

MÉTODO DE OBTENCIÓN DE FIBRAS VEGETALES A PARTIR DEL AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS MERISTEMÁTICAS

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se relaciona con procesos biotecnológicos, en particular la propagación *in vitro* de células cambiales de tejido xilemático vegetal y su conversión en productos de interés industrial. Específicamente la invención se relaciona con el aislamiento y cultivo de células meristemáticas cambiales de tejido xilemático vegetal y la posterior obtención de fibras a partir de las células
10 cultivadas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El sector productor de papel es una de las industrias con mayor impacto ambiental ya que todas las etapas de su proceso son potencialmente perjudiciales. El primer impacto ambiental empieza en la consecución de la
15 materia prima. A medida que el consumo de papel aumenta se requiere mayor cantidad de árboles para obtener la pulpa, los cuales en muchos casos se producen en monocultivo, lo que en general reduce la productividad de los suelos. Otra fuente de árboles para la industria papelera son los bosques naturales, lo que implica la deforestación y perturbación de ecosistemas y con
20 ello la reducción significativa del control natural de los gases de invernadero.

Una alternativa a estos problemas podría ser el cultivo *in vitro* de células vegetales y la producción en laboratorio de fibras que puedan suplir las necesidades de la industria papelera y las industrias relacionadas con los productos celulósicos. Esto evitaría los problemas de deforestación y reduciría
25 en parte la polución producida por los tratamientos que se realizan para transformar los tejidos leñosos en pulpa de papel. Así mismo, esto contribuiría a producir fibras independientemente de factores ambientales y climáticos externos.

Sin embargo, hasta el momento no se ha reportado en la literatura un método
30 de cultivo de células meristemáticas cambiales de tejido xilemático vegetal y la

producción de fibras a partir de estas. La primera limitación en el desarrollo de este tipo de técnicas consiste en encontrar las células adecuadas para cultivar, las cuales tengan la capacidad de transformarse en fibras.

5 Ogita, S, et al.¹, revela un medio de cultivo que permite mantener células de plantas en suspensión para estudiar el proceso de lignificación, en particular en bambú. Así mismo, Kumar et al.², realizaron la regeneración de plántulas a partir de la suspensión de células de origen cambial del árboles de *Dalbergia sissoo*. Los resultados mostraron la obtención de diferenciación de brotes.

10 De manera similar, el documento US8,24,230 enseña un método de aislamiento y obtención de una línea celular homogénea derivada de cambium que tiene la habilidad de dividirse. Dichas células son obtenidas de un tejido que contienen cambium de una planta herbácea, en particular de raíces de almacenamiento de una planta herbácea.

15 A pesar de lo anterior, no existe en el estado del arte ningún reporte de cultivo de células de especies leñosas o maderables, y mucho menos la conversión de dichas células cultivadas en fibras.

Adicional a esto, una restricción importante en el desarrollo *in vitro* de fibras es el poco conocimiento existente con respecto a la biología de la formación de fibras. Las fibras son células individuales que pertenecen tanto al floema, como
20 al xilema, tienen una forma alargada, poseen una pared celular secundaria densa lignificada, y cuentan con los extremos afilados o puntiagudos que surgen de un doblez (rodilla) al final de ambos extremos de cada célula. La identificación de fibras en las primeras etapas de diferenciación es difícil y depende del grado de su desarrollo y características de su posición dentro del
25 órgano de la planta, y la presencia de otras características distintivas tales como, la forma longitudinal y la amplitud del diámetro de aquellas, típicas de las células procambiales y cambiales.

¹ Ogita, S; Nomuro T., Kishimoto T, Kato Y. 2012. A novel xylogenic suspension culture model for exploring lignification in *Phyllostachys bamboo*. *Plant Methods*. 8:40

² Kumar A, et.al. 1991. Morphogenesis response of cultured cells of cambial origin of a mature tree. *Dalbergia sissoo Roxb. Plant Cell Rep.* 9(12): 703-706.

Así mismo, dentro del estado del arte no se han reportado los marcadores bioquímicos, genéticos o moleculares del desarrollo temprano de fibras, debido a la dificultad de ver y obtener fibras en sus procesos de iniciación, ya que cuando se observan aun en etapas muy tempranas de la diferenciación, los
5 factores celulares que especifican el destino celular de la fibra, ya pudieron haber finalizado su actividad.

