



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 154 626**

51 Int. Cl.:
A01H 4/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **99924196 .1**

86 Fecha de presentación : **12.05.1999**

87 Número de publicación de la solicitud: **0996327**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **03.05.2000**

54 Título: **Sistema de regeneración para vides y sus usos.**

30 Prioridad: **15.05.1998 US 85711 P**
29.05.1998 US 87285

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2008

73 Titular/es: **University of Florida**
223 Grinter Hall
Gainesville, Florida 32611-5500, US

72 Inventor/es: **Gray, Dennis, J.;**
Subramanian, Jayasankar y
Litz, Richard, E.

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 154 626 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

ES 2 154 626 T3

DESCRIPCIÓN

Sistema de regeneración para vides y sus usos.

5 Antecedentes de la invención

La invención se refiere a métodos para regenerar plantas de vid y a germoplasma de vid producido usando tales métodos.

10 Las vides son un cultivo caducifolio de frutos de clima templado de origen antiguo. La producción de uvas (65 x 10⁶ toneladas métricas) supera la de cualquier otro cultivo de frutos de clima templado y está en tercer lugar después de la producción de cítricos y plátanos. Además, debido a sus usos para fruta fresca, zumo, mermelada, pasas y vino, las uvas sobrepasan a todos los otros cultivos frutales en valor. Por lo tanto, es probable que los esfuerzos satisfactorios para mejorar las vides tengan un impacto principal sobre la viticultura comercial.

15 Los métodos actuales para mejorar las vides consumen mucho tiempo y exigen mucho trabajo. Por ejemplo, la mejora genética en las uvas a través de reproducción convencional está muy limitada por un número de factores tales como la prolongada edad prefructificación y los niveles de ploidía variables. Las vides cultivadas también son altamente heterocigóticas y generalmente no se reproducen verdaderamente a partir de semillas. Por otra parte, los programas de reproducción de vides son proyectos costosos a largo plazo. Aunque la biotecnología vegetal es una alternativa atractiva para la mejora genética en vides (Kuksova y otros, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 49:17-27, 1997), la manipulación genética *in vitro* puede tratarse solo si existe un sistema de regeneración eficaz. De acuerdo con esto, métodos que redujeran cualquiera de estos problemas representarían un avance significativo en la técnica.

25 WO 93/23529 describe un cultivo estabilizado de agregados celulares proembriogénicos de rizoma de vid 41B archivado bajo el N° PL92042917 en la colección ECACC, sus variantes y cultivos derivados, un procedimiento para la multiplicación de este cultivo que le permite conservar su poder embriogénico y su estado estabilizado, un procedimiento para el desarrollo de embriones a partir de una cepa proembriogénica para el uso en técnicas de regeneración de vides y una vid regenerada y el uso del cultivo estabilizado, especialmente para la transformación de células proembriogénicas mediante un vector adecuado.

30 Couts-Thevenot y otros (*PLANT CELL, TISSUE AND ORGAN CULTURE*, vol. 29, 1992, páginas 125-133) presentan la embriogénesis somática a partir de células de vid y la mejora del desarrollo embrionario mediante cambios en las condiciones de cultivo. Jayasankar y otros (*IN VITRO CELLULAR AND DEVELOPMENTAL BIOLOGY*, vol. 34, marzo de 1998 (1998-03), página 51A) presentan la selección *in vitro* de vid para la resistencia al hongo de la antracnosis, *Elsinoe ampelina*. Gray y Beneton (*HORTSCIENCE*, vol. 26, N° 6, 1991, página 156) presentan cultivos celulares embriogénicos perennes de vid y Gray (*AMERICAN JOURNAL OF BOTANY*, vol. 79, N° 5, 1992, páginas 542-546) presenta embriogénesis somática y regeneración de plantas a partir de embriones cigóticos inmaduros de variedades de cultivo de uva muscadina (*Vitis rotundifolia*).

40 Sumario de la invención

Se han descubierto métodos para desarrollar cultivos embriogénicos perennes de vid y para desarrollar grandes cantidades de embriones somáticos de vid a partir de tales cultivos embriogénicos perennes en un período relativamente corto usando un cultivo en suspensión líquido. Se proporcionan varias ventajas mediante los presentes métodos. Estos sistemas, por ejemplo, facilitan una frecuencia extraordinariamente alta de formación de embriones somáticos y regeneración de plantas. Tales frecuencias no se han presentado previamente para la regeneración de vides de ninguna variedad de cultivo conocida, y hacen al método útil para la producción a gran escala de un pie de plantación clonal de plantas de vid. Además, los métodos producen embriones libres de anomalías comunes tales como la fusión y las fasciaciones de embriones somáticos. Los métodos de la invención también dan como resultado una frecuencia de iniciación del cultivo embriogénico potenciada, permitiendo la producción de cultivos altamente embriogénicos que a continuación pueden llevarse satisfactoriamente a través de las fases subsiguientes del proceso de regeneración hasta el nivel de la planta entera. Debido a estas ventajas, los métodos de la invención son especialmente útiles en la aplicación de biotecnología para la mejora genética de este cultivo.

55 En un primer aspecto, la presente invención se dirige a un método para producir un cultivo embriogénico perenne de vid, comprendiendo dicho método las etapas de:

- 60 (a) cultivar un tejido de explante de vid sobre medio de iniciación de cultivo, dicho medio incluye al menos 0,01 mg/l de una citoquinina, al menos 0,1 mg/l de un carbohidrato y al menos 0,1 mg de un compuesto nitrogenado,
- (b) identificar visualmente una célula embriogénica o una masa de células embriogénicas a partir de un primer cultivo de explante de vid, en donde dichas célula embriogénica o células de dicha masa de células embriogénicas identificadas visualmente se identifican por tener un color de blanco a amarillo claro, una apariencia granular friable y ser compactas y ricas en citoplasma,
- 65 (c) transferir dicha célula embriogénica o masa de células embriogénicas identificada visualmente de la etapa (b) a un segundo cultivo;

ES 2 154 626 T3

(d) dejar que dicha célula embriogénica o masa de células embriogénicas transferida de la etapa (c) se divida en células embriogénicas o masas de células embriogénicas adicionales;

(e) identificar visualmente una célula embriogénica o masa de células embriogénicas de la etapa (d), en donde dichas célula embriogénica o células de dicha masa de células embriogénicas identificadas visualmente de la etapa (d) se identifican por tener un color de blanco a amarillo claro y una apariencia granular friable, y

(f) transferir dicha célula embriogénica o masa de células embriogénicas seleccionada identificada de la etapa (e) a un tercer cultivo, produciendo de ese modo un cultivo embriogénico perenne de vid,

en donde dicho explante se obtiene de anteras, tejido vegetativo, zarcillos, hojas, raíces, tejido nucelar, tallos, protoplastos, periciclo, tejido meristemático apical y embriones somáticos.

En otra modalidad el método se dirige a producir un embrión somático de vid y comprende además las etapas de

(g) recuperar una célula embriogénica de dicho cultivo embriogénico perenne de vid;

(h) transferir dicha célula embriogénica a un nuevo cultivo; y

(i) desarrollar un embrión somático de vid a partir de dicha célula embriogénica.

En una modalidad adicional el método se dirige a seleccionar un embrión somático de vid que tenga resistencia a un patógeno de planta, y comprende además las etapas:

(g) cultivar el cultivo de células embriogénicas perenne de la etapa (f) en un primer medio de cultivo líquido para producir un cultivo en suspensión de células, comprendiendo dicho primer medio de cultivo líquido un regulador del crecimiento de las plantas y un filtrado procedente de un cultivo de patógenos de plantas, en donde dicho filtrado o una toxina purificada se obtiene de un virus, un nematodo, un insecto, un hongo, un micoplasma o una bacteria;

(h) recuperar una célula de vid o un aglomerado de células de vid de dicho cultivo en suspensión de células;

(i) cultivar dicha célula de vid o dicho aglomerado de células de vid en un segundo medio de cultivo líquido para producir un embrión somático de vid; y

(j) recuperar dicho embrión somático de vid que tiene resistencia a dicho patógeno de planta.

Modalidades adicionales de la invención se describen en las reivindicaciones.

Descripción de los dibujos

La Figura 1A es una fotografía de una placa de cultivo de planta que muestra la masa embriogénica de “Chardonnay” obtenida de un medio de cultivo líquido. Esta fotografía se tomó aproximadamente diez semanas después de la iniciación de un cultivo de células líquido.

La Figura 1B es una fotografía de una placa de cultivo de planta que muestra embriones somáticos en fase cotiledónea. Esta fotografía se tomó aproximadamente doce semanas después de la iniciación del desarrollo del embrión.

La Figura 1C es una fotografía de una placa de cultivo de planta que muestra embriones somáticos maduros partiendo de germinación precoz en cultivo líquido. Nótese el alargamiento de las raíces en muchos embriones. Esta fotografía se tomó aproximadamente veinte semanas después de la iniciación del desarrollo del embrión.

La Figura 1D es una fotografía de una placa de cultivo de planta que muestra fases iniciales de diferenciación de embriones somáticos en un medio sólido después de cinco semanas de cultivo. Estos embriones somáticos se obtuvieron a partir de masas de células embriogénicas que se cultivaron en un medio líquido (de la Figura 1A).

La Figura 1E es una fotografía de una placa de cultivo de planta que muestra las fases iniciales del desarrollo de embriones somáticos en un medio sólido. Los embriones somáticos muy iniciales son transparentes y empiezan a volverse opacos después de unos pocos días.

La Figura 1F es una fotografía de una placa de cultivo de planta que muestra embriones somáticos maduros que germinan en un medio basal MS con sacarosa al 3%.

Descripción detallada de la invención

Se ha desarrollado un método para hacer crecer cultivos embriogénicos perennes de vid que es útil para la regeneración de vides. Se ha observado que el germoplasma único resultante del presente sistema de cultivo produce plantas de vid con una capacidad potenciada para recrear cultivos embriogénicos. Por otra parte, se ha desarrollado un proce-

ES 2 154 626 T3

dimiento para hacer crecer grandes cantidades de embriones somáticos de vid a partir de tales cultivos embriogénicos perennes en un período relativamente corto usando un cultivo en suspensión líquido.

Los términos usados en la presente memoria se definen como sigue:

Por “cultivo embriogénico perenne de vid” se entiende un cultivo embriogénico en el que células o masas de células embriogénicas se han seleccionado, subcultivado y mantenido repetidamente como un cultivo *in vitro*. Tales cultivos embriogénicos perennes de vid se mantienen durante al menos medio año, preferiblemente tres años y lo más preferiblemente cuatro o más años.

Por “célula embriogénica”, “masa de células embriogénicas” o “cultivos embriogénicos” se entiende una célula o colección de células que tiene el potencial inherente de desarrollarse en un embrión somático y, finalmente, en una planta. Típicamente, tales células tienen núcleos grandes y citoplasma denso. Adicionalmente, tales células son totipotentes ya que poseen todo el potencial genético y estructural para convertirse finalmente en una planta entera.

Por “nivel incrementado de embriogénesis” se entiende una mayor capacidad para producir una célula embriogénica o una masa de células embriogénicas en un cultivo embriogénico perenne de vid que el nivel de un cultivo embriogénico de vid no perenne de control. En general, tal nivel incrementado de embriogénesis es al menos 20%, preferiblemente 50%, más preferiblemente 100% y lo más preferiblemente 250% o más que el nivel de un cultivo embriogénico de control. El nivel de embriogénesis se mide usando métodos convencionales.

Por “explante” se entiende un órgano, un tejido o una célula derivados de una planta y cultivados *in vitro* con el propósito de iniciar un cultivo de células de planta o un cultivo de tejido de planta. Por ejemplo, tejido de vid de explante puede obtenerse virtualmente de cualquier parte de la vid, incluyendo, sin limitación, anteras, ovarios, óvulos, tejido floral, tejido vegetativo, zarcillos, hojas, raíces, tejido nucelar, tallos, semillas, protoplastos, periciclo, tejido meristemático apical, tejido embriogénico, embriones somáticos y embriones cigóticos.

