

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 343 934**

21 Número de solicitud: 200803286

51 Int. Cl.:
A01H 1/00 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **18.11.2008**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **12.08.2010**

Fecha de la concesión: **03.06.2011**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **15.06.2011**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
15.06.2011

73 Titular/es: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES

72 Inventor/es: **Atienza Peñas, Sergio Gustavo;**
Martín Ramírez, Azahara Carmen;
Barro Losada, Francisco;
Martín Muñoz, Antonio Pedro y
Ramírez Alcántara, María Carmen

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **Sistema de androesterilidad génico-citoplásmica en trigo.**

57 Resumen:

Sistema de androesterilidad génico-citoplásmica en trigo. Semilla, célula, y grupo de células con androesterilidad génico-citoplásmica que incorporan genes restauradores de la fertilidad procedentes de cromosomas de *Hordeum chilense*. Dichas células dan lugar o son parte de plantas que forman la línea restauradora, e integran en su material genético un fragmento del cromosoma 1H^{ch}, una doble monosomía para 6H^{ch} y 6D, y/o la traslocación 6H^{ch}S/6DL.

ES 2 343 934 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Sistema de androesterilidad génico-citoplásmica en trigo.

5 La presente invención se encuentra dentro del campo de la biotecnología y, concretamente dentro de la mejora genética vegetal. Se refiere a una célula vegetal con androesterilidad génico-citoplásmica que incorpora genes restauradores de la fertilidad procedentes de cromosomas de *Hordeum chilense*. Dichas células dan lugar o son parte de plantas que forman la línea restauradora, e integran en su material genético un fragmento del cromosoma 1H^{ch}, una doble monosomía para 6H^{ch} y 6D, y/o la traslocación 6H^{ch}S/6DL.

10 **Estado de la técnica anterior**

Uno de los métodos de Mejora Genética Vegetal (MGV) más eficaces, que ha revolucionado la industria de las semillas gracias principalmente a la ingeniería genética y química, y objeto de numerosas patentes (EP 0,771,523 B2; EP 0,923,283 B1; EP 0,630,403 B1; US 7,164,058 B2), ha sido la producción de células vegetales que den lugar a líneas de plantas androesteriles. Dichas líneas androesteriles permitirían el establecimiento, junto con otras líneas, de sistemas que permiten la obtención de variedades híbridas. Las variedades híbridas de este tipo se denominan también híbridos F1 y son, además de más productivas (un alto rendimiento de las partes de la planta que pueden comercializarse, tales como frutos y similares), debido a lo que se denomina "vigor híbrido", más homogéneas (uniformidad en el color, sabor, tamaño y similares), resultando en un mayor rendimiento del cultivo y en una calidad uniforme del mismo.

El híbrido comercial es el producto del cruzamiento entre dos líneas puras que se han seleccionado por su capacidad para expresar heterosis. La combinación óptima ha sido resultado de un proceso costoso y, como siempre en MGV, largo, de evaluación en campo de decenas de miles de cruzamientos. En el desarrollo del híbrido y en su producción comercial, salvo en contados casos, la castración no es rentable hacerla manualmente (castración mecánica o eliminación de las anteras, llamada también emasculación). Los procedimientos que se utilizan son: la castración química (sustancias que eliminan o inactivan los gametos masculinos), la genética (nuclear) y la génico-citoplásmica. Esta última es la que ha tenido mayor éxito comercial.

Existen dos tipos principales de esterilidad masculina genética que pueden ser explotados para la producción de semillas híbridas en trigo: esterilidad masculina citoplásmica ("CMS") en líneas de sustitución nuclear o aloplásmicas, causada por la interacción incompatible de un citoplasma extraño con el núcleo del trigo común, y esterilidad masculina génica ("GMS") en líneas euplásmicas, causada por una mutación recesiva o una delección de un gen(es) nuclear(es) que normalmente confiere esterilidad masculina en el citoplasma del trigo común. La CMS, que implica a un citoplasma extraño, normalmente reduce la capacidad de rendimiento del híbrido, mientras que la GMS, que implica a un citoplasma nativo, debería permitir una expresión normal del genoma y, por ello, una capacidad total de rendimiento del híbrido.