Por lo tanto existe una necesidad en el estado de la técnica de un método de obtención de fibras a partir de células vegetales, el cual identifique las células adecuadas para ser cultivadas, las prolifere y posteriormente permita la
10 obtención de fibras que puedan ser empleadas en diferentes industrias, como la industria papelera.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención resuelve de manera sorprendente los problemas del arte previo al proporcionar un método de obtención de fibras a partir de células
15 meristemáticas cambiales de tejido xilemático de especies vegetales. El método de la invención comprende:

- (a) identificar y aislar células meristemáticas cambiales vegetales;
- (b) multiplicar las células meristemáticas cambiales aisladas;
- (c) inducir la producción de estructuras similares a fibra a partir de las células
20 meristemáticas cambiales cultivadas;
- (d) producir fibras a partir de las estructuras similares a fibra.

De manera ventajosa el método de la invención permite la obtención de fibras *in vitro* por medio de procesos biotecnológicos, la inducción a partir de estas células de estructuras similares a fibra (que serán denominadas la presente
25 memoria descriptiva “protofibras”), y finalmente la obtención de fibras con aplicaciones industriales.

La invención se refiere además a un método para identificar y aislar células meristemáticas cambiales del tejido xilemático de especies vegetales, el cual comprende la tinción del material vegetal con uno o más reactivos de tinción y

la realización de cortes tangenciales a diferentes alturas de la planta, la identificación bajo el microscopio las células de interés y la obtención de explantes que se introducen a un medio de cultivo que comprende una enzima.

Otro objeto de la presente invención es un método para la multiplicación de células meristemáticas cambiales de tejido xilemático vegetal, el cual mantiene las células en condiciones adecuadas para su posterior diferenciación. Dicho método de multiplicación de células meristemáticas cambiales comprende la suspensión de dichas células meristemáticas cambiales aisladas en un medio de cultivo, la creación de una suspensión estable y el subcultivo de la suspensión en medio de cultivo fresco.

La invención también se refiere a un método para la obtención de estructuras similares a fibra a partir de células meristemáticas cambiales del tejido xilemático cultivadas, el cual comprende hacer la suspensión de las células meristemáticas cambiales del tejido xilemático, en un primer medio de cultivo, su subsecuente re-suspensión en un segundo medio de cultivo, su mantenimiento en la suspensión por un primer periodo de inducción, la posterior separación de las células y finalmente la adición de un segundo medio de cultivo y el mantenimiento de la suspensión en agitación por un segundo periodo de inducción.

Así mismo, los métodos de la presente invención incluyen también el análisis transcriptómico tanto de las células meristemáticas cambiales, como de las estructuras similares a fibras (protofibras).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **Figura 1** enseña Cortes a 4 mm debajo del ápice caulinar sin tinción. A: Corte transversal 100 X. B: Corte longitudinal tangencial 100 X.

La **Figura 2** muestra Cortes tangenciales de A: Tinción del xilema con Anilina rosa y B: Tinción del xilema con Anilina azul 40 X.

La **Figura 3** muestra Cortes debajo del ápice caulinar con tinción utilizando un marcador asistido de lignina NBT. A: Corte transversal a 100 X. B: Corte tangencial a 100 X.

La **Figura 4** enseña la observación de la viabilidad celular. A: Muestra en campo claro. B: Muestra en filtro de fluorescencia.

La **Figura 5** corresponde A: Células meristemáticas derivadas del cambium xilemático: redondeadas, nucleadas y vacuoladas, color amarillo claro, observadas en campo claro, 40 X. B: Células meristemáticas derivadas del cambium vascular mostrando viabilidad con FDA, 40 X.

La **Figura 6** muestra células meristemáticas derivadas del cambium vascular xilemático. A: Células observadas en DIC 40 X. B: Células observadas en luz polarizada 40 X. C-D: Células teñidas con Calcoflour y mostrando el inicio temprano de la diferenciación celular para dar origen a una “Protofibra” 40 X.

La **Figura 7** enseña el inicio de la formación de fibras a partir de Células meristemáticas derivadas del cambium vascular. A: Campo claro. B: DIC. C: Luz polarizada 40 X.