Por “regulador del crecimiento de las plantas” se entiende un compuesto que afecta al crecimiento y la división de las células de la planta. Reguladores del crecimiento de las plantas preferidos incluyen auxinas o citoquininas naturales o sintéticas. Auxinas ejemplares incluyen, pero no se limitan a, NOA, 2,4-D, NAA, IAA, dicamba y picloram. Citoquininas ejemplares incluyen, pero no se limitan a, BA y zeatina.

Por “embriogénesis somática” se entiende el proceso de iniciación y desarrollo de embriones *in vitro* a partir de células y tejidos de planta ausentes de reproducción sexual.

Por “embrión somático” se entiende un embrión formado *in vitro* a partir de células somáticas o células embriogénicas mediante división celular mitótica.

Por “embrión somático maduro” se entiende un embrión completamente desarrollado con evidencia de ápices de raíz y vástago y que exhibe una estructura bipolar. Embriones somáticos maduros preferidos son aquellos con cotiledones bien definidos.

Por “plántula” se entiende una planta pequeña en germinación derivada de un embrión somático.

Por “regeneración” se entiende la producción de un órgano, un embrión o una planta entera en cultivo de tejido de planta.

Por “patógeno” se entiende un organismo cuya infección de tejido de planta viable provoca una respuesta de enfermedad en el tejido de la planta. Tales patógenos incluyen, sin limitación, bacterias, micoplasmas, hongos, insectos, nematodos, virus y viroides. Enfermedades de plantas provocadas por estos patógenos se describe en los Capítulos 11-16 de Agrios, *Plant Pathology*, 3ª ed., Academic Press, Inc., Nueva York, 1988. Ejemplos de patógenos bacterianos incluyen, sin limitación, *Agrobacterium vitis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Xylella fastidiosa* y *Xanthomonas ampelina*. Ejemplos de patógenos fúngicos incluyen, sin limitación, *Uncinula necator*, *Plasmopara viticola*, *Botrytis cinerea*, *Guignardia bidwellii*, *Phomopsis viticola*, *Elsinoë ampelina*, *Eutypa lata*, *Armillaria mellea* y *Verticillium dahliae*. Ejemplos de nematodos patógenos incluyen, sin limitación, nematodos de los nudos de las raíces (por ejemplo, especies de *Meloidogyne*), nematodos quísticos (por ejemplo, especies de *Heterodera*), nematodos que atacan las raíces (por ejemplo, *Rotylenchulus reniformis*) y nematodos de las partes aéreas (por ejemplo, *Anguina funesta*). Ejemplos de plagas patógenas (por ejemplo, insectos) incluyen, sin limitación, *Phylloxera*, *Coleoptera*, *Lepidoptera*, *Homoptera*, *Dermaptera* y *Diptera*. Ejemplos de patógenos virales incluyen, sin limitación, virus de la hoja en abanico de la vid y virus enrollador de la hoja de la vid.

Por “nivel de resistencia incrementado” se entiende un mayor nivel de resistencia o tolerancia a un patógeno o una plaga que provoca una enfermedad en una vid resistente (o su renuevo, rizoma, célula o semilla) que el nivel de resistencia o tolerancia o ambos con relación a una planta de control (es decir, una vid que no se ha sometido a selección *in vivo* para ningún patógeno de planta o su filtrado que contiene toxinas). En modalidades preferidas, el nivel de resistencia en una planta resistente de la invención es al menos 5-10% (y preferiblemente 30% o 40%) mayor que la resistencia de una planta de control. En otras modalidades preferidas, el nivel de resistencia a un patógeno que provoca

ES 2 154 626 T3

enfermedad es 50% mayor, 60% mayor y más preferiblemente incluso 75% o 90% mayor que el nivel de resistencia de una planta de control; siendo lo más preferido hasta 100% por encima del nivel de resistencia en comparación con el nivel de resistencia de una planta de control. El nivel de resistencia o tolerancia se mide usando métodos convencionales. Por ejemplo, el nivel de resistencia a un patógeno puede determinarse comparando rasgos y características físicos (por ejemplo, altura y peso de la planta, o comparando síntomas de enfermedad, por ejemplo desarrollo de lesiones retardado, tamaño de lesiones reducido, marchitado, arrugamiento y rizado de las hojas, putrefacción de racimos de frutos, manchas impregnadas de agua, escaldado y quemado marginal de las hojas y decoloración de células) de plantas de vid resistentes con plantas de vid de control.

Por “transformada” se entiende cualquier célula que incluya una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una secuencia de DNA) que esté insertada artificialmente en una célula y forme parte del genoma del organismo (de un modo bien integrado o bien extracromosómico, por ejemplo, un constructo de expresión viral que incluye un promotor subgenómico) que se desarrolla a partir de esa célula. Según se usa en la presente memoria, los organismos o las células transformados son generalmente vides o componentes de vid transformados y la molécula de ácido nucleico (por ejemplo, un transgén) se inserta artificialmente en los compartimentos nuclear o plastídico de la célula de planta.

Por “transgén” se entiende cualquier fragmento de una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, DNA) que se inserte artificialmente en una célula y forme parte del organismo (integrado en el genoma o mantenido extracromosómicamente) que se desarrolla a partir de esa célula. Tal transgén puede incluir un gen que es parcialmente o totalmente heterólogo (es decir, extraño) para el organismo transgénico, o puede representar un gen homólogo a un gen endógeno del organismo.

Los métodos de regeneración descritos en la presente memoria se han usado para la regeneración satisfactoria mediante embriogénesis somática de una variedad de variedades de cultivo de rizoma y renuevo de vid, incluyendo Autumn Seedless, Blanc du Bois, Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon, Chardonnay (por ejemplo, CH 01 y CH 02), Dolcetto, Merlot, Pinot Noir (por ejemplo, PN y PN Dijon), Semillon, White Riesling, Lambrusco, Stover, Thompson Seedless, Niagara Seedless. Seval Blanc, Zinfandel, *Vitis rupestris* St. George, *Vitis rotundifolia* Carlos, *Vitis rotundifolia* Dixie, *Vitis rotundifolia* Fry y *Vitis rotundifolia* Welder.

Usando métodos de cultivo tisular de plantas descritos en la presente memoria, también se han desarrollado métodos de selección *in vitro* que permiten a los expertos en la técnica desarrollar vides resistentes a patógenos. Una de tales aplicaciones es la selección de mutaciones en cultivos de células de vid. En esta aplicación, las células que son resistentes a o susceptibles de un estado particular se seleccionan basándose en el crecimiento incrementado o selectivo. Las células pueden exponerse además a un mutágeno que da como resultado cambios en el DNA de las células expuestas. El DNA mutagenizado puede identificarse a continuación usando técnicas estándar. Una segunda aplicación relacionada es la selección de células resistentes a patógenos. Las células se cultivan en presencia de un patógeno. Las células que muestran resistencia pueden usarse a continuación para regenerar una planta resistente al patógeno. Una tercera aplicación es la transferencia de información genética a células de vid. La información genética puede incluir una secuencia de ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable. Cultivar células en presencia de la presión selectiva da como resultado la proliferación o la supervivencia solo de las células que tienen la información genética deseada. Los métodos descritos en la presente memoria también permiten a los expertos en la técnica desarrollar, seleccionar y propagar variantes de vid que tienen características nuevas o útiles.

Los métodos de la invención son aplicables generalmente a una variedad de plantas de vid (por ejemplo, especies de *Vitis*, híbridos de especies de *Vitis* y todos los miembros de los subgéneros *Euvitis* y *Muscadinia*), incluyendo variedades de cultivo de renuevo y rizoma. Variedades de cultivo de renuevo incluyen, sin limitación, las que se denominan uvas de mesa o para pasas Alden, Almería, Anab-E-Shahi, Autumn Black, Beauty Seedless, Black Corinth, Black Damascus, Black Malvoisie, Black Prince, Blackrose, Bronx Seedless, Burgrave, Calmeria, Campbell Early, Canner, Cardinal, Catawba, Christmas, Concord, Dattier, Delight, Diamond, Dizmar, Duchess, Early Muscat, Emerald Seedless, Emperor, Exotic, Ferdinand de Lesseps, Fiesta, Flame seedless, Flame Tokay, Gasconade, Gold, Himrod, Hunisa, Hussiene, Isabella, Italia, July Muscat, Khandahar, Katta, Kourgane, Kishmishi, Loose Perlette, Málaga, Monukka, Muscat of Alexandria, Muscat Flame, Muscat Hamburg, New York Muscat, Niabell, Niagara, Olivette blanche, Ontario, Pierce, Queen, Red Málaga, Ribier, Rish Baba, Romulus, Ruby Seedless, Schuyler, Seneca, Suavis (IP 365), Thompson seedless y Thomuscat. También incluyen las usadas en producción de vinos, tales como Aleatico, Alicante Bouschet, Aligote, Alvarelhao, Aramon, Baco blanc (22A), Burger, Cabernet franc, Cabernet Sauvignon, Calzin, Carignane, Charbono, Chardonnay (por ejemplo, CH 01, CH 02, CH Dijon), Chasselas dore, Chenin blanc, Clairette blanche, Early Burgundy, Emerald Riesling, Feher Szagos, Femao Pires, Flora, French Colombard, Fresia, Furmint, Gamay, Gewurztraminer, Grand noir, Gray Riesling, Green Hungarian, Green Veltliner, Grenache, Grillo, Helena, Inzolia, Lagrein, Lambrusco de Salamino, Malbec, Malvasia bianca, Mataro, Melon, Merlot, Meunier, Mission, Montua de Pilas, Muscadelle du Bordelais, Muscat blanc, Muscat Ottonel, Muscat Saint-Vallier, Nebbiolo, Nebbiolo fino, Nebbiolo Lampia, Orange Muscat, Palomino. Pedro Ximénez, Petit Bouschet, Petite Sirah, Peverella, Pinot noir, Pinot Saint-George, Primitivo di Gioa, Red Veltliner, Refosco, Rkatsiteli, Royalty, Rubired, Ruby Cabernet, Saint-Emilion, Saint Macaire, Salvador, Sangiovese, Sauvignon blanc, Sauvignon gris, Sauvignon vert, Scarlet, Seibel 5279, Seibel 9110, Seibel 13053, Semillon, Servant, Shiraz, Souzao, Sultana Crimson, Sylvaner, Tannat, Teroldico, Tinta Madeira, Tinto cao, Touriga, Traminer, Trebbiano Toscano, Trousseau, Valdepeñas, Vioignier, Walschriesling, White Riesling y Zinfandel. Variedades de cultivo de rizomas incluyen Couderc 1202, Couderc 1613, Couderc 1616, Couderc 3309 (*Vitis riparia* X *rupestris*), Dog Ridge, Foex 33 EM, Freedom, Ganzin 1 (A x R #1), Harmony, Kober 5BB, LN33,

ES 2 154 626 T3

Millardet & de Grasset 41B (*Vitis vinifera* X *berlandieri*), Millardet & de Grasset 420A, Millardet & de Grasset 101-14 (*Vitis riparia* X *rupestris*), Oppenheim 4 (SO4), Paulsen 775, Paulsen 1045, Paulsen 1103, Richter 99, Richter 110, Riparia Gloire, Ruggeri 225, Saint-George, Salt Creek, Teleki 5A, *Vitis rupestris Constantia*, *Vitis californica* y *Vitis girdiana*, *Vitis rotundifolia*, *Vitis rotundifolia* Carlos, Teleki 5C (*Vitis berlandieri* X *riparia*), 5BB Teleki (selección Kober, *Vitis berlandieri* X *riparia*), SO₄ (*Vitis berlandieri* X *rupestris*) y 039-16 (*Vitis vinifera* X *Muscadinia*).

Sigue ahora una descripción de cada uno de los métodos mencionados anteriormente. Estos ejemplos se proporcionan con el propósito de ilustrar la invención y no deben considerarse limitativos.

10 Sistema de Cultivo Embrionario Perenne de Vid

El siguiente método ha resultado eficaz para la producción de cultivos embrionarios perennes de vid y para la regeneración de la vid mediante embriogénesis somática.