En el año 1962 Wilson and Ross describen que la transferencia del núcleo del trigo harinero al citoplasma de *Triticum timopheevii* (aloplasma) induce esterilidad masculina citoplásmica (CMS) manteniendo el resto de características del trigo. Este descubrimiento provocó la búsqueda de genes restauradores y fuentes alternativas de androesterilidad génico-citoplásmica, con el objetivo último de producir híbridos comerciales de trigo. La línea aloplásmica se denomina Línea A, la línea portadora de los genes restauradores es la Línea R y se denomina Línea B a la línea genéticamente idéntica a A pero en el citoplasma original, que es por tanto autofértil. La semilla híbrida se obtiene sembrando próximas las líneas A y R, y recogiendo la semilla híbrida en la línea A. La línea A se mantiene polinizándola con la línea B.

La revisión más completa sobre trigo híbrido que existe es la de Pickett (Adv. Plant Breed., Suppl. J. Plant Breed., 15, 1-259, 1993). En esta revisión se describen los efectos sobre el trigo de 20 citoplasmas de los géneros *Triticum*, *Aegilops*, *Haynaldia* y *Secale*. La conclusión es la misma que la propuesta con anterioridad por otros autores; el citoplasma más útil para producir semilla híbrida de trigo es el de *Triticum timopheevii*, fundamentalmente por la ausencia de efectos deletéreos frecuentes en otros sistemas (Virmani & Edwards, *Advances in Agronomy* 36, 1983).

Las líneas con esterilidad masculina citoplásmica (CMS) tienen una mutación en su genoma mitocondrial y la esterilidad masculina se hereda como un carácter dominante, transmitido por línea materna. La CMS puede ser empleada para la producción de semillas híbridas solo si:

- 1- Están disponibles mutantes CMS en un cereal dado,
- 2- Están disponibles los genes de restauración (nucleares) para restaurar la fertilidad de las líneas CMS cuando las semillas son el producto cosechado,
- 3- La mutación CMS no está asociada a una penalización.

Por tanto, el desarrollo de un sistema de androesterilidad génico-citoplásmica en trigo implica la obtención de una línea euplásmica, la obtención de líneas androestériles de trigo (líneas aloplásmicas), y la obtención de líneas

ES 2 343 934 B1

restauradoras (Líneas R) seleccionando para la presencia de los genes restauradores de la fertilidad en la F1, lo que implica el descubrimiento e incorporación de genes restauradores (genes Rf).

5 Existe una larga lista de genes Rf en trigo distribuidos en los tres genomas (ABD) del trigo, casi siempre procedentes de la especie donante del citoplasma (tabla 1), por lo que abundan los procedentes de *T. timopheevii* y es frecuente que estén localizados en los brazos cortos de los cromosomas del grupo 1 y 6. Se han descrito varios brazos cromosómicos del grupo 4: el brazo largo del cromosoma 4A (4AL), el brazo corto del cromosoma 4B (4BS) y el brazo corto del cromosoma 4D (4DS), que llevan los genes normales de fertilidad masculina *Ms-A1*, *Ms-B1* y *Ms-D1*, respectivamente, y los brazos largos de los cromosomas del grupo 5: 5A, 5B y 5D (5AL, 5BL y 5DL, respectivamente), que llevan los genes *Ms-A2*, *Ms-B2* y *Ms-D2*, respectivamente. Sin embargo, hasta ahora, sólo encontraron o introdujeron en el locus Ms-B1, en la región distal del brazo cromosómico 4BS (antes 4AS) había tres alelos recesivos que causan esterilidad masculina. Se dijo que estos alelos, a saber, *ms-B1-a*, *ms-B1-b* y *ms-B1-c* (con frecuencia también llamados *ms1a*, *ms1b* y *ms1c*, respectivamente), no causaban efecto alguno, más allá de la esterilidad masculina, sobre el rendimiento de la planta (revisado por Wilson & Driscoll, 1983).