La **Figura 8** muestra el proceso de iniciación de una estructura similar a fibra, “Protofibra” originada a partir de células meristemáticas derivadas del cambium vascular xilemático. A: Protofibra septada con cámaras bien definidas, con al menos 4 núcleos (resaltados en los círculos), emergiendo de las células meristemáticas en proceso de expansión celular. B: Protofibra activa y viable FDA 40 X.

La **Figura 9** enseña una Protofibra creciendo en forma simplástica. A: Teñida con Calcoflour mostrando la presencia de celulosa. B: DIC. C: Luz polarizada. En esta última se puede observar los extremos altamente refringentes indicando la presencia de celulosa cristalina y quizás reacomodamiento de las miofibrillas para el crecimiento intrusivo, 40 X.

La **Figura 10** muestra Protofibras con crecimiento simplástico, iniciando alargamiento en los extremos. A: DIC. B: Luz polarizada 40 X.

La **Figura 11** enseña Protofibras iniciando el proceso de crecimiento intrusivo. A: Protofibra alargada con paredes en proceso de engrosamiento externo. B: Protofibra alargada mostrando el inicio de crecimiento intrusivo en ambos extremos de la misma, 40 X.

La **Figura 12** muestra una Protofibra en proceso de intrusión y engrosamiento de la pared celular, probablemente en proceso de deposición de pared secundaria de lignina, DIC en 100 X.

La **Figura 13** enseña la centrifugación diferencial del medio de cultivo de
5 protofibras.

La **Figura 14** muestra el cultivo de *E. grandis* en condiciones de invernadero.

La **Figura 15** enseña un ejemplo de la tinción de *E. grandis* de acuerdo con el método de la invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

10 La presente invención se relaciona con un método para obtener fibras vegetales a partir de células meristemáticas cambiales del xilema, el cual comprende los pasos:

(a) identificar y aislar células vegetales meristemáticas cambiales del xilema;

(b) multiplicar las células meristemáticas cambiales del xilema aisladas;

15 (c) inducir la producción de células similares a fibra (protofibras), a partir de las células meristemáticas cambiales del xilema cultivadas;

(d) producir fibras a partir de células similares a fibras (protofibras).

De esta forma, el método de la invención permite la obtención de fibras en condiciones de laboratorio a partir de células meristemáticas cambiales de
20 xilema aisladas, siendo dichas fibras útiles para industrias que requieren materias primas celulósicas fibrosas, como la industria papelera.

En una realización preferida de la invención el paso (a) de dicho método de obtención de fibras vegetales se hace mediante la tinción selectiva de células. Dicha tinción permite la localización exacta y específica de las células
25 meristemáticas cambiales del xilema que son adecuadas para la proliferación y su diferenciación en estructuras similares a fibras, "protofibras". Posterior a la tinción se realiza el aislamiento de células por medio de cortes histológicos en

las partes de la planta donde se encuentran localizadas las células meristemáticas cambiales adecuadas.

Una vez se han realizado los cortes, se procede a aislar las células del tejido que las contiene y posteriormente se llevan a un primer medio de cultivo bajo condiciones *in vitro* para su multiplicación, según el paso (b).

De manera preferida, dicho primer medio de cultivo comprende macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, antioxidantes y fitohormonas. En una realización preferida de la invención las fitohormonas que hacen parte de dicho primer medio de cultivo se seleccionan de compuestos similares a auxina, citoquinas, giberelinas, etileno, ácido jasmónico y mezcla de los mismos.

Según una realización de la invención los macronutrientes del primer medio de cultivo de la invención comprenden nitrógeno, calcio, magnesio, potasio y fósforo. Así mismo, de forma preferida los micronutrientes comprenden boro, cobalto, cobre, hierro, manganeso, potasio, molibdeno y zinc. Por su parte, de forma preferida las vitaminas comprenden complejo B, polialcoholes y aminoácidos.

De acuerdo con el método de la invención, después de la multiplicación de células meristemáticas del paso (b), se realiza la inducción de producción de protofibras, según el paso (c), en donde la inducción se realiza en un segundo medio de cultivo.

De forma preferida dicho paso (c) de la presente invención se lleva a cabo en un segundo medio de cultivo, el cual comprende macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, antioxidantes y fitohormonas.