15 Tejido de Explante e Iniciación del Cultivo

En la etapa de iniciación del cultivo, se recogió un material de explante del campo, el invernadero o cultivos de micropropagación de vástagos de vid y se puso en el cultivo *in vitro*. Este material de explante se recogió típicamente de hojas, anteras o zarcillos, pero también se obtiene de otros tejidos vegetativos o reproductores de vid. Una vez recogido, el tejido de explante, si se desea, se esterilizó superficialmente de acuerdo con métodos estándar y a continuación se puso sobre un medio de iniciación del cultivo sólido adecuado en una placa Petri.

Puede usarse cualquiera de un número de medios bien conocidos, por ejemplo medio de Murashige y Skoog (MS) y de Nitsch. Tales medios incluyen típicamente sales inorgánicas, vitaminas, micronutrientes, una fuente de nitrógeno y una fuente de carbono tal como sacarosa, maltosa, glucosa, glicerol, inositol y similares. Por ejemplo, puede añadirse sacarosa en una concentración de entre aproximadamente 1 g/l y aproximadamente 200 g/l, y preferiblemente en una concentración de entre aproximadamente 30 g/l y aproximadamente 90 g/l. Por otra parte, la composición de tales medios de cultivo de tejido de planta puede modificarse para optimizar el crecimiento de la célula de planta particular empleada. Por ejemplo, el medio de iniciación del cultivo puede prepararse a partir de cualquiera de los medios basales encontrados en la Tabla 1.

TABLA 1

COMPOSICIÓN DE MEDIOS COMÚNMENTE USADOS EN LOS EJEMPLOS			
Componente (m/g a no ser que se especifique otra cosa)	MS	MS Modificado	Nitsch
KNO ₃	1900,0	3033,3	950,0
NH ₄ NO ₃	1650,0	-	720,0
NH ₄ Cl	-	363,7	-
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370,0	370,0	185,0
CaCl ₂	440,0	440,0	166,0
KH ₂ PO ₄	170,0	170,0	68,0
Na ₂ EDTA	37,23	37,23	37,3
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,95	27,95	27,95
MnSO ₄ ·H ₂ O	16,9	16,9	18,9
KI	0,83	0,83	-
H ₃ BO ₃	6,2	6,2	10,0

ES 2 154 626 T3

TABLA 1 (continuación)

COMPOSICIÓN DE MEDIOS COMÚNMENTE USADOS EN LOS EJEMPLOS			
<u>Componente</u> (m/g a no ser que se especifique otra cosa)	<u>MS</u>	<u>MS Modificado</u>	<u>Nitsch</u>
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6	8,6	10,0
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	0,25	0,25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	0,025	0,025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	0,025	0,025
Glicina	2,0	2,0	-
Ácido nicotínico	0,5	0,5	1,0
HCl de piridoxina	0,5	0,5	1,0
HCl de tiamina	0,1	0,1	1,0
Inositol	0,1 g/l	1,0 g/l	0,1 g/l
Sacarosa	30,0 g/l; 60,0 g/l	30,0 g/l; 60,0 g/l; 90,0 g/l	20,0 g/l
Carbón vegetal activado	-	0,5 g/l; 1,0 g/l; 2,0 g/l	-
Agar	7,0 g/l	7,0 g/l	8,0 g/l
pH	5,5	5,5	5,5

Si se desea, el medio de iniciación puede contener una auxina o una mezcla de auxinas en una concentración de aproximadamente 0,01 mg/l a aproximadamente 100 mg/l, dependiendo de la variedad de cultivo de interés, lo que es eficaz para inducir la producción de células embriogénicas o masas de células embriogénicas en el tejido de explante. Por ejemplo, el tejido de explante puede mantenerse sobre un medio tipo Nitsch solidificado en agar complementado con, por ejemplo, entre aproximadamente 0,01 mg/l y aproximadamente 10 mg/l de 2,4-D, y preferiblemente entre aproximadamente 0,5 mg/l y aproximadamente 3,0 mg/l de 2,4-D. 2,4-D es solo un ejemplo de una auxina que es útil en los métodos de la invención. Otras auxinas incluyen, por ejemplo, NAA, NOA, IAA, dicamba y picloram. Adicionalmente, si se desea, pueden incluirse otros reguladores del crecimiento de las plantas en el medio a concentraciones estándar. Por ejemplo, las citoquininas (por ejemplo, una citoquinina presente en la naturaleza o sintética, tal como BA o zeatina), si están presentes, pueden usarse en una concentración de aproximadamente 0,01 mg/l a aproximadamente 10 mg/l, y preferiblemente aproximadamente 0,3 mg/l, dependiendo de la variedad de cultivo de interés. En algunos casos, pueden incluirse otras clases de reguladores del crecimiento, tales como ABA o GA, en concentraciones estándar apropiadas. Por ejemplo, puede añadirse ABA en una concentración de aproximadamente 0,5 mg/l a aproximadamente 20 mg/l y preferiblemente en una concentración de aproximadamente 5 mg/l; y puede añadirse GA en una concentración de aproximadamente 0,1 mg/l a aproximadamente 30 mg/l, y preferiblemente en una concentración de aproximadamente 5 mg/l. La adición de reguladores del crecimiento de las plantas en esta fase no es necesaria para la inducción de embriogénesis. Adicionalmente, el medio de iniciación también puede incluir carbón vegetal activado (0,1-2,0 g/l) o un adsorbente similar conocido por los expertos en la técnica.

El cultivo de tejido de explante durante esta fase se lleva a cabo preferiblemente en la oscuridad a 22-23°C, aunque también puede llevarse a cabo bajo condiciones de luz muy baja o en luz completa. Después de aproximadamente una a cuatro semanas en cultivo, los cultivos de tejido de explante se ponen a continuación a la luz completa con un fotoperíodo de 16 h. Los cultivos se exploran semanalmente con respecto a la presencia de células embriogénicas o masas de células embriogénicas emergentes. Las células o masas de células embriogénicas se identifican basándose en la morfología. Las masas de células embriogénicas, en general, tienden a ser de color blanco a amarillo claro y a menudo son

ES 2 154 626 T3

transparentes. Pueden reconocerse desde una fase pequeña muy temprana (agregados de 10-20 células), basándose en su color y apariencia granular friable. Los cultivos embriogénicos también se identifican por su naturaleza compacta con células que son ricas en citoplasma (según se observa bajo el microscopio). Los cultivos embriogénicos aparecen con frecuencias variables dependiendo de una multitud de factores incluyendo, pero no limitados a, el genotipo, la naturaleza y el tipo de explante, la composición del medio y la estación de recolección. La selección visual cuidadosa para asegurar la transferencia de estructuras similares a embriones apropiadas se requiere para el mantenimiento del cultivo. Una vez identificadas, las células o masas de células embriogénicas se transfieren a continuación a medio de mantenimiento de cultivo, según se describe en la presente memoria.

10 *Mantenimiento del Cultivo*

Las células embriogénicas o las masas de células embriogénicas se retiran cuidadosamente y se transfieren a un medio de mantenimiento de cultivo. De nuevo, puede usarse cualquiera de un número de medios bien conocidos, por ejemplo medio de MS y Nitsch. Aunque no se requieren generalmente, pueden añadirse reguladores del crecimiento de las plantas como los descritos anteriormente.

En general, el tejido embriogénico puede mantenerse subcultivando a intervalos regulares (por ejemplo, cada una a cuatro semanas o cada cuatro a ocho semanas) hasta nuevo medio de mantenimiento, según se describe en la presente memoria. Alternativamente, el tejido embriogénico puede ponerse en un medio de cultivo líquido (por ejemplo, MS, B-5 o Nitsch) y hacerse crecer como una suspensión embriogénica líquida según se describe en la presente memoria. Las masas de células embriogénicas se hacen crecer para incrementar la biomasa de células embriogénicas según se requiera mediante división de cultivos en expansión durante la transferencia. Puede incitarse a los cultivos a desarrollarse hacia embriogénesis creciente o hacia menos embriogénesis y más crecimiento de células embriogénicas desorganizadas mediante manipulación repetida del cultivo, que incluye selección cuidadosa de células y masas de células embriogénicas durante la transferencia. No solo se ha encontrado que la transferencia repetida de células o masas de células embriogénicas enriquezca el crecimiento de tejido embriogénico, sino que también facilita el proceso de embriogénesis somática. Los cultivos son perennes ya que típicamente persisten durante más de dos años.

Un componente clave del presente sistema implica la selección cuidadosa de células embriogénicas de tejido explantado, seguido por la selección recurrente y el subcultivo del tejido embriogénico seleccionado. No solo se ha encontrado que este material es útil en la regeneración de plantas de vid enteras a partir de embriones somáticos, sino que también se ha encontrado que tiene una capacidad significativamente incrementada para la embriogénesis, incluyendo la producción de embriones somáticos. Llevando a cabo este procedimiento, el crecimiento de células embriogénicas se enriquece, acelerando el proceso de la formación de embriones somáticos y la regeneración de plantas subsiguiente.

Se observó que el material de explante tomado de las plantas que se hacían crecer a partir de embriones somáticos exhibía un potencial embriogénico aumentado, cuando se comparaba con material de explante tomado de tejido de explante clonal que no se había cultivado para la producción de células embriogénicas. Se observó que este incremento en el potencial embriogénico se incrementaba después de dos o más ciclos sucesivos de iniciación, cultivo y regeneración de plantas (por ejemplo, planta clonal → explante → iniciación de cultivo embriogénico → embrión somático → planta derivada de embrión somático → explante). No es necesario usar una planta derivada de embrión somático como la fuente del explante. Embriones somáticos o incluso cultivos embriogénicos que se han transferido a medio nuevo también producirán nuevos embriones somáticos con potencial embriogénico incrementado. Tal material de explante se mantiene convenientemente como cultivos de vástagos axilares *in vitro*, lo que sirve como la fuente de explantes vegetativos; sin embargo, también son aceptables otros métodos de mantenimiento de plantas.

Germinación y Crecimiento de Plántulas

Embriones somáticos obtenidos de los cultivos descritos anteriormente se germinan subsiguientemente como plántulas de vid de acuerdo con métodos estándar. Por ejemplo, los embriones somáticos se ponen sobre la superficie de un medio de germinación (por ejemplo, medio MS) en placas Petri estériles. Los cultivos que contienen los embriones se incuban en una cámara de crecimiento bajo condiciones iluminadas (fotoperíodo de 16 h). Durante la germinación la raíz emerge y el epicotilo empieza a crecer. Cuando las plantas de vid que están creciendo sobre medio de germinación alcanzan un tamaño suficiente (1 cm, con al menos dos hojas), pueden retirarse de las cápsulas de cultivo y plantarse en una mezcla para macetas esterilizada. Las plántulas se transfieren típicamente a semilleros en una mezcla para macetas sin suelo (por ejemplo, vermiculita, perlita o ProMix™, V.J. Growers, Apopka, FL). Si se desea, las plántulas pueden ponerse en una cámara de crecimiento o en una cámara húmeda de invernadero e incubarse bajo condiciones de alta humedad (90% de humedad) para el crecimiento y la aclimatación de las plántulas. Subsiguientemente, las plántulas aclimatadas pueden transferirse al exterior a un viñedo o a un invernadero.

En un ejemplo, se describe la producción de un cultivo perenne embriogénico de *Vitis vinifera* cv. "Thompson Seedless". Se obtuvieron cultivos derivados de plantas madre de una hoja que se desinfectó superficialmente y se inoculó sobre medio de iniciación de cultivo descrito por Nitsch (1968) y modificado por Gray D.J. ("Somatic Embryogenesis in Grape". En: Somatic embryogenesis in woody perennials, Vol. 2, Gupta P.K., Jain S.M., y Newton R.J. (Eds.), Kluwer Academic, Dordrecht, Países Bajos, pp. 191-217, 1995). Este medio contenía aproximadamente 1,1 mg/l de 2,4-D y aproximadamente 0,05 mg/l de BA. Después de explantar el tejido, los recipientes de cultivo se incubaron en oscuridad completa durante seis semanas. Se observó que la mayoría del tejido explantado formaba una

ES 2 154 626 T3

masa de células altamente vacuoladas no diferenciadas dentro de este período de seis semanas. Los cultivos embriogénicos, identificados por su naturaleza compacta y la presencia de células que eran ricas en citoplasma, se subcultivaron repetidamente. El cultivo resultante se obtuvo mediante el método de selección descrito anteriormente, seguido por subcultivo (durante aproximadamente 6 semanas) hasta que estaba disponible suficiente cultivo embriogénico. Un embrión somático originalmente obtenido de la planta madre (es decir, embrión de 1ª generación) se germinó y la punta de su vástago se usó para crear un cultivo de micropropagación *in vitro*. Hojas procedentes de la planta derivada de ese cultivo se usaron a continuación para producir un nuevo cultivo embriogénico (2ª generación). Un embrión somático obtenido de ese cultivo se usó de forma similar para crear la tercera generación. La respuesta embriogénica de *Vitis vinifera* cv. "Thompson Seedless" a partir de hojas derivadas de cultivo de micropropagación *in vitro* se presenta en la Tabla 2 (posteriormente). Estos resultados muestran la comparación de hojas procedentes de cultivos derivados de planta madre en maceta con hojas de plantas derivadas de cultivos obtenidos a partir de embriones somáticos germinados de tercera generación.