TABLA 1

Lista de genes Rf, distribución en los cromosomas y origen

Gen	Cromosoma	Origen	Referencia
Rf1	1AS	<i>T. timopheevii</i>	Maan, 1985. Crop Science 25: 743-748.
Rf3	1BS	<i>T. var. spelta duhamelianum</i>	Ma & Sorrels, 1995. Crop Science 35: 1137-1143 Kojima <i>et al.</i> , 1997. Genes and Genetic Systems 72 (6): 353-359 Ahmed <i>et al.</i> , 2001. Genes and Genetic Systems 76 (1): 33-38
Rf4	6BS	<i>T. timopheevii</i>	Ma & Sorrels, 1995. Crop Science 35: 1137-1143.
Rf6	6AS/6BS	<i>A. umbellulata</i>	Ma <i>et al.</i> 1995. Molecular & General Genetics 247(33):351-357.

50 *Hordeum chilense* (2n=2x=14, H^{ch}H^{ch}) es una cebada silvestre sudamericana que ha sido utilizada como parental femenino para la síntesis de anfiploides llamados tritórdeos (Martín, *Journal of Cereal Science*, 30, 85-95, 1999). Estos tienen por tanto citoplasma de cebada. Retrocuzado el tritórdeo octoploide (H^{ch}H^cAABBDD) repetidamente con trigo harinero (2n=6X=42, AABBDD) se genera una línea aloplásmica androestéril, su núcleo tiene la constitución genómica AABBDD del trigo y el citoplasma de la cebada, parental femenino del anfiploide. En el proceso de obtención, antes de la eliminación total de los cromosomas de la cebada, algunas líneas son fértiles. Recientemente se ha descubierto que el brazo corto del cromosoma 6H^{ch}S es responsable de esta restauración (Martín *et al.* 2008. *Australian Journal of Agricultural Science* 59 (3): 206-213). Sin embargo, en hemicigosis esta adición no es un restaurador efectivo, por lo que en principio no parece interesante.

Es necesario, por tanto, encontrar un mecanismo efectivo que permita la obtención de una línea restauradora de la fertilidad en trigo que permita la producción de semillas híbridas.

60 Descripción de la invención

Los autores de la presente invención han desarrollado una línea restauradora de la fertilidad en trigo, construida mediante la introgresión en trigo de los factores restauradores procedentes de *H. chilense*. Aunque en hemicigosis la adición del brazo corto del cromosoma 6H^{ch}S no es un restaurador efectivo, se ha visto que plantas doble monosómicas 65 6H^{ch} 6D son fértiles, así como aquellas que presentan la traslocación 6H^{ch}S/6DL. Además, un cromosoma 1H^{ch} con una delección casi de la totalidad del brazo largo también restaura la fertilidad y es efectivo en hemicigosis.

ES 2 343 934 B1

Esta línea permite la producción de semillas híbridas de trigo mediante el establecimiento de tres líneas: una línea euplásmica, es un trigo harinero normal, la línea aloplásmica de trigo en citoplasma de *H. chilense* (obtenida cruzando tritórdeo ó anfiploide *Hordeum chilense*-trigo por trigo, hasta la eliminación de todos los cromosomas de cebada, y la línea restauradora. La línea aloplásmica se propaga mediante polinización con la línea mantenedora, por lo que toda la progenie presenta esterilidad masculina, puesto que el citoplasma se deriva del parental femenino. Estas plantas con esterilidad masculina pueden por tanto, ser empleadas como parentales femeninos en los cruzamientos híbridos con la línea restauradora, sin la necesidad de la emasculación física de las partes reproductivas masculinas del parental femenino. La presencia de un gen restaurador de la fertilidad masculina en la línea restauradora, da lugar a una progenie híbrida F1 completamente fértil. Si en el parental masculino no hay ningún gen restaurador de la fertilidad, se obtienen híbridos con esterilidad masculina, útiles si los tejidos vegetativos de la planta fueran los más apreciados, pero no cuando la semilla es la parte más valorada de la planta.

