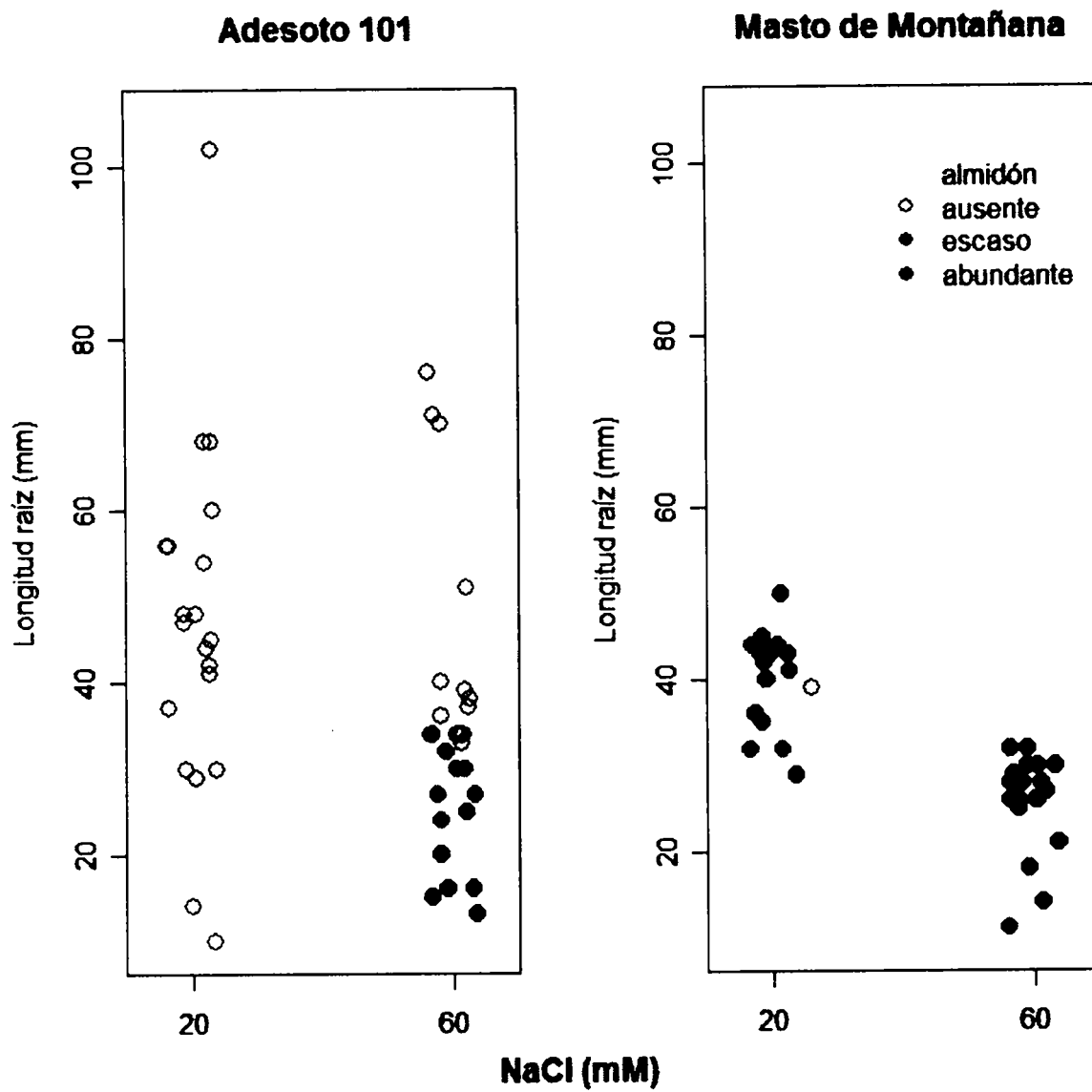


FIG. 4



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud:200803727

②② Fecha de presentación de la solicitud: 29.12.2008

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **A01H1/04**(2006.01)
A01H4/00(2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	VIJAYAN, K. In vitro screening of mulbery (Morus spp.) for salinity tolerance. Plant Cell Reports. Diciembre 2003. Vol.22, Nº 5, páginas 350-357.ISSN 0721-7714. <DOI:10.1007/s00299-003-0695-5>	1-11
A	BRACCI, T. et al. In vitro olive (Olea europaea L.) cvs Frantoio and Moraiolo microshoot tolerance to NaCl. Plant Biosystems. Noviembre 2008. Vol. 142, Nº 3, páginas 563-571. ISSN 1126-3504. <DOI:10.1080/11263500802410918>	1-11
A	HAMROUNI, L. et al. La culture in vitro : un moyen rapide et efficace pour selectionner des genotypes de vigne tolerant la salinite. Comptes Rendus-Biologies. 14 enero 2008. Vol. 331, Nº 2, páginas 152 - 163. ISSN 1631-0691. <DOI:10.1016/j.crv.2007.11.002>	1-11
A	SINGH, A. et al. In vitro screening of citrus rootstocks for salt tolerance. Indian Journal of Genetics & Plant Breeding. Febrero 2004. Vol. 64, Nº 1, páginas 54-57. ISSN 0019-5200.	1-11

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:

Fecha de realización del informe
29.11.2010

Examinador
E. Ulloa Calvo

Página
1/6



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②¹ N.º solicitud:200803727

②² Fecha de presentación de la solicitud: 29.12.2008

③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. Cl.: **A01H1/04**(2006.01)
A01H4/00(2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	PICCHIONI, G. A. et al. Rapid Testing of Salinity Effects on Pistachio Seedling Rootstocks. Journal of the American Society for Horticultural Science. 1991.Vol. 116, Nº 3, páginas 555-559. ISSN 0003-1062.	1-11
A	JONES, M.P. Rapid Evaluation of Salt Tolerance Mangrove-Swamp Rice Varieties. Tropical Agriculture. 1990. Vol. 67, Nº 3,páginas 199-202. ISSN 0041-3216.	1-11

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:

Fecha de realización del informe
29.11.2010

Examinador
E. Ulloa Calvo

Página
2/6

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: 29.11.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-11	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-11	SI
	Reivindicaciones	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	VIJAYAN, K. Plant Cell Reports. Diciembre 2003. Vol.22, Nº 5, páginas 350-357.	12/2003
D02	BRACCI, T. et al. Noviembre 2008. Vol. 142, Nº 3, páginas 563-571.	11/2008
D03	HAMROUNI, L. et al. Comptes Rendus-Biologies. 14 enero 2008. Vol. 331, Nº 2, páginas 152 - 163.	14/01/2008
D04	SINGH, A. et al. Indian Journal of Genetics & Plant Breeding. Febrero 2004. Vol. 64, Nº 1, páginas 54-57.	02/2004
D05	PICCHIONI G A et al. Journal of the American Society for Horticultural Science.1991. Vol.116, Nº 3, páginas 555-559.	1991
D06	JONES, M.P. Rapid Evaluation of Salt Tolerance Mangrove-Swamp Rice Varieties. Tropical Agriculture. 1990. Vol. 67, Nº 3, páginas199-202.	1990

La solicitud describe un método de detección precoz de patrones frutales tolerantes al estrés salino.

El documento D01 mide in vitro la tolerancia a salinidad de distintos genotipos de **mora** a partir del cultivo de **yemas axilares** sobre un medio salino a distintas concentraciones de cloruro sódico. Los parámetros considerados para evaluar esa tolerancia son el crecimiento de brotes y el enraizamiento y la **longitud de las raíces**. En sus antecedentes habla de que algunos autores no consideran adecuado el crecimiento de los brotes en medio salino como indicador de esa tolerancia, y que en cambio sería un buen indicador la medición del crecimiento de las raíces.

El documento D02 analiza in vitro la tolerancia a la sal de **microbrotes** de olivos mediante la medición de parámetros clave, como son la longitud y el peso de las raíces crecidas a distintas concentraciones de sal. Concluye que indicadores relacionados con raíces quizás sean los más adecuados para medir la tolerancia a salinidad de genotipos, a través del cultivo in vitro de brotes.

El documento D03 describe un método rápido de detección de **patrones** frutales (de viñedos) tolerantes al estrés salino a través del cultivo in vitro de **yemas axilares** en un medio de crecimiento con distintas concentraciones de cloruro sódico (20 y 50 mM entre ellas). Analiza la tolerancia en función de la respuesta del cultivo en cuanto a crecimiento, desarrollo y enraizamiento. Establece una correlación positiva entre la vigorosidad del patrón en medio salino y su tolerancia a la sal. El tiempo de cultivo es de 45 días. Los brotes con yemas se obtienen tras cultivar trozos de sarmiento del patrón previamente estilizados.

El documento D04 determina la tolerancia de **patrones** cítricos al estrés salino mediante el cultivo in vitro de **callos** en medio salino durante 6 semanas y posterior evaluación de los mismos.

El documento D05 describe un test rápido de determinación de la tolerancia a la sal de patrones de pistacho. Parte de puntas de raíz de las semillas que lleva al laboratorio para simular situaciones de estrés salino. Mide posteriormente los solutos, llegando a la conclusión de que fugas de los mismos en las raíces, que además conlleva un crecimiento menor de las mismas, es un indicador de esa tolerancia.

El documento D06 evalúa la tolerancia a salinidad de distintas variedades de arroz mediante la medición de la longitud de las raíces de semillas cultivadas en medio salino durante 4 semanas.

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 Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6.1 y 8.1 L.P.)**

El objeto técnico de la solicitud es la detección de patrones frutales tolerantes al estrés salino mediante el cultivo in vitro de un fragmento apical de la raíz sobre medio salino y posterior comparación de la longitud de la raíz crecida con la longitud de la raíz de un control de referencia. Las reivindicación dependiente 4 se refiere a la medición de un parámetro extra para evaluar la tolerancia: el contenido de almidón de esa raíz. Los patrones tolerantes seleccionados son aquellos con longitud media de sus raíces >50% respecto al control y con una cantidad media de granos de almidón igual, o más cinco, respecto al control.

Son conocidos en el estado de la técnica distintos procedimientos in vitro de detección de especies tolerantes al estrés salino, mediante el cultivo in vitro de tejidos de la especie a evaluar sobre distintas concentraciones de sal, y posterior evaluación de parámetros que determinan esa tolerancia (crecimiento, vigorosidad, formación de brotes, enraizamiento,...). Entre las especies existentes algunas se corresponden con patrones frutales (D02-D05). Por otra parte, la medición de la longitud de la raíz como parámetro para determinar la tolerancia ya es conocido por los documentos D01, D02 y D06 evaluando variedades de mora, olivo o arroz.

Sin embargo, no se ha encontrado ningún documento en el estado de la técnica que determine la tolerancia de un patrón frutal mediante el cultivo in vitro de fragmentos apicales de raíz en medio salino para posteriormente analizar la longitud crecida de esa raíz respecto a un control de referencia.

Por tanto, y a la vista del estado de la técnica conocido, las reivindicaciones 1-11 cumplen con el requisito de novedad y actividad inventiva.