15 TABLA 2

Derivación de cultivo	Nº de hojas cultivadas	Nº de cultivos embriogénicos	% de respuesta por hoja
Planta madre	195	0*	0
Embrión somático de 3ª generación	200	14	7 [#]
* Otros experimentos han dado un cultivo embriogénico.			
[#] Se ha encontrado que el porcentaje de respuesta por hoja era tan alto como 30%.			

Además, también se han producido cultivos embriogénicos perennes de otras vides usando los métodos descritos en la presente memoria, incluyendo *Viris longii*, *Vitis rotundifolia* (cv. Carlo y Dixie), *Vitis rupestris*, *Vitis vinifera* (cv. Autumn Seedless, Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Chardonnay, Dolcetto, Gamay Beaujolais, Lambrusco, Pinot Noir, Semillon, Tokay, White Riesling, Zinfandel, y similares), y varios híbridos de *Vitis* (cv. Blanc du Bois, Niagara Seedless, Seyval Blanc, Stover, Southern Home y similares).

40 *Producción de Células de Vid Altamente Embriogénicas Usando una Suspensión Líquida o Cultivos Sólidos*

También se ha desarrollado un método para la producción de grandes cantidades de embriones somáticos de vid usando bien un cultivo en suspensión de células líquido o un sistema de cultivo sólido. Estos métodos son particularmente útiles para producir células altamente embriogénicas que son capaces de regenerarse en plantas enteras. Posteriormente, se presenta un protocolo simple para la embriogénesis somática eficaz de vid usando bien un cultivo en suspensión de células líquido o bien un sistema de cultivo sólido.

En general, el método incluye un procedimiento de cultivo multifásico que implica típicamente (i) iniciación de cultivo; (ii) identificación y aislamiento de células embriogénicas o masas de células embriogénicas; (iii) producción de cultivos embriogénicos perennes; y (iv) concentración de aglomerados de células altamente embriogénicos. El método implica las siguientes etapas.

Se pone tejido de explante sobre un medio de iniciación de cultivo adecuado, según se describe en la presente memoria. Después de aproximadamente seis semanas en el medio de iniciación de cultivo, se identifican células embriogénicas y masas de células embriogénicas. Una vez identificados, los cultivos embriogénicos, que pueden tener menos de 1 mm de diámetro, se aíslan y se cultivan sobre medio de iniciación reciente para promover el crecimiento, según se describe en la presente memoria. El subcultivo de los cultivos embriogénicos da como resultado típicamente la formación de embriones somáticos. Los cultivos embriogénicos y los embriones somáticos en fase inicial obtenidos a partir de estos cultivos se cultivan a continuación adicionalmente en un medio de crecimiento de plantas líquido adecuado, por ejemplo, el medio nutritivo de cultivo tisular de plantas, que consiste en medio B-5 (Gamborg y otros, Exp. Cell. Res. 50:151-158, 1968; Sigma Chemicals, St. Louis, MO), que se ha modificado según se describe por DeWald y otros (J. Amer. Soc. Hort. Sci. 114:712-716, 1989) y Litz y otros ("Somatic embryogenesis in mango", 1995, anteriormente). Este medio modificado consiste en sales principales de B-5, sales secundarias de MS y vitaminas, glutamina (aproximadamente 400 mg/l) y sacarosa o azúcar de mesa comercial (aproximadamente 60 g/l). Antes del tratamiento en autoclave, el pH del medio se ajusta hasta aproximadamente 5,8. Aunque 2,4-D (aproximadamente 0,5-2,0 mg/l) es el regulador del crecimiento preferido usado en este medio, otros reguladores del crecimiento, tales como, por ejemplo, dicamba, picloram, NOA o ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético, también pueden usarse en concentraciones apropiadas, por ejemplo, las descritas anteriormente. Los matraces que contienen los cultivos celulares embriogénicos,

ES 2 154 626 T3

embriones somáticos o ambos se incuban subsiguientemente a aproximadamente 26°C en un agitador giratorio a 125 rpm en la oscuridad o con luz difusa. Los cultivos se subcultivan a continuación como se describe en la presente memoria, típicamente una vez cada diez a catorce días, pero los regímenes de subcultivo pueden variar dependiendo del recipiente y la proliferación de aglomerados de células embriogénicas.

En de aproximadamente seis a ocho semanas, se produce un cultivo en suspensión de células fino, que consiste en células alargadas altamente vacuoladas (células no embriogénicas) y también un número menor de células isodiamétricas pequeñas ricas en citoplasma (células embriogénicas). Una vez que se produce suficiente cultivo, los embriones diferenciados pueden retirarse del cultivo tamizando, y los embriones diferenciados se descartan. Se ha encontrado que el mantenimiento continuado del cultivo en suspensión de células embriogénicas tamizado en medio líquido B-5 modificado, con subcultivos periódicos, incrementa la biomasa de aglomerados de células embriogénicas.

Después de aproximadamente doce a dieciséis semanas, se observa típicamente una gran masa de células de vid embriogénicas altamente concentradas. El tiempo empleado para la concentración de células embriogénicas o masas de células embriogénicas puede variar dependiendo de varios factores, incluyendo la variedad de cultivo, el genotipo y las condiciones de cultivo. Las células embriogénicas en esta fase son especialmente útiles virtualmente en cualquier tipo de método de transformación genética. Estas células embriogénicas también pueden inducirse para diferenciarse en embriones somáticos de acuerdo con cualquier método estándar, por ejemplo, cultivando las células en medio líquido B-5 modificado carente de reguladores del crecimiento durante un período de aproximadamente cuatro a seis semanas. Alternativamente, los embriones somáticos en fase inicial pueden cultivarse en placa en medio solidificado mediante la adición de un agente gelificante adecuado tal como goma de gelano, agarosa, agar o cualquier otro agente similar, para la diferenciación completa de embriones somáticos en completa oscuridad. Si se desea, embriones en fase de torpedo/cotiledónea pueden subcultivarse individualmente en un medio de maduración estándar, por ejemplo un medio de maduración que consiste en formulaciones nutritivas de MS. Los embriones somáticos maduros se transfieren a continuación a una cámara de crecimiento para la germinación y la regeneración en plantas en un recipiente apropiado. La frecuencia de formación de embriones somáticos usando este procedimiento es típicamente alta.

Sigue ahora una descripción de los resultados para la producción de células y masas de células embriogénicas obtenidas a partir de cultivos en suspensión líquidos y sólidos de "Thompson Seedless" y dos clones diferentes de Chardonnay, CH 01 y CH 02.

Embriones asíncronos de *Vitis vinifera* cv. "Thompson Seedless" y Chardonnay CH 01 y CH 02 obtenidos de tejido embriogénico perenne se cultivaron adicionalmente en un medio líquido para producir un cultivo en suspensión de tejido calloso. Después de aproximadamente catorce días y después de aproximadamente dos a tres subcultivos (un subcultivo se realizaba aproximadamente cada catorce días), se produjo un callo amorfo de color amarillento a blanco cremoso. Como resultado de la producción de tejido calloso, el medio de cultivo líquido en el matraz de cultivo tisular aparecía como una suspensión densa. El examen microscópico revelaba que las células de ensayo eran alargadas y estaban altamente vacuoladas, y no existen signos de capacidad embriogénica. El callo amorfo continuaba proliferando, incluso cuando los embriones somáticos usados para iniciar el cultivo se retiraban del cultivo.

Después de aproximadamente seis semanas en medio líquido B-5 modificado, se observó la producción de pequeños aglomerados de células ricas en citoplasma como agregados blancos (Figura 1A). Se observó que estas masas embriogénicas proliferaban espontáneamente y crecían hasta la capacidad del matraz en aproximadamente diez a doce semanas.

El mantenimiento continuado de estas masas embriogénicas como una sola unidad (es decir, en un matraz) a menudo es perjudicial, ya que se ha encontrado que los cultivos se deterioran en calidad y finalmente se vuelven pardos. Dividir estos cultivos embriogénicos en unidades más pequeñas durante el subcultivo ayuda a proliferar e incrementar la biomasa de los cultivos divididos. Entre las dos variedades de cultivo probadas, se encontró que ambos clones de "Chardonnay" crecían de forma igualmente rápida y crecían más que "Thompson Seedless". Mientras que las masas embriogénicas de "Chardonnay" eran de color blanco cremoso a amarillento, las de "Thompson Seedless" eran blanco apagado o pardusco. "Thompson Seedless" parecían ser más sensibles a la densidad de cultivo, ya que se observaba que las células se volvían oscuras si la densidad de cultivo no se corregía. La densidad de cultivo preferida era aproximadamente 400 mg de células embriogénicas por 40 ml de medio B5 líquido modificado en un matraz de 125 ml.

Producción de embriones somáticos en cultivo líquido

Las masas embriogénicas se hicieron pasar a través de un tamiz de nailon de 960 micras y se recogieron en un vaso de precipitados estéril. Se encontró que el tamizado de las masas embriogénicas para iniciar la embriogénesis en cultivo líquido servía para dos propósitos. En primer lugar, se obtenía un buen grado de sincronización de diferenciación de embriones. En segundo lugar, se reducía la formación de anomalías de embriones somáticos durante la diferenciación, tales como fasciación o fusión. Después de cuatro a seis semanas en medio líquido, se observaban embriones somáticos blancos pequeños en la fase globular o de corazón temprana. Tamizar los cultivos en esta fase no facilitaba un incremento en la diferenciación de embriones.

ES 2 154 626 T3

Después de aproximadamente ocho semanas, los embriones somáticos eran claramente visibles, y se encontró que unos pocos embriones habían alcanzado la fase cotiledónea de desarrollo embrionario. Sin embargo, tamizar los embriones diferenciados y cultivarlos en un matraz separado facilitaba la diferenciación más rápida, así como la sincronización del desarrollo embrionario.

Se encontró que ambos clones de “Chardonnay” CH 01 y CH 02 se diferenciaban fácilmente de embriones somáticos. El tamizado y el ajuste de densidad (realizado cultivando aproximadamente 100 mg de embriones somáticos por 40 ml de medio) apropiados aseguraban mayor sincronización y singularización, así como diferenciación embrionaria (Figura 1B). En aproximadamente doce a catorce semanas después del subcultivo en medio de embriogénesis líquido, los embriones somáticos singularizados empezaban a volverse verdes y las radículas se alargaban, mostrando el comienzo de germinación precoz (Figura 1C).

Se encontró inicialmente que los cultivos de “Thompson Seedless” no avanzaban más allá de la fase de corazón en cultivo líquido. Además, se encontró que los embriones estaban más aglomerados, dando como resultado a menudo la formación de embriones somáticos fusionados. La retirada de los embriones anormales y la distribución de la densidad de cultivo a la mitad daban como resultado embriogénesis somática normal en medio de cultivo. Estos embriones somáticos alcanzaban la madurez en aproximadamente catorce a dieciocho semanas.

Producción de embriones somáticos en medio sólido

Se observó que las células embriogénicas o las masas de células embriogénicas obtenidas de cultivos líquidos se diferenciaban en embriones somáticos tan pronto como tres semanas después de la iniciación del cultivo. Después de cuatro semanas de cultivo, el examen microscópico también revelaba la formación de embriones somáticos globulares y acorazonados sobre el tejido calloso (Figura 1D). Los embriones somáticos eran translúcidos y se asemejaban a los de un estado hiperhídrico (Figura 1E); sin embargo, los embriones continuaba diferenciándose y se encontró que se desarrollaban en embriones somáticos maduros en otras tres a cuatro semanas. Se observó que estos embriones somáticos desarrollaban un suspensor (Figura 1E). Además, se observó que las células embriogénicas se desarrollaban en una masa de embriones somáticos asíncronos.