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a una semilla de trigo, de aquí en adelante semilla de trigo de la invención, caracterizada por que su material genético comprende:

- a. un fragmento del cromosoma 1H^{ch} de *Hordeum chilense*,
 - b. una doble monosomía para 6H^{ch} y 6D,
 - c. la traslocación 6H^{ch}S/6DL,
- o cualquiera de sus combinaciones.

La presencia en el material genético de la semilla de más de uno de estos factores (el fragmento del cromosoma 1H^{ch} de *Hordeum chilense*, una doble monosomía para 6H^{ch} y 6D o la traslocación 6H^{ch}S/6DL) hace que se obtenga una línea restauradora mucho más efectiva que si sólo se encuentra presente uno de estos factores.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el material genético de la semilla de la invención comprende la introgresión del fragmento del cromosoma 1H^{ch} responsable de la restauración en hemicigosis y el brazo corto del cromosoma 6H^{ch}.

Otro aspecto de la invención se refiere a una célula de trigo, de ahora en adelante célula de trigo de la invención, caracterizada por que su material genético comprende:

- a. un fragmento del cromosoma 1H^{ch} de *Hordeum chilense*,
 - b. una doble monosomía para 6H^{ch} y 6D,
 - c. la traslocación 6H^{ch}S/6DL,
- o cualquiera de sus combinaciones.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el material genético de la célula de la invención comprende la introgresión del fragmento del cromosoma 1H^{ch} responsable de la restauración en hemicigosis y el brazo corto del cromosoma 6H^{ch}.

Se entiende por “trigo” en esta memoria, la especie *aestivum* del Género *Triticum*, Tribu *Triticeae*, Subfamilia *Pooideae*, Familia *Poaceae*, Orden *Poales*, Clase *Liliopsida*, Phylum *Streptophyta*, Reino *Viridiplantae*. Por “traslocación” se entiende el intercambio entre dos o más cromosomas.

En otro aspecto de la invención se proporciona una planta de trigo, de ahora en adelante planta de trigo de la invención, que comprende una pluralidad de células de trigo de la invención, y/o producida tras el crecimiento de la semilla de trigo de la invención.

Otro aspecto se refiere a un cultivo de células de trigo de la invención, capaz de regenerar la planta de trigo de la invención. En una realización preferida de este aspecto, las células del cultivo de la invención proceden de embriones, células meristemáticas, polen, hojas, raíces, raíz inclina, antera, pistilo, flor, semilla, vaina o vástago de la planta de la invención.

El término “cultivo de células” en esta memoria, hace referencia a un cultivo de células aisladas del mismo o diferente tipo de tejido, o una colección de tales células organizadas en partes de una planta o en tejidos (cultivos tisulares). Tipos de cultivos de este tipo son, por ejemplo, cultivos de protoplastos, calli (grupo de callus o células vegetales indiferenciadas capaces de regenerar una planta completa) y células vegetales que están aisladas de plantas o partes de las plantas, tales como embriones, protoplastos, células meristemáticas, polen, hojas o anteras.

ES 2 343 934 B1

En otro aspecto de la invención, se proporciona un grano de polen cuyo material genético es un derivado haploide del material genético de la célula de trigo de la invención.

Otro aspecto de la invención lo constituye un método para producir semillas de trigo híbrido que comprende:

- a. obtener una línea euplásmica formada por plantas híbridas entre *Hordeum chilense* y *Triticum* sp.
- b. obtener una línea aloplásmica formada por plantas de trigo con androsterilidad génico-citoplasmática.
- c. obtener una línea restauradora androesteril formada por plantas de trigo de la invención.
- d. cruzar la línea obtenida en b) con la línea obtenida en c).

Los híbridos entre *Hordeum chilense* y trigo pueden obtenerse emasculando espigas de *H. chilense* y polinizándolas con polen de trigo, al día siguiente de la polinización se aplica una solución de ácido giberélico a 75 ppm y a las tres semanas se rescata el embrión y se cultiva *in vitro*, obteniéndose el híbrido. La duplicación cromosómica de éste da lugar al anfiploide, el tritórdeo octoploide.