Según una realización de la invención los macronutrientes del segundo medio de cultivo de la invención comprenden nitrógeno, calcio, magnesio, potasio y fósforo. Así mismo, de forma preferida los micronutrientes comprenden boro, cobalto, cobre, hierro, manganeso, potasio, molibdeno y zinc. Por su parte, de forma preferida las vitaminas comprenden complejo B, polialcoholes y aminoácidos.

De manera preferida, las fitohormonas del segundo medio de cultivo son diferentes a las fitohormonas comprendidas en el primer medio de cultivo del paso (b). En una realización preferida, el segundo medio de cultivo comprende fitohormonas seleccionadas del grupo que consiste de auxinas, citoquinas, giberelinas, brasinoesteroides, etileno y una mezcla de las mismas.

Posteriormente, de acuerdo con la invención, las protofibras del paso (c) son transformadas en fibras vegetales propiamente dichas, mediante el cultivo de las protofibras y la inducción de la lignificación de las mismas, para su posterior apoptosis, originando así fibras verdaderas de xilema.

En una realización preferida de la invención los pasos (b) y (c) se realizan en dos etapas, la primera en un recipiente sometido a agitación y la segunda en un biorreactor tipo columna de burbujeo.

En otro objeto de la invención, se revela aquí un novedoso proceso para identificar y aislar células meristemáticas cambiales del tejido xilemático, caracterizado porque comprende los pasos de:

(i) tomar segmentos de tallos apicales del material vegetal y sumergirlos en una solución de un primer reactivo de tinción;

(ii) realizar cortes tangenciales en diferentes alturas de la planta;

(iii) identificar bajo el microscopio las células teñidas e identificar los componentes del tejido xilemático;

(iv) tomar segmentos de tallos apicales del material vegetal y sumergirlos en una solución de un segundo reactivo de tinción;

(v) realizar cortes transversales y tangenciales en diferentes alturas de la planta;

(vi) analizar bajo el microscopio las células teñidas e identificar la altura donde se encuentran las células meristemáticas cambiales xilemáticas de interés;

(vii) realizar nuevos cortes tangenciales de segmentos delgados del material vegetal en la altura donde se hayan identificado células meristemáticas cambiales de xilema de interés;

(viii) introducir los explantes en un medio de cultivo líquido que contiene una enzima; y

(ix) verificar la presencia de células libres.

5 En una realización preferida de la invención, el primer reactivo de tinción del paso (i) es un reactivo de tinción vital. De acuerdo con otra realización preferida del proceso de la invención, dicho reactivo de tinción vital se selecciona del grupo que consiste de anilina rosa y anilina azul.

10 De forma similar, en una realización preferida de la invención, dicho proceso de tinción del paso (i) se lleva a cabo dos veces, una con anilina rosa y otra con anilina azul.

Tal como lo muestra la Figura 1, los cortes sin tinción debajo del ápice caulinar de un espécimen vegetal permiten distinguir los diferentes tipos de células presentes, pero no aquellas células meristemáticas que tienen la capacidad de diferenciarse en protofibras.

15 De acuerdo con un objeto de la invención, la tinción del paso (i) tanto con anilina rosa como con anilina azul permite identificar las células del xilema (Figura 2). De esta forma, se identifican las células que han sufrido apoptosis y que no son susceptibles de multiplicación.

20 Posteriormente, de acuerdo con el método de la invención se realiza en el paso (iv) una segunda tinción, que permite determinar las células meristemáticas cambiales xilemáticas adecuadas para ser cultivadas. De acuerdo con una realización preferida de la invención, el segundo reactivo de tinción es un marcador químico.

25 En una realización preferida del método de la invención, el marcador químico del paso (iv) permite determinar la síntesis de lignina. En una realización de la invención el marcador de lignina es azul de nitrotetrazolium (NBT).

30 Tal como lo muestra la Figura 3, de acuerdo con una realización preferida de la invención después del paso (iv) se realizan cortes transversales y tangenciales a diferentes alturas de la planta según el paso (v) y estos se analizan bajo el microscopio, paso (vi), donde se identifican las células meristemáticas

cambiales. En dicha Figura 3 se ve cómo las células meristemáticas cambiales teñidas de acuerdo con el proceso de la invención, presentan una coloración azul en su interior.