Una de las observaciones interesantes de estos experimentos era que la mayoría de los embriones somáticos surgían como unidades individuales, y no como agregados pequeños, aunque había unos pocos agregados de embriones somáticos. En tales casos, el número de embriones variaba de seis a diez en cada agregado, y estos embriones se separaban fácilmente del tejido calloso. Los embriones encontrados en la fase cotiledónea se aislaron con una base semanal y se subcultivaron para la maduración. Cada agregado de masa embriogénica continuaba produciendo embriones somáticos durante al menos doce semanas. Las masas de células embriogénicas tendían a volverse pardas en medio sólido, que contenía Gel-Gro (ICN Biochemicals), pero la decoloración no afectaba adversamente a la viabilidad del cultivo. Aproximadamente cuatro o cinco semanas más tarde, agregados de embriones somáticos empezaban a aparecer sobre la superficie de las células embriogénicas o las masas de células embriogénicas pardas.

Maduración de embriones somáticos, germinación y regeneración de plantas

Tres medios de maduración - medio de maduración para mango (Litz y otros, “Somatic embryogenesis in mango”, 1995, anteriormente); medio de maduración para mango solidificado con agar (7 g/l) y medio basal de MS con sacarosa al 3% - se estudiaron para evaluar la capacidad para promover la germinación de embriones somáticos y la regeneración de plantas. Los resultados indicaban que un medio basal de MS que contenía 3% de sacarosa era el más eficaz para promover la maduración y la germinación de embriones y la regeneración de plantas, para ambos embriones derivados de medio sólido y para los embriones precozmente germinados que se obtenían de cultivos en medio líquido (Figura 1D). Aunque existía buena germinación sobre medio de maduración para mango con agar, la calidad de los regenerantes no era tan buena como con sales de MS con sacarosa al 3%. Embriones de los dos sistemas estudiados (es decir, medio líquido y sólido) mostraban variación entre ellos mismos en la germinación y la regeneración. Aunque los embriones se han germinado precozmente en cultivos líquidos, no se observaba germinación continuada en estos cultivos. Durante la transferencia a medio sólido, sin embargo, se encontró que los embriones continuaban el proceso de germinación y daban como resultado la formación de plantas de vid con un sistema radicular denso. El mantenimiento continuado en medio líquido después de la emergencia radicular conducía a hiperhidricidad y finalmente la regeneración de plantas se reducía a partir de estos embriones. De acuerdo con esto, se prefiere que los embriones somáticos se retiren del medio tan pronto como germinen precozmente y se transfieran a medio sólido.

Conservación a largo plazo de embriones somáticos de vid derivados de suspensión y regeneración de plantas

Se ha establecido un método para el almacenamiento a largo plazo de embriones somáticos. Embriones somáticos maduros procedentes de cultivos en suspensión de “Chardonnay” se secaron sobre papel de filtro estéril en una cabina de flujo laminar y a continuación se almacenaron en placas de Petri estériles a 6°C. Se extrajeron periódicamente muestras de estas placas y se germinaron sobre medio MS con sacarosa al 3%. Se registraron la germinación (es decir, la emergencia de raíces del embrión somático) y la regeneración de plantas. La Tabla 3 muestra los datos del clon CH 02 después de 22 meses en almacenamiento y la Tabla 4 muestra los datos del clon CH 01 después de 5 meses en almacenamiento.

ES 2 154 626 T3

TABLA 3

Experimento Número	Número de Embriones	Número Germinado (Porcentaje Germinado)	Número de Plantas	Porcentaje de Rendimiento
1	87	81 (93,1)	69	79,3
2	42	40 (95,2)	35	83,3
3	41	41 (100,0)	30	73,2
Total	170	162 (95,3)	134	78,8

TABLA 4

Experimento Número	Número de Embriones	Número Germinado (Porcentaje Germinado)	Número de Plantas	Porcentaje de Rendimiento
1	15	15 (100,0)	13	86,7
2	15	15 (100,0)	13	86,7
3	15	13 (86,7)	9	60,0
4	15	12 (80,0)	7	46,7
5	15	13 (86,7)	9	60,0
6	15	11 (73,3)	9	60,0
7	15	15 (100,0)	14	93,3
8	15	13 (86,7)	9	60,0
Total	120	107 (89,2)	83	69,2

45 *Siembra directa de embriones somáticos de vid derivados de cultivos en suspensión*

Se produjeron embriones somáticos de vid “Chardonnay” y “Thompson Seedless” a partir de cultivos líquidos según se describe en la presente memoria. Los embriones somáticos maduros derivados de suspensión se secaron brevemente en la cabina de flujo laminar y se germinaron directamente en recipientes Magenta que contenían uno de los siguientes medios para macetas: i) arena; ii) mezcla para macetas comercial ProMix™ (CPM); o CPM con arena superpuesta. Cada recipiente que contenía 20 ml de agua destilada y el medio para macetas se esterilizó tratando en autoclave durante 30 min y se enfrió durante la noche antes de inocular los embriones somáticos. Tres embriones somáticos se pusieron en cada recipiente. La siembra se llevó a cabo bajo condiciones asépticas y los recipientes se cerraron y se incubaron a 26°C con un fotoperíodo de 16 h a 75 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ de intensidad luminosa. Los resultados revelaban que el CMP con arena superpuesta era ideal para el desarrollo de las plantas. Aunque la arena promovía más germinación, las plantas resultantes eran cloróticas y su grado de supervivencia era escaso. Existía más contaminación de embriones somáticos sobre CPM puro. El presente estudio ofrece el alcance para la multiplicación a gran escala de vides usando cultivos en suspensión y fija las bases para hacer crecer embriones somáticos de vid en biorreactores.

Los resultados experimentales descritos anteriormente se lograron usando las siguientes técnicas.

Iniciación del Cultivo

Los cultivos embriogénicos se iniciaron a partir de anteras y ovarios de la variedad de cultivo “Chardonnay” (Clones CH 01 y CH 02) y a partir de las hojas de la variedad de cultivo “Thompson Seedless” de acuerdo con métodos estándar, por ejemplo los descritos en la presente memoria. Los embriones somáticos de estos cultivos, iniciados y mantenidos en medio de MS modificado, se usaron para iniciar cultivos en suspensión de células líquidos.

ES 2 154 626 T3

Típicamente, estos cultivos son altamente asíncronos en el desarrollo y la diferenciación embrionarios y, por lo tanto, cada inóculo consistía en embriones somáticos en diversas fases de desarrollo.

Establecimiento de cultivos líquidos a partir de embriones somáticos diferenciados

5 La composición del medio líquido se adaptó a partir del medio descrito por Litz y otros, anteriormente, como sigue. La inducción del callo se alcanzó mediante la adición de 1 mg/l de 2,4-D al medio. El pH del medio se ajustó hasta aproximadamente 5,8 y se aportó como partes alícuotas de 40 ml en matraces Erlenmeyer de 125 ml. Los matraces se cubrieron herméticamente con papel de aluminio de alto rendimiento antes del tratamiento en autoclave. Después
10 del enfriamiento, aproximadamente 1 gramo de los embriones somáticos se transfirió al medio líquido usando una espátula esterilizada bajo condiciones asépticas. La boca del matraz se selló con Parafilm y los cultivos se incubaron a continuación en semioscuridad (luz difusa) en un agitador giratorio a aproximadamente 120 rpm. Los cultivos se subcultivaron al menos una vez cada dos semanas.

15 Matraces que contenían los cultivos en suspensión se retiraron del agitador orbital y los cultivos se dejaron sedimentar durante aproximadamente 15 minutos. El sobrenadante se decantó suavemente en un matraz estéril, dejando las células embriogénicas en un volumen mínimo (aproximadamente 5 ml). Aproximadamente 35 ml de medio líquido reciente se añadieron a las células embriogénicas y se arremolinaron suavemente. Todo el contenido del matraz se transfirió a continuación a un matraz estéril de 125 ml. Este segundo matraz, que contenía las células embriogénicas,
20 se selló a continuación con Parafilm y se devolvió al agitador orbital.

El callo amorfo generado a partir de los embriones somáticos se recogió como sigue. La suspensión embriogénica, que incluía embriones somáticos diferenciados y callo, se dejó sedimentar en los matraces. Aproximadamente la mitad del medio sobrenadante se decantó y el resto se arremolinó y se filtró rápidamente a través de una malla de
25 nailon preesterilizada (960 micras), y se puso sobre un vaso de precipitados de 150 ml. Mientras que los embriones somáticos diferenciados se retenían en la malla, el callo fino que pasaba a su través junto con el medio líquido se recogía en el vaso de precipitados. El callo se recogía en el vaso de precipitados y se filtraba a continuación a través de un Kimwipe estéril de doble pliegue colocado sobre un embudo estéril. El callo amorfo que se adhería al Kimwipe se retiró subsiguientemente del Kimwipe usando una espátula esterilizada, y se resuspendió en medio de cultivo líquido reciente. Aproximadamente 100 mg del callo se suspendieron en cada matraz. Estos cultivos líquidos se subcultivaron
30 como se describe en la presente memoria aproximadamente una vez cada catorce días en medio líquido B-5 modificado que contenía 2,4-D.

Producción de embriones somáticos en cultivo en suspensión

35 Células o masas de células embriogénicas que se iniciaban en cultivos en suspensión líquidos se tamizaron usando un tamiz de 960 micras y la fracción más fina se recogió en medio de embriogénesis líquido, bajo condiciones asépticas. La composición del medio era la misma que la del medio de iniciación; sin embargo, se omitió 2,4-D del medio y se añadieron aproximadamente 0,05 mg/l de BA. Después de ajustar el pH hasta 5,8, el medio se aportó como
40 partes alícuotas de 40 ml en matraces Erlenmeyer de 125 ml, se cubrió con papel de aluminio y se trató en autoclave. Aproximadamente 100 mg de callo se cultivaron en cada matraz. Los cultivos se mantuvieron en semioscuridad a 25°C en un agitador giratorio a 120 rpm y se subcultivaron una vez cada catorce días. El tamizado de los cultivos se realizaba según fuera necesario, para sincronizar embriones somáticos diferenciados. También pueden emplearse, si es necesario, tamices de malla más fina (por ejemplo, tamices de 520 micras).

Germinación de embriones somáticos de cultivos en suspensión y regeneración

Embriones somáticos enverdecientes que tienen radículas alargadas se tamizaron de los cultivos en suspensión. Los
50 embriones somáticos se cogieron individualmente y se cultivaron. Tres medios diferentes - medio de maduración para mango (Litz y otros, "Somatic embryogenesis in mango", 1995, anteriormente), medio de maduración para mango solidificado con agar (7 g/l) en lugar de Gel-Gro y medio basal de MS con sacarosa al 3% - se probaron con respecto a la germinación y la regeneración de plantas. Se omitieron reguladores del crecimiento de plantas de estas preparaciones de medios. Se cultivaron 35 embriones en cada placa de Petri estándar, y se probaron ocho placas de cada medio. Después de sellar con Parafilm, los cultivos se incubaron en una cámara de crecimiento bajo un fotoperíodo de 16
55 horas. Las plantas con cuatro hojas verdaderas se transfirieron subsiguientemente a suelos.

Producción de embriones somáticos en medios sólidos

Células embriogénicas y masas de células embriogénicas producidas en cultivos en suspensión se recogieron como
60 se describe anteriormente y a continuación se transfirieron a medio de embriogénesis sólido. El medio consistía en los mismos compuestos que el medio de embriogénesis líquido y se solidificaba con 2,0 g/l de Gel-Gro o 7 g/l de agar. Aproximadamente 50 mg de callo se pusieron como un agregado sobre una placa de Petri que contenía medio y cada placa tenía dos de tales agregados. Después de inocular, las placas de Petri se sellaron con Parafilm y se incubaron en oscuridad completa. El subcultivo se realizó después de que se observara la diferenciación de embriones somáticos.
65 Los embriones somáticos producidos a partir de las células embriogénicas o las masas de células embriogénicas se contaron con una base semanal, partiendo de seis semanas después del cultivo. Los embriones de la fase cotiledónea se contaron y se subcultivaron para la maduración.