La línea aloplásmica se obtiene retrocruzando el tritórdeo octoploide ($H^{ch}H^{ch}AABBDD$) repetidamente con trigo harinero ($2n=6X=42$, AABBDD). La entrada de *Hordeum chilense* a utilizar debe ser la línea H1 de la colección del Instituto de Agricultura Sostenible. Otras entradas de la colección pueden no producir androsterilidad de la línea aloplásmica.

La línea restauradora se podría obtener, pero sin limitarnos, retrocruzando el tritórdeo octoploide ($H^{ch}H^{ch}AABBDD$) repetidamente con trigo harinero ($2n=6X=42$, AABBDD) y seleccionando con marcadores moleculares, como los descritos en las figuras, para la presencia de los cromosomas $1H^{ch}$ y $6H^{ch}$.

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

Breve descripción de las figuras

Fig. 1. Productos de amplificación por PCR usando el marcador ETS k01062 que amplifica específicamente el cromosoma $6H^{ch}S$ en *H. chilense* y no produce un producto de amplificación en trigo. La adición ditelosómica T21 de $6H^{ch}S$ (T21AH1-11) se usa como control positivo. La línea restauradora T593 es amplificada por este par de cebadores, confirmando que el brazo del cromosoma $6H^{ch}S$ es responsable de la restauración de la fertilidad.

Fig. 2. Hibridación *in situ* de las células de los ápices de las raíces en metafase, de la línea restauradora T593 ($42 + 6H^{ch}S$ $6H^{ch}S$). (a) GISH usando una sonda de ADN genómico de *H. chilense* H1 (detectada con antidigoxigenina-FITC). El ADN de los cromosomas de trigo se detecta por tinción DAPI. (b) Señales doble FISH usando la sonda pTa71 (detectada con streptavidina-Cy3) y una sonda de ADN genómico de *H. chilense* H1 (detectada con antidigoxigenina-FITC). Los cromosomas $6H^{ch}S$ muestran un intenso brillo y también son detectados por las sondas pTa71 (se encuentran indicados con flechas).

Fig. 3. Productos de amplificación por PCR usando el par de cebadores consenso de cloroplasto SSR-4. Se distingue un polimorfismo de 25 pb entre los genomas cloroplásticos del trigo harinero y del *H. chilense*. Fragmentos de amplificación de la línea de esterilidad masculina aloplásmica T218 y de la línea restaurada fértil T593 confirman que llevan el citoplasma H1 y que no hay transmisión del citoplasma parental.

Fig. 4. Desarrollo de la gametogénesis del polen en las líneas fértiles T21 and T593 (A1-A5) y en la línea estéril masculina T218 (B1-B5). (A1, B1) Estado de tétrada normal después de la meiosis II en plantas con esterilidad y fertilidad masculina. A2, B2. Se observan microsporas uninucleadas tempranas normales tanto en los genotipos de esterilidad como en los de fertilidad masculina. (A3) Microsporas uninucleadas tardías normales durante la vacuolación de microsporas en líneas fértiles. (A4) Granos de polen binucleados con núcleos vegetativo y generativo perfectamente formado en genotipos fértiles. (B4) Diferentes estados de generación de microsporas del genotipo de esterilidad masculina en una sola antera. (A5) Granos de polen trinucleados normales en antesis. (B5) Ejemplos de diferentes estados de degeneración al final de la microgametogénesis en la línea de esterilidad masculina.

Fig. 5. Desarrollo del polen androestéril (parte superior) y el fértil (parte inferior).

ES 2 343 934 B1

Exposición detallada de modos de realización

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto el valor de los cromosomas $1H^{ch}$ y/o $6H^{ch}S$, y de la traslocación $6H^{ch}S/6DL$) como restauradores de la fertilidad de la línea aloplásmica.

Ejemplo

Desarrollo de la línea aloplásmica

Se obtuvo el tritordeo HT21 ($2n = 8x = 56$, $H^{ch}H^{ch}AABBDD$) después de la hibridación de *H. chilense* H1 ($2n = 2x = 14$, $H^{ch}H^{ch}$) con *T. aestivum* cv. Chinese Spring, renombrado como T21 ($2n = 6x = 42$, $AABBDD$).