Una vez identificadas estas células, de acuerdo con el paso (vii) del método de la invención se realizan cortes tangenciales de segmentos delgados del material vegetal, obteniendo explantes, en la altura donde se identificaron bajo el microscopio las células cambiales de interés. De acuerdo con una realización preferida de la invención, los explantes así obtenidos se introducen en un medio de cultivo que contiene una enzima.

De manera preferida, la enzima contenida en el medio de cultivo líquido del paso (viii) se selecciona del grupo que comprende pectinasas, celulasas, hemicelulolasas y un coctel de las mismas.

En una realización de la invención, los segmentos de tallos apicales se cortan de plantas de entre 2 meses de germinadas hasta 1 año y medio de edad en las partes más cercanas a la región apical. Estos se sumergen en la solución del reactivo primer reactivo de tinción según el paso (i) del método de la invención. De acuerdo con una realización preferida de la invención el primer reactivo de tinción se encuentra en una concentración de entre 20 mg/mL y 250 mg/mL.

Según esta realización, los segmentos de tallos apicales se sumergen en dicha solución del primer reactivo de tinción y se dejan en reposo por un primer tiempo. En una realización preferida de la invención el primer tiempo es entre 1 y 6 horas, preferiblemente entre 2 y 8 horas.

De manera preferida, luego de la tinción del paso (i) los cortes del paso (ii) se realizan a alturas desde 1 mm hasta 8 cm debajo del ápice caulinar.

Por otro lado, en esta realización de la invención, para el paso (iv) se toman segmentos de tallos apicales de manera similar al paso (i) y se sumergen en una solución de un segundo reactivo de tinción. De manera preferida dicho segundo reactivo de tinción se encuentra en una concentración entre 1 mg/mL y 10 mg/mL. De manera similar al paso (i) y (ii) los tallos se dejan en reposo un segundo tiempo, donde dicho segundo tiempo es entre 1 y 8 horas,

preferiblemente entre 2 y 5 horas, y los cortes del paso (v) se realizan a alturas desde 1 mm hasta 8 cm debajo del ápice caulinar.

Según esta realización de la invención al identificar los segmentos donde se encuentran las células meristemáticas que pueden diferenciarse en protofibras, se realizan cortes según el paso (vii) y los explantes así obtenidos son desinfectados y manejados en condiciones estériles, para luego ser introducidos en el paso (viii) en un medio de cultivo líquido el cual contiene una enzima. De manera preferida dicha enzima se encuentra en una concentración entre 0.01% y 1.5% en dicho medio de cultivo.

Preferiblemente los explantes se dejan en agitación por un tercer tiempo. De forma preferida dicho tercer tiempo es entre 4 y 30 días, más preferiblemente entre 5 y 8 días. Posteriormente, se realiza el paso (ix) en condiciones estériles. Tal como lo muestra la Figura 4, en el paso (ix) se verifica la existencia y viabilidad de las células aisladas.

De acuerdo con una realización de la invención, los pasos (viii) y (ix) se llevan a cabo más de una vez.

Otro objeto de la presente invención es un método para multiplicar células meristemáticas aisladas. Dicho método de la invención está caracterizado porque comprende los pasos de:

(i) establecer una suspensión de células meristemáticas derivadas del cambium vascular xilemático, libres a un medio de cultivo líquido;

(ii) mantener una suspensión estable de entre 2 g/L a 20 g/L en peso seco de células; y

(iii) realizar subcultivos de la suspensión estable del paso (iii) adicionando entre 1 g/L y 20 g/L en peso seco de células en medio de cultivo fresco y mantener dichos subcultivos en agitación permanente.

En una realización preferida de la invención el método para multiplicar células meristemáticas derivadas del cambium vascular del tejido xilemático, cultivadas bajo irradiación lumínica por medio de un sistema de diodos de emisión de luz. La Figura 5 muestra células meristemáticas derivadas del

cambium vascular del tejido xilemático, que han sido cultivadas y son viables, tal como se evidencia de su tinción con Diacetato de fluoresceína (FDA).