Maduración y germinación de embriones somáticos procedentes de medio sólido

Embriones somáticos maduros que tenían aproximadamente 5 mm de longitud se aislaron de la masa asíncrona y se cultivaron en medio de maduración. Veinticinco embriones somáticos maduros se cultivaron en cada placa de Petri estándar sobre medio de MS con sacarosa al 3%. Los cultivos se mantuvieron en la oscuridad hasta que germinaban. Después de la elongación de la radícula, se transfirieron a luz bajo un fotoperíodo de 16 horas. Las plántulas con al menos cuatro hojas verdaderas se transfirieron subsiguientemente a suelo.

Selección de Células Embriogénicas y Plantas de Vid Resistentes a Enfermedad

Los cultivos embriogénicos perennes de la invención pueden usarse para la selección o el rastreo con respecto a células de vid que tienen resistencia a sustancias tóxicas, tales como sustancias producidas por patógenos de planta. Tales patógenos incluyen, sin limitación, bacterias, micoplasmas, hongos, insectos, nematodos, virus y viroides. Las enfermedades de plantas provocadas por estos patógenos se describen en los Capítulos 11-16 de Agrios, Plant Pathology, 3ª ed., Academic Press, Inc., Nueva York, 1988. Ejemplos de patógenos bacterianos incluyen, sin limitación, *Agrobacterium vitis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Xylella fastidiosa* y *Xanthomonas ampelina*. Ejemplos de patógenos fúngicos incluyen, sin limitación, *Uncinula necator*, *Plasmopara viticola*, *Botrytis cinerea*, *Guignardia bidwellii*, *Phomopsis viticola*, *Elsinoë ampelina*, *Eutypa lata*, *Armillaria mellea* y *Verticillium dahliae*. Ejemplos de nematodos patógenos incluyen, sin limitación, nematodos de los nudos de las raíces (por ejemplo, especie *Meloidogyne*), nematodos quísticos (por ejemplo, especie *Heterodera*), nematodos que atacan las raíces (por ejemplo, *Rotylenchulus reniformis*) y nematodos de las partes aéreas (por ejemplo, *Anguina funesta*). Ejemplos de plagas patógenas (por ejemplo, insectos) incluyen, sin limitación, *Phylloxera*, *Coleoptera*, *Lepidoptera*, *Homoptera*, *Dermptera* y *Diptera*. Ejemplos de patógenos virales incluyen, sin limitación, virus de la hoja en abanico de la vid y virus enrollador de la hoja de la vid.

Exponiendo los cultivos embriogénicos a un filtrado de cultivo en bruto o una toxina purificada obtenida de un patógeno de planta, células de vid resistentes pueden seleccionarse y propagarse. Se espera que las células de vid que sobreviven a la presión de selección resistan no solo la toxina de selección, sino también el microbio original que produce la toxina. Por otra parte, debido a la dinámica del proceso de selección, la resistencia inducida también puede funcionar contra una serie de organismos que provocan enfermedad aparte del microbio original usado para la selección. Debido a que la selección se lleva a cabo a nivel celular, es probable que las plantas de vid regeneradas a partir de las células muestren la característica seleccionada. En particular, este sistema permite que un experto en la técnica seleccione o rastree la característica deseada de entre miles de células en un matraz de cultivo o una placa de Petri individual.

Enfermedades de la Vid

Diversos microbios atacan a la vid y provocan un número de enfermedades. Estas enfermedades incluyen enfermedades fúngicas de las hojas y los frutos (tales como podredumbre negra y antracnosis), enfermedades fúngicas del sistema vascular y las raíces (tales como Esca, Black Measles, Black Dead Arm y Eutypa dieback), enfermedades bacterianas (tales como tumor bacteriano y enfermedad de Pierce), enfermedades provocadas por virus y agentes similares a virus (tales como punteado del tallo de rupestris, enrollamiento foliar de la vid y degradación de la hoja en abanico de la vid), así como enfermedades provocadas por nematodos y micoplasmas.

Una enfermedad que afecta a la vid es la antracnosis, también conocida como enfermedad de la mancha de ojo de ave, que está provocada por el hongo *Elsinoë ampelina*. Bajo condiciones favorables, este hongo ataca a casi todas las partes aéreas de la vid, incluyendo los frutos, provocando un daño intensivo al cultivo. La antracnosis provoca la aparición de lesiones circulares con márgenes pardos o negros y bordes redondos o angulares en la planta de la vid. El centro de las lesiones se vuelve blanco grisáceo y finalmente se seca y cae, dejando una apariencia de “agujero de bala”. La enfermedad afecta especialmente a hojas jóvenes, evitando el desarrollo normal. Los vástagos nuevos también son afectados y adquieren una apariencia quemada obvia. Los racimos de frutas también son susceptibles a la infección fúngica a lo largo de su desarrollo; las lesiones en las bayas se extienden a la pulpa, induciendo a menudo el agrietamiento. (Pearson y Goheen, Compendium of Grape Disease, APS Press, St. Paul, MN, 1988).

Filtrado de Patógeno

Un filtrado de cultivo de *Elsinoë ampelina* que tiene actividad tóxica se preparó como sigue. Se preparó medio de caldo de Czapek-Dox de intensidad completa (Fisher Scientific, Springfield, NJ) disolviendo la cantidad requerida de la mezcla de caldo en agua desionizada (DI). El medio se aportó como partes alícuotas de 50 ml en matraces Erlenmeyer de 125 ml. Después de tratar en autoclave y enfriar, 100 μ l de una suspensión de esporas de *Elsinoë ampelina* se añadieron a cada matraz (Día 1); el matraz se incubó a continuación en un agitador giratorio a 120 rpm durante una semana en la oscuridad. Después de una semana, el contenido de cada matraz se transfirió a 100 ml de Czapek-Dox de intensidad completa en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y la incubación se continuó durante dos semanas más. Al final de este período (es decir, tres semanas desde el Día 1) el filtrado del cultivo fúngico se recogió filtrando el contenido de cada matraz a través de una gasa estéril de varias capas. El filtrado del cultivo en bruto se almacenó a -4°C hasta el uso adicional según se describe previamente (Subramanian, J., “Selection and characterization of resistance in mango (*Mangifera indica* L.) embryogenic cultures to the phytotoxin produced by *Colletotrichum gloeosporioides*, Penz”, Ph.D. Dissertation, University of Florida, Gainesville, 1995).

ES 2 154 626 T3

Antes de la adición al medio de cultivo para la selección *in vitro*, el filtrado de cultivo congelado se descongeló (sin calentar) a temperatura ambiente, el pH se ajustó hasta 5 y se filtró estérilmente a través de un filtro de 0,2 micras (Nalgene, Rochester, NY). Se encontró que este filtrado de patógeno esterilizado por filtración retenía su actividad tóxica.

5

Selección

El filtrado de cultivo de *Elsinoë ampelina* se añadió a continuación a cultivos en suspensión líquidos de células embriogénicas y masas de células embriogénicas de *V. vinifera* cv. "Chardonnay" en medio B-5 modificado para seleccionar células que tienen resistencia al filtrado de cultivo fúngico tóxico. Las células embriogénicas y las masas de células embriogénicas de vid se hicieron crecer como se describe anteriormente; sin embargo, en esta selección *in vitro*, el medio en el que las células se desarrollaban se complementó con volúmenes conocidos de filtrado de cultivo de *Elsinoë ampelina*. Se determinaron diluciones apropiadas de filtrado de patógeno examinando la toxicidad del filtrado usando análisis de dilución en serie. Estos experimentos demostraban que un 40% (v/v) de filtrado de cultivo era útil para la selección *in vitro*.

Cultivos de células embriogénicas y masas de células embriogénicas de "Chardonnay" se mantuvieron en medio líquido que contenía 40% (v/v) de filtrado de cultivo fúngico a aproximadamente 26°C en un agitador giratorio (125 rpm) en luz difusa. El subcultivo se realizó una vez en diez días; durante cada subcultivo, el filtrado de cultivo esterilizado por filtración se usó para diluir el medio. La selección con filtrado de cultivo se continuó durante cuatro o cinco ciclos (cada ciclo = diez días) de subcultivo. Aunque la mayoría de las células embriogénicas moría, muy pocas células, a menudo menos de 1%, sobrevivía a la presión de selección. Se establecieron líneas de cultivo resistentes retirando la presión de selección después de cuatro o cinco ciclos y dejando crecer las células supervivientes en medio B-5 modificado carente de filtrado de cultivo. Estas líneas resistentes se hicieron proliferar y se produjeron embriones somáticos usando los métodos descritos en la presente memoria.

Cultivos de células embriogénicas obtenidos del proceso de selección se probaron subsiguientemente con respecto a la resistencia a *Elsinoë ampelina* usando un número de bioensayos *in vitro*. En primer lugar, se analizó si las líneas de vid resistentes estaban produciendo una actividad que pudiera inhibir el crecimiento del hongo. A este fin, el medio de cultivo (es decir, medio de cultivo acondicionado) procedente de una línea de cultivo resistente se probó con respecto a una actividad inhibidora contra el hongo. Se recogieron medios acondicionados de diferentes cultivos celulares que tenían resistencia a *Elsinoë* y se usaron en varias concentraciones para preparar medios de crecimiento fúngicos. Una colonia micelial que crecía activamente se puso en el centro de una placa de Petri que contenía un medio de crecimiento fúngico preparado con o sin (control) medio acondicionado a partir de una línea de cultivo de vid resistente y se incubó bajo condiciones estándar. Los resultados de estos experimentos mostraban que el crecimiento del hongo era inhibido por un medio de crecimiento fúngico que contenía 25% o más del medio acondicionado.

Para demostrar adicionalmente la presencia de una actividad antifúngica en cultivos de vid resistentes, líneas resistentes, así como líneas de control, se pusieron en medio de crecimiento de planta sólido en las posiciones de las seis y las doce en punto en placas de Petri y se incubaron en la oscuridad durante cuatro semanas. Después de este período, un bloque de micelio procedente de una colonia de *Elsinoë* que crecía activamente se puso en el centro de las placas de Petri y se incubó bajo condiciones estándar. Se observó que el hongo crecía rápidamente e infectaba los cultivos de control. A la inversa, el crecimiento fúngico era inhibido en las placas que contenían cultivos de células de vid que tenían resistencia al filtrado de cultivo de *Elsinoë*. Las hifas no crecían libremente a través del medio en placas que contenían estos cultivos resistentes, en comparación con hifas fúngicas que crecían a través del medio en placas que contenían cultivos de control (es decir, no resistentes). Una capa gruesa de micelio, como la observada en las placas que contenían cultivos de control, no se formaba nunca en las placas que contenían los cultivos resistentes a *Elsinoë ampelina*. Esta capacidad de los cultivos resistentes para inhibir el crecimiento de *Elsinoë ampelina* se retenía nueve meses después de la selección, demostrando que los cambios genéticos en los cultivos resistentes eran estables.

50

Además, los cultivos de vid que eran resistentes a *Elsinoë ampelina* se probaron con respecto a la resistencia a un segundo patógeno fúngico, *Fusarium oxysporum*. Líneas resistentes, así como líneas de control, se pusieron en medio de crecimiento de plantas sólido en las posiciones de las seis y las doce en punto en placas de Petri y se incubaron en la oscuridad durante cuatro semanas. Después de este período, un bloque de micelio procedente de una colonia de *Fusarium oxysporum* que crecía activamente se puso en el centro de las placas de Petri y se incubó a temperatura ambiente bajo un fotoperíodo de 16 horas. Se observó que el hongo crecía rápidamente e infectaba los cultivos de control. A la inversa, el crecimiento de *Fusarium oxysporum* era inhibido en las placas que contenían cultivos de células de vid que tenían resistencia al filtrado de cultivo de *Elsinoë*. Las hifas no crecían libremente a través del medio en placas que contenían estos cultivos resistentes, en comparación con hifas fúngicas que crecían a través del medio en placas que contenían cultivos de control (es decir, no resistentes). Una capa gruesa de micelios de *Fusarium*, como la observada en las placas que contenían cultivos de control, no se formaba nunca en las placas que contenían los cultivos resistentes a *Elsinoë ampelina*. Este experimento demostraba que los cultivos de vid resistentes no solo eran resistentes a *Elsinoë ampelina* sino que también eran resistentes a *Fusarium oxysporum*.