Dos espigas de *H. chilense* fueron emasculadas y justo antes de la polinización los vástagos se introdujeron en un cultivo con una solución nutriente a la que se ha añadido ácido giberélico en una proporción de 75 p.p.m. Las espigas fueron polinizadas con polen de *T. aestivum* cv. Chínese Spring y posteriormente mantenidas en un ambiente controlado a $20^{\circ}C$ y luz continua. La solución del cultivo fue renovada en intervalos de 2 días con la solución stock sin ácido giberélico. Las espigas de cebada fueron protegidas con bolsas de polietileno ventiladas.

Se desarrolló un único grano en cada espiga. 16 días después de la polinización el grano fue extraído y se cultivó el embrión del mismo por el procedimiento estándar en agar orquídea. El conteo de los cromosomas en la raíz mostró que la planta tenía 28 cromosomas, como era de esperar de un híbrido de cebada-trigo.

Las espigas de la planta híbrida son esencialmente como las del trigo, pero más largas y más laxas que las de la variedad Chínese Spring y, como en *H. chilense*, con aristas cortas tanto en las glumas como en las lemas. El híbrido fue tratado con colchicina al 0.3% por la técnica del decapitado y algunas espigas dieron granos por autofecundación.

El anfiploide así obtenido, HT21, fue recurrentemente cruzado con el parental de trigo T21, obteniendo una línea aloplásmica llamada T218 ($AABBDD$). Esta línea portaba el citoplasma de *H. chilense*, siendo totalmente estéril.

Identificación de los cromosomas restauradores

T218 fue polinizado y cruzado con el set de líneas de cromosomas de adición en Chínese Spring. El híbrido derivado del cruzamiento T218 x T21 de adición disómica de $6H^{ch}S$ (brazo corto del cromosoma $6H^{ch}$) fue retrocruzado de nuevo como parental materno para la adición disómica de $6H^{ch}S$. La adición ditelosómica de $6H^{ch}S$ en T218 fue seleccionada y denominada T593 ($AABBDD + 6H^{ch}S 6H^{ch}S$).

Cruzamientos con las líneas restauradoras

Con el fin de investigar si otros genes restauradores de la fertilidad eran capaces de restaurar la fertilidad de la línea aloplásmica, T218 fue cruzado con 25 líneas restauradoras de tres fuentes USDA, ARS, Aberdeen (PI 473558, PI 473559, PI 591553, PI 591554, PI 591555, PI 591556, PI 554584, Citr 17452, PI 383343, PI 383344, PI 473548, PI 473549, PI 473551, PI 473552, PI 473553, PI 473555 y PI 473556), CIMMYT (337405, 332258, 332231 y 332197) y líneas proporcionadas por el Dr. Chen, School of Biological Technology and Engineering, Guizhou Normal University, China (QR720, QR715, QR650 y QR3). Los híbridos se crecieron durante dos años sucesivos y nunca se observó restauración de la fertilidad.

Observaciones citológicas

Para el conteo de los cromosomas somáticos, se recolectaron porciones de 1 cm de longitud de las raíces de semillas germinadas y pretratadas durante 4 horas en una solución acuosa de colchicina (0.05%) a $25^{\circ}C$. Fueron fijadas en una mezcla recién hecha de 3 partes de etanol absoluto: 1 parte de ácido acético glacial (v/v) y teñida por la técnica convencional de Feulgen.

Se estudió la microesporogénesis en diferentes estados de desarrollo. Las espigas cortadas se introducen en una mezcla de 3 partes de alcohol absoluto: 1 parte de ácido acético glacial con unas gotas de cloruro de hierro (1 ml de una solución acuosa saturada de cloruro de hierro por 200 ml de la mezcla 3:1). El material fue transferido a alcohol de 90, tras 1-2 horas y guardado a $4^{\circ}C$. Las anteras fueron teñidas con acetocarmin al 0.1%.