Aún en otro objeto la invención enseña un método para la obtención de estructuras similares a fibra, "protofibras", a partir de células meristemáticas derivadas del cambium vascular aisladas y cultivadas. Dicho método de la invención comprende:

- (i) suspender células meristemáticas cambiales en un primer medio de cultivo que comprende, macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, antioxidantes y fitohormonas;
- 10 (ii) tomar las células meristemáticas cambiales del paso (i) y re-suspenderlas en un segundo medio de cultivo que comprende, macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, antioxidantes y fitohormonas;
- (iii) mantener la suspensión en agitación por un primer periodo de inducción;
- (iv) separar las células del medio de cultivo y adicionar nuevamente el segundo
15 medio de cultivo fresco;
- (v) mantener la suspensión en agitación por un segundo periodo de inducción; en donde el segundo medio de cultivo comprende fitohormonas diferentes de aquellas del primer medio de cultivo.

En una realización de la invención, el método de obtención de protofibras de la invención se realiza en dos etapas, la primera de ellas en un recipiente
20 sometido a agitación y la segunda en un biorreactor de columna de burbujeo.

Según una realización de la invención los macronutrientes del primer medio de cultivo de la invención comprenden nitrógeno, calcio, magnesio, potasio y fósforo. Así mismo, de forma preferida los micronutrientes comprenden boro,
25 cobalto, cobre, hierro, manganeso, potasio, molibdeno y zinc. Por su parte, de forma preferida las vitaminas comprenden complejo B, polialcoholes y aminoácidos.

De manera preferida, las fitohormonas comprendidas en el primer medio de cultivo se seleccionan del grupo que consiste de compuestos similares a

auxina, citoquininas, giberelinas, etileno, ácido abscísico y mezclas de los mismos.

En una realización de la invención, el segundo medio de cultivo comprende macronutrientes que incluyen nitrógeno, calcio, magnesio, potasio y fósforo. Así mismo, de forma preferida los micronutrientes comprenden boro, cobalto, cobre, hierro, manganeso, potasio, molibdeno y zinc. Por su parte, de forma preferida las vitaminas comprenden complejo B, polialcoholes y aminoácidos. Por otro lado, dicho segundo medio de cultivo comprende fitohormonas que se seleccionan del grupo que consiste de auxinas, giberelinas, citoquininas, ácido abscísico y mezclas de las mismas.

Según una realización de la invención, para la obtención de protofibras a partir de células meristemáticas derivadas del cambium se realiza una suspensión de dichas células de acuerdo con el paso (i) de entre 3 y 20 g/L en peso seco y se verifica que la viabilidad de las células sea mayor o igual al 75%.

Para el paso (ii) en esta realización de la invención se diluye la suspensión del paso (i) hasta llegar a una concentración de 1.5 a 6.5 g/L en un segundo medio de cultivo.

La suspensión así obtenida se mantiene en un recipiente sometido a agitación por un primer periodo de inducción según el paso (iii), para posteriormente separarlas de acuerdo con el paso (iv) y re-suspenderlas en el segundo medio de cultivo fresco, para volver a someterlas a agitación de acuerdo con el paso (v).

Como se indicó anteriormente, en una realización de la invención, el método de producción de protofibras se lleva a cabo en dos etapas, donde la segunda etapa se lleva a cabo en un biorreactor tipo columna de burbujeo. En dicha realización, el flujo de aire de alimentación de reactor se mantiene entre 0.25 L/min y 0.9 L/min.

La Figura 6 muestra el comienzo de la diferenciación de células meristemáticas en protofibras, de manera similar la Figura 7, ilustra el inicio de dicha formación de protofibras a partir de células meristemáticas cambiales del xilema.

Por otro lado, en la Figura 8, se ilustra una Protofibra ya septada con al menos cuatro núcleos (marcados en círculos en la figura), la cual está emergiendo de las células meristemáticas cambiales del xilema en procesos de expansión celular.

- 5 La Figura 9, enseña protofibras creciendo en forma simplástica, en donde es posible evidenciar extremos altamente refringentes. Por su parte, la Figura 10 muestra cómo las protofibras generadas y en crecimiento simplástico empiezan el alargamiento de sus extremos.

La Figura 11, revela cómo las protofibras generadas inician el proceso de crecimiento intrusivo y con proceso de engrosamiento externo en sus paredes, así como el inicio del crecimiento intrusivo en ambos extremos. De forma similar, la Figura 12, muestra una Protofibra en el proceso posterior de intrusión y engrosamiento de pared celular.