Se realizó un análisis adicional para determinar si los cultivos de vid resistentes a los hongos podían dar lugar a embriones somáticos que también fueran resistentes a *Elsinoë ampelina*. Embriones somáticos derivados de cultivos resistentes y cultivos de control (es decir, no resistentes) se hicieron crecer bien en medio que contenía 40% (v/v) de filtrado de cultivo fúngico o bien en medio de control que no contenía filtrado de cultivo fúngico. Mientras que los

65

embriones somáticos derivados de los cultivos resistentes se formaban y germinaba normalmente tanto en el medio que contenía filtrado de cultivo fúngico como en el medio de control, los embriones somáticos derivados de cultivos de control se volvían necróticos y finalmente morían en el medio que contenía filtrado de cultivo fúngico, pero no morían en el medio de control. La necrosis de los controles en el medio que contenía filtrado de cultivo fúngico era suficientemente rápida para volver a los embriones somáticos oscuros en menos de setenta y dos horas desde el inicio del cultivo. Los resultados de estos experimentos demostraban que los embriones somáticos obtenidos a partir de cultivos celulares resistentes también eran resistentes al filtrado fúngico. Por otra parte, se observó que estos embriones somáticos resistentes soportaban una concentración de filtrado de cultivo de *Elsinoë ampelina* que era igual a la soportada por sus células embriogénicas y masas de células embriogénicas resistentes progenitoras.

10 *Plantas resistentes a enfermedad*

Cultivos embriogénicos se seleccionaron *in vitro* contra filtrado de cultivo fúngico producido por *Elsinoë ampelina*. Se regeneraron plantas a partir de los cultivos seleccionados y se aclimataron en el invernadero. Plantas de las líneas seleccionadas y controles no seleccionados fueron pulverizadas con una solución de esporas (1×10^6 esporas/ml) hasta dejar correr. Las plantas se cubrieron con bolsas individualmente para mantener la humedad (una condición que es óptima para que el patógeno provoque la enfermedad de la antracnosis) durante tres días. Las bolsas se retiraron a continuación y las plantas se puntuaron con respecto a los síntomas de antracnosis. Todos los controles no seleccionados exhibían un grado muy alto de susceptibilidad y en la mayoría de los casos existía defoliación debida a la enfermedad en menos de tres días. Entre las 40 plantas diferentes procedentes de las dos líneas seleccionadas, solo una planta mostraba síntomas de antracnosis suave. Estos datos muestran que la resistencia adquirida por las células embriogénicas durante la selección *in vitro* pueden traducirse en resistencia de toda la planta contra el patógeno.

Plantas regeneradas pueden probarse con respecto a la resistencia a antracnosis de acuerdo con métodos estándar. Por ejemplo, suspensiones de esporas de *Elsinoë ampelina* se preparan suspendiendo masas de esporas procedentes de colonias recientes del hongo en agua desionizada (DI) estéril y la densidad de esporas se ajusta hasta 100.000 esporas/ml usando un hemocitómetro. Las hojas jóvenes de vástagos o plantas que crecen en el invernadero se recogen y se lavan suavemente con agua DI. Sobre el limbo de la hoja, 100 μ l de la suspensión de esporas se ponen en una mancha y, para facilitar la inoculación del hongo, se realiza una punzada aguda en el centro de la mancha. Al menos dos de tales manchas se hacen en cada hoja. Las hojas se incuban en condiciones húmedas (es decir, condiciones ideales para el desarrollo de los síntomas) durante al menos 72 horas y a continuación se observan con respecto al desarrollo de lesiones según se describe previamente (Subramanian, J., Ph.D. Dissertation. University of Florida, Gainesville, 1995, anteriormente). Pruebas similares con agua DI sola sirven como un control. Además, hojas de variedades de cultivo que se sabe que son susceptibles de o resistentes a antracnosis se inoculan y las lesiones de estas hojas sirven como patrón para determinar la susceptibilidad/resistencia de las plantas regeneradas derivadas de células embriogénicas seleccionadas *in vitro*. A partir de un análisis estadístico de estos datos, se determinan niveles de resistencia a *Elsinoë ampelina* y antracnosis. Plantas de vid que tienen un nivel incrementado de resistencia a *Elsinoë ampelina* y antracnosis o ambas con relación a plantas de control se toman como útiles en la invención.

40 *Transformación de Vides*

El método descrito en la presente memoria puede usarse para producir plantas transformadas. Las células pueden transformarse en cualquier etapa en el procedimiento para elaborar una planta derivada de embrión somático. Así, tejido o células adecuados para transformación incluyen tejido explantado, células embriogénicas, masas de células embriogénicas y embriones somáticos (incluyendo embriones somáticos maduros).

Cultivos celulares producidos de acuerdo con los métodos de la invención pueden transformarse con DNA que comprende un transgén deseado. Tales células, por ejemplo, pueden transformarse con genes que confieren resistencia a patógenos, enfermedades o plagas, o cualquiera de sus combinaciones. Por ejemplo, un número de genes de *Bacillus thuringiensis* que codifican proteínas que son tóxicas para un número de plagas son bien conocidos y útiles en los métodos de la invención. Varios métodos estándar están disponibles para la introducción de un transgén en un huésped vegetal, generando de ese modo una planta transgénica.

Durante la construcción del vector de expresión vegetal, están disponibles varios métodos estándar para la introducción del vector en un huésped vegetal, generando de ese modo una planta transgénica. Estos métodos incluyen (1) transformación mediada por *Agrobacterium* (*A. tumefaciens* o *A. rhizogenes*) (véase, por ejemplo, Lichtenstein y Fuller En: Genetic Engineering, vol 6, PWJ Rigby, ed, Londres, Academic Press, 1987; y Lichtenstein, C.P., y Draper, J., En: DNA Cloning, Vol II, D.M. Glover, ed, Oxford. IRI Press, 1985); (2) el sistema de aporte de partículas (véase, por ejemplo, Gordon-Kamm y otros, Plant Cell 2:603 (1990); o BioRad Technical Bulletin 1687, anteriormente); (3) protocolos de microinyección (véase, por ejemplo, Green y otros, anteriormente); (4) procedimientos con polietilenglicol (PEG) (véase, por ejemplo, Draper y otros, Plant Cell Physiol. 23:451, 1982; o, por ejemplo, Zhang y Wu, Theor. Appl. Genet. 76:835, 1988); (5) captación de DNA mediada por liposomas (véase, por ejemplo, Freeman y otros, Plant Cell Physiol. 25:1353, 1984); (6) protocolos de electroporación (véase, por ejemplo, Gelvin y otros, anteriormente; Dekeyser y otros, anteriormente; Fromm y otros, Nature 319:791, 1986; Sheen Plant Cell 2:1027, 1990; o Jang y Sheen Plant Cell 6:1665, 1994); y (7) el método de turbulencia (véase, por ejemplo, Kindle, anteriormente). El método de transformación no es crítico para la invención. Puede emplearse cualquier método que proporcione transformación eficaz. Según estén disponibles métodos más nuevos para transformar cultivos u otras células huésped, pueden aplicarse directamente.

ES 2 154 626 T3

Lo siguiente es un ejemplo que esboza una técnica particular, una transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*. Mediante esta técnica, el procedimiento general para manipular genes que han de transferirse al genoma de células vegetales se lleva a cabo en dos fases. En primer lugar, se llevan a cabo etapas de clonación y modificación de DNA en *E. coli*, y el plásmido que contiene el constructo génico de interés se transfiere mediante conjugación o electroporación a *Agrobacterium*. En segundo lugar, la cepa de *Agrobacterium* resultante se usa para transformar células vegetales. Así, para el vector de expresión de plantas generalizado, el plásmido contiene un origen de replicación que le permite replicarse en *Agrobacterium* y un origen de replicación de alto número de copias funcional en *E. coli*. Esto permite la producción y la prueba fáciles de transgenes en *E. coli* antes de transferencia a *Agrobacterium* para la introducción subsiguiente en plantas. Genes de resistencia pueden estar soportados en el vector, uno para selección en bacterias, por ejemplo, estreptomycin, y otro que funcionará en plantas, por ejemplo, un gen que codifica resistencia a kanamicina o resistencia a herbicidas. También están presentes en el vector sitios de endonucleasas de restricción para la adición de uno o más transgenes y secuencias límite de T-DNA direccionales que, cuando son reconocidas por las funciones de transferencia de *Agrobacterium*, delimitan la región de DNA que se transferirá a la planta.

En otro ejemplo, células de planta pueden transformarse disparando en la célula microproyectiles de volframio sobre los que está precipitado DNA clonado. En el Biolistic Apparatus (Bio-Rad) usado para el disparo, una carga de pólvora (Power Piston Tool Charge de calibre 22) o una ráfaga conducida por aire conduce un macroproyectil de plástico a través del cañón de una pistola. Una parte alícuota de una suspensión de partículas de volframio sobre las que se ha precipitado DNA se pone enfrente del macroproyectil de plástico. El último se dispara a una placa acrílica de detención que tiene un agujero a través de ella que es demasiado pequeña para que el macroproyectil pase a su través. Como resultado, el macroproyectil de plástico golpea contra la placa de detección y las micropartículas de volframio continúan hacia su objetivo a través del agujero de la placa. Para la presente invención, el objetivo puede ser cualquier célula, tejido, semilla o embrión de planta. El DNA introducido en la célula sobre los microproyectiles se integra bien en el núcleo o bien en el cloroplasto.

En general, la transferencia y la expresión de transgenes en células de planta son actualmente prácticas habituales para los expertos en la técnica y se han convertido en herramientas principales para llevar a cabo estudios de expresión génica en plantas y para producir variedades de plantas mejoradas de interés agrícola comercial.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un cultivo embriogénico perenne de vid, comprendiendo dicho método las etapas de:

- 5 (a) cultivar un tejido de explante de vid sobre medio de iniciación de cultivo, dicho medio incluye al menos 0,01 mg/l de una citoquinina, al menos 0,1 mg/l de un carbohidrato y al menos 0,1 mg de un compuesto nitrogenado,
- 10 (b) identificar visualmente una célula embriogénica o una masa de células embriogénicas a partir de un primer cultivo de explante de vid, en donde dichas célula embriogénica o células embriogénicas de dicha masa de células embriogénicas identificadas visualmente se identifican por tener un color de blanco a amarillo claro, una apariencia granular friable y ser compactas y ricas en citoplasma,
- 15 (c) transferir dicha célula embriogénica o masa de células embriogénicas identificada visualmente de la etapa (b) a un segundo cultivo;
- (d) dejar que dicha célula embriogénica o masa de células embriogénicas transferida de la etapa (c) se divida en células embriogénicas o masas de células embriogénicas adicionales;
- 20 (e) identificar visualmente una célula embriogénica o masa de células embriogénicas de la etapa (d), en donde dichas célula embriogénica o células de dicha masa de células embriogénicas identificadas visualmente de la etapa (d) se identifican por tener un color de blanco a amarillo claro y una apariencia granular friable, y
- 25 (f) transferir dicha célula embriogénica o masa de células embriogénicas seleccionada identificada de la etapa (e) a un tercer cultivo, produciendo de ese modo un cultivo embriogénico perenne de vid,

en donde dicho explante se obtiene de anteras, tejido vegetativo, zarcillos, hojas, raíces, tejido nucelar, tallos, protoplastos, periciclo, tejido meristemático apical y embriones somáticos.