Por otro lado, de acuerdo con el método de obtención de protofibras de la invención, durante los pasos (iv) y (v) se realiza adicionalmente la centrifugación diferencial de la suspensión para separar las protofibras obtenidas de las células meristemáticas cambiales del tejido xilemático, aún sin diferenciar, lo que permite enriquecer el medio de protofibras. La Figura 13 enseña un ejemplo de centrifugación diferencial de las protofibras obtenidas por el método de la invención.

De otra parte, de acuerdo con la presente invención, los métodos aquí revelados incluyen un paso adicional en el cual se realiza el análisis transcriptómico de las células meristemáticas cambiales aisladas y de las protofibras obtenidas. Dicho análisis se realiza en general con protocolos conocidos de extracción y secuenciación del ARN.

Ejemplos

Como material vegetal de referencia se tomó *Eucalyptus grandis* (*E. grandis*), el cual es una de las especies maderables más altamente cultivadas en el mundo por la calidad de su madera y la presencia de fibras cortas que lo hace adecuado como materia prima en la industria papelera.

Se cultivaron semillas de *E. grandis* en condiciones de invernadero para obtener plántulas a partir de las cuales realizar la extracción de células meristemáticas. La figura 14 muestra las plántulas germinadas en condiciones de invernadero.

5 **Ejemplo 1: Identificación y aislamiento de células meristemáticas**

Se prepararon soluciones acuosas de Anilina Rosa (alrededor de 50 mg/mL), y Anilina Azul (alrededor de 90 mg/mL) en solución acuosa, en las cuales se sumergieron segmentos de tallos apicales colectados, de aproximadamente 8 cm de longitud (Figura 15). Los segmentos se dejaron en la solución durante 3-8 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron cortes a 4 mm, 1 cm, 2 cm y 4 cm debajo del ápice caulinar, los cuales fueron observados bajo el microscopio.

Por otro lado, se prepararon una solución acuosa de Azul de Nitrotetrazolium (N6876 – SIGMA-ALDRICH) de alrededor de 3.0-5.0 g/L, se colectaron segmentos de tallos apicales de aproximadamente 8 cm de longitud y se dejaron en la solución de 3-8 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron cortes a 4 mm, 1 cm, 2 cm y 4 cm debajo del ápice caulinar, los cuales fueron observados bajo el microscopio.

Luego de identificadas las porciones que contienen las células meristemáticas cambiales del tejido xilemático adecuadas para la diferenciación en protofibras se obtuvieron explantes del tallo los cuales se introdujeron en agua estéril, y posteriormente se introdujeron en una solución con medio de cultivo, suplementada con enzimas tipo pectinasa, celulasa, hemicelulasa o mezclas de las mismas a una concentración entre 3- 10%.

La presencia de células libres y su viabilidad fue analizada mediante la observación bajo el microscopio.

Ejemplo 2: multiplicación de células meristemáticas

Se realizó una suspensión de células meristemáticas derivadas del cambium vascular del tejido xilemático, en un medio de cultivo en condiciones estériles,

hasta que se mantuvo estable a una concentración en peso seco de alrededor de 6 g/L.

Posteriormente se realizaron subcultivos de dicha suspensión inoculando entre 2 y 10 g/L en medio de cultivo fresco.

5 **Ejemplo 3: multiplicación de células meristemáticas empleando radicación lumínica**

Se realizaron suspensiones de alrededor de 6 g/L, expuestas a radiación perpendicular por medio de diodos de emisión de luz, en una intensidad entre 2 W/m² y 10 W/m². Se realizaron ciclos de 24 horas de luz.

10 **Ejemplo 4: inducción de protofibras**

Se suspendieron células meristemáticas aisladas con un porcentaje de viabilidad mayor al 75% para proporcionar una concentración de entre 6 y 9 g/L en peso seco. Se introdujo el medio de cultivo de inducción de protofibras hasta obtener una dilución de entre 1.5 y 4 g/L. Se analizó el porcentaje de viabilidad de las células y se mantuvo estable la concentración de la suspensión.

Se llevaron las suspensiones a un agitador orbital, entre 80 y 100 rpm. Posteriormente se tomaron muestras para realizar el análisis de porcentaje de viabilidad, la concentración y el porcentaje de inducción de protofibras.