30 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho explante es un explante de una variedad seleccionada del grupo que consiste en Alden, Almería, Anab-F-Shahi, Autumn Black, Beauty Seedless, Black Corinth, Black Damascus, Black Malvoisie, Black Prince, Blackrose, Bronx Seedless, Burgrave, Calmeria, Campbell Early, Canner, Cardinal, Catawba, Christmas, Concord, Dattier, Delight, Diamond, Dizmar, Duchess, Early Muscat, Emerald Seedless, Emperor, Exotic, Ferdinand de Lesseps, Fiesta, Flame seedless, Flame Tokay, Gasconade, Gold, Himrod, Hunisa, Hussiene, Isabella, Italia, July Muscat, Khandahar, Katta, Kourgane, Kishmishi, Loose Perlette, Málaga, Monukka, Muscat of Alexandria, Muscat Flame, Muscat Hamburg, New York Muscat, Niabell, Niagara, Olivette blanche, Ontario, Pierce, Queen, Red Málaga, Ribier, Rish Baba, Romulus, Ruby Seedless, Schuyler, Seneca, Suavis (IP 365), Thompson seedless, Thomuscat, Aleatico, Alicante Bouschet, Aligote, Alvarelhao, Aramon, Baco blanc (22A), Burger, Cabernet franc, Cabernet Sauvignon, Calzin, Carignane, Charbono, Chardonnay CH 01, Chardonnay CH 02, Chardonnay CH Dijon, Chasselas dore, Chenin blanc, Clairette blanche, Early Burgundy, Emerald Riesling, Feher Szagos, Femao Pires, Flora, French Colombard, Fresia, Furmint, Gamay, Gewurztraminer, Grand noir, Gray Riesling, Green Hungarian, Green Veltliner, Grenache, Grillo, Helena, Inzolia, Lagrein, Lambrusco de Salamino, Malbec, Malvasia bianca, Mataro, Melon, Merlot, Meunier, Mission, Montua de Pilas, Muscadelle du Bordelais, Muscat blanc, Muscat Ottonel, Muscat Saint-Vallier, Nebbiolo, Nebbiolo fino, Nebbiolo Lampia, Orange Muscat, Palomino. Pedro Ximénez, Petit Bouschet, Petite Sirah, Peverella, Pinot noir, Pinot Saint-George, Primitivo di Gioia, Red Veltliner, Refosco, Rkatsiteli, Royalty, Rubired, Ruby Cabernet, Saint-Emilion, Saint Macaire, Salvador, Sangiovese, Sauvignon blanc, Sauvignon gris, Sauvignon vert, Scarlet, Seibel 5279, Seibel 9110, Seibel 13053, Semillon, Servant, Shiraz, Souzao, Sultana Crimson, Sylvaner, Tannat, Teroldico, Tinta Madeira, Tinto cao, Touriga, Traminer, Trebbiano Toscano, Trousseau, Valdepeñas, Viognier, Walschriesling, White Riesling, Zinfandel, Couderc 1202, Couderc 1613, Couderc 1616, Couderc 3309 (*Vitis riparia* X *rupestris*), Dog Ridge, Foex 33 EM, Freedom, Ganzin 1 (A x R #1), Harmony, Kober 5BB, LN33, Millardet & de Grasset 41B (*Vitis vinifera* X *berlandieri*), Millardet & de Grasset 420A, Millardet & de Grasset 101-14 (*Vitis riparia* X *rupestris*), Oppenheim 4 (SO4), Paulsen 775, Paulsen 1045, Paulsen 1103, Richter 99, Richter 110, Riparia Gloire, Ruggeri 225, Saint-George, Salt Creek, Teleki 5A, *Vitis rupestris* Constantia, *Vitis californica* y *Vitis girdiana*, *Vitis rotundifolia*, *Vitis rotundifolia* Carlos, Teleki 5C (*Vitis berlandieri* X *riparia*), 5BB Teleki (selección Kober, *Vitis berlandieri* X *riparia*), SO₄ (*Vitis berlandieri* X *rupestris*) y 039-16 (*Vitis vinifera* X *Muscadinia*).

3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, para producir un embrión somático de vid, que comprende además las etapas de:

- 60 (g) recuperar una célula embriogénica de dicho cultivo embriogénico perenne de vid;
- (h) transferir dicha célula embriogénica a un nuevo cultivo; y
- 65 (i) desarrollar un embrión somático de vid a partir de dicha célula embriogénica.

4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicho cultivo en la etapa (h) es un medio líquido.

ES 2 154 626 T3

5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicho cultivo líquido comprende sales principales de B-5 y sales secundarias de MS.

6. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicho cultivo en la etapa (h) comprende un medio sólido.

7. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicho cultivo en la etapa (h) comprende un medio que contiene un regulador del crecimiento de plantas.

8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicho regulador del crecimiento de plantas es una auxina, NOA, dicamba, picloram, NAA, IAA, 2,4-D, una citoquinina, benciladenina, zeatina, tidiazurón, ácido abscísico o ácido giberélico.

9. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la recuperación de dicha célula embriónica de dicho cultivo en la etapa (g) comprende filtración, sedimentación o selección.

10. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicho cultivo líquido se tamiza para sincronizar la formación de embriones somáticos de vid diferenciados.

11. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicha célula o masa de células embriónicas se transforma con DNA.

12. El método de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende además hacer crecer una plántula de vid a partir del embrión somático de vid.

13. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, para seleccionar un embrión somático de vid que tiene resistencia a un patógeno de planta, que comprende además las etapas de:

(g) cultivar el cultivo de células embriónicas perenne de la etapa (f) en un primer medio de cultivo líquido para producir un cultivo en suspensión de células, comprendiendo dicho primer medio de cultivo líquido un regulador del crecimiento de las plantas y un filtrado procedente de un cultivo de patógenos de plantas, en donde dicho filtrado o una toxina purificada se obtiene de un virus, un nematodo, un insecto, un hongo, un micoplasma o una bacteria;

(h) recuperar una célula de vid o un aglomerado de células de vid de dicho cultivo en suspensión de células;

(i) cultivar dicha célula de vid o dicho aglomerado de células de vid en un segundo medio de cultivo líquido para producir un embrión somático de vid; y

(j) recuperar dicho embrión somático de vid que tiene resistencia a dicho patógeno de planta.

14. El método de acuerdo con la reivindicación 13, que comprende además transferir dicho embrión somático de vid a un medio de germinación para hacer crecer una plántula de vid.

15. El método de acuerdo con la reivindicación 13, en el que dicho virus se selecciona del grupo que consiste en virus de la hoja en abanico de la vid, virus del punteado del tallo de rupestris y virus enrollador de la hoja de la vid.

16. El método de acuerdo con la reivindicación 13, en el que dicho nematodo se selecciona del grupo que consiste en nematodo de los nudos de las raíces, un nematodo quístico, un nematodo que ataca las raíces y un nematodo de las partes aéreas.

17. El método de acuerdo con la reivindicación 13, en el que dicho insecto se selecciona del grupo que consiste en *Phylloxera*, *Coleoptera*, *Lepidoptera*, *Homoptera*, *Dermptera* y *Diptera*.

18. El método de acuerdo con la reivindicación 13, en el que dicho hongo se selecciona del grupo que consiste en *Uncinula necator*, *Plasmopara viticola*, *Botrytis cinerea*, *Guignardia bidwellii*, *Phomopsis viticola*, *Elsinoë ampelina*, *Eutypa lata*, *Armillaria mellea* y *Verticillium dahliae*.

19. El método de acuerdo con la reivindicación 13, en el que dicha bacteria se selecciona del grupo que consiste en *Agrobacterium vitis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Xylella fastidiosa* y *Xanthomonas ampelina*.



Fig. 1A

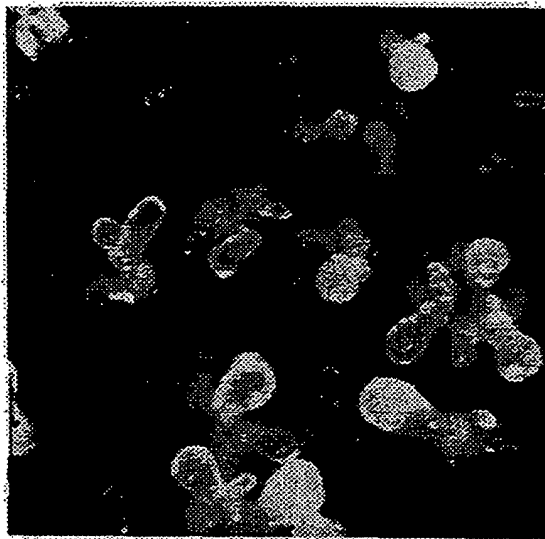


Fig. 1B

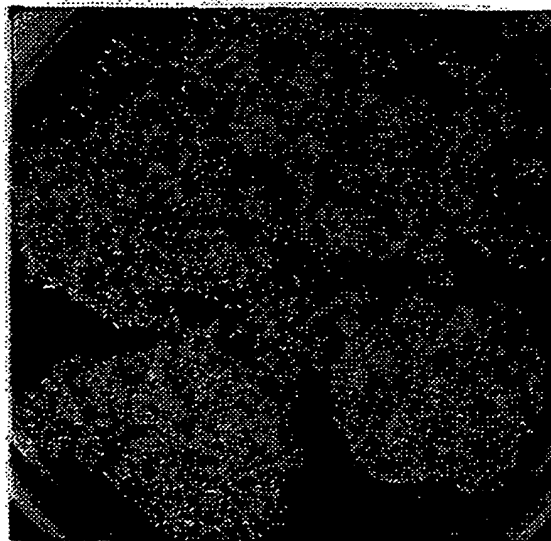


Fig. 1C

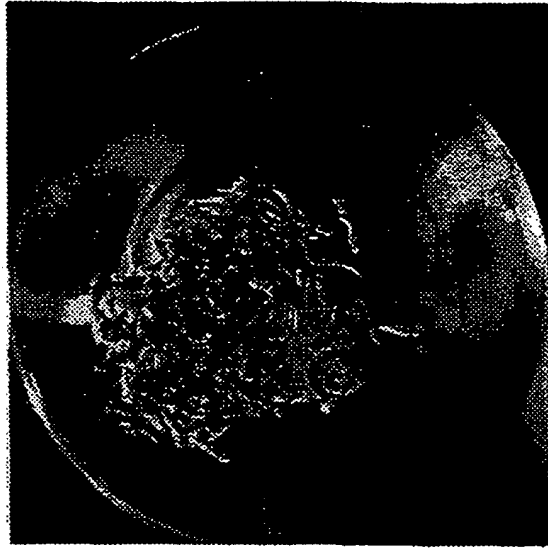


Fig. 1D

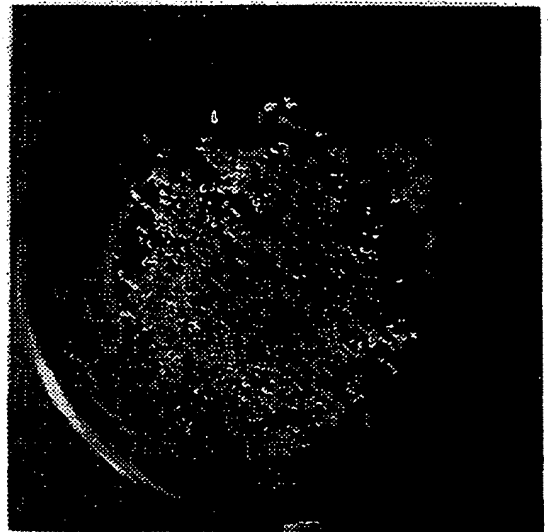


Fig. 1E

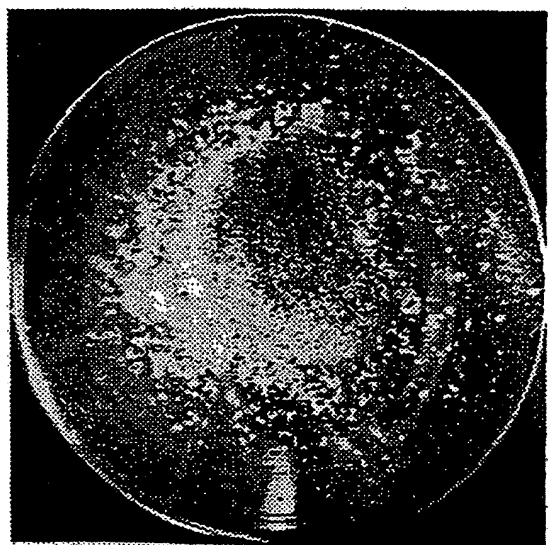


Fig. 1F