Análisis molecular

Se extrajo el ADN de plantas de 5 a 6 semanas, de las líneas T218, T593, T21 y H1, de acuerdo con el protocolo de Doyle and Doyle (1990). Para verificar la presencia del citoplasma de *H. chilense* en las líneas aloplásmicas se emplearon las secuencias consenso de cloroplastos ccSSR-4 desarrolladas por Chung & Staub (2003). Se llevó a cabo

ES 2 343 934 B1

la PCR (*polymerase chain reaction*) en 25 μ l de mezcla de reacción como se describe en Chung & Staub (2003). Se empleó el marcador ETS (*expressed sequence tag*) k01062 (Hagras *et al.* 2005; Nasuda *et al.* 2005) para identificar el cromosoma en la línea restauradora. La PCR se llevó a cabo como se describe en Nasuda *et al.* (2005). Todos los productos de amplificación fueron resueltos por electroforesis en gel de agarosa y visualizados con bromuro de etidio.

5

Hibridación *in situ* (FISH)

Los extremos de las raíces fueron preparados como se describe en la sección de observación citológica. Las preparaciones se hicieron como se describe por Prieto *et al.* (2001). La sonda pTa7, que contiene una unidad de 18S-5.8S-26S rDNA (8.9 kb) de *T. aestivum* (Gerlach & Bedbrook 1979) fue marcada por transcripción con biotín-11-dUTP (Roche Corporate, Basel, Switzerland) y mezclada en la solución de hibridación hasta la concentración final de 5 ng/ μ l. Tras el examen de los núcleos hibridados con su sonda de ADN respectiva, las preparaciones fueron sondadas usando el genoma total de *H. chilense* como sonda. El ADN total de *H. chilense* fue marcado por transcripción con digoxigenina-11-dUTP. El protocolo de hibridación *in situ* fue el de Cabrera *et al.* (2002). Las sondas marcadas de biotina y digoxigenina fueron detectadas con antidigoxigenina-FITC (Roche Corporate) y conjugados de streptavidina-Cy3 (Sigma, St. Louis, MO, USA), respectivamente. Los cromosomas fueron teñidos y contados con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) 339 y montados en Vectashield (Vector Laboratories, Inc.). Se visualizaron usando un microscopio de epifluorescencia Leica. Las imágenes se capturaron con una cámara SPOT CCD usando el software SPOT 2.1 (Diagnostics Instruments, Inc., Sterling Heights, MI, USA) y procesado con el software Photoshop 7.0 (Adobe Systems Inc., San José, CA, USA).

25

Experimentos en invernadero

Se diseñó un experimento con diseño al azar con 5 repeticiones en condiciones de invernadero, para evaluar la morfología y fertilidad de Chínese Spring (T21), la adición ditelosómica de 6H^{ch}S T21, la línea aloplásmica T218 y la línea restauradora T593. Se cultivaron 5 plantas de cada fenotipo en invernadero de diciembre a abril. Se mantuvo la temperatura en invernadero entre 7 y 25°C (noche/día), y se suplementó la luz para mantener un fotoperiodo de 13 horas diarias. Se tomaron los datos de la altura de la planta, aristas por planta, espiguillas por espiga y semillas por planta, y se llevó a cabo un análisis de la varianza usando el método de la diferencia menos significativa (l.s.d.) ($P \leq 0.05$).

35 Identificación de los cromosomas de *H. chilense* responsables de la restauración de la fertilidad masculina

Durante el proceso de obtención de la línea aloplásmica T21 en el citoplasma de H1, algunas plantas con cromosomas remanentes de *H. chilense* llegaron a ser parcialmente autofértiles. Con el fin de identificar los cromosomas de *H. chilense* responsables de la restauración de la fertilidad masculina, la línea T218 fue polinizada y cruzada con el set de cromosomas de adición de las líneas de H1 en Chínese Spring (T21). Se observó alguna fertilidad del polen en el híbrido de adición ditelosómica de 6H^{ch}S derivado del cruzamiento de T218 x T21. Este híbrido fue retrocruzado de nuevo con el ditelo 6H^{ch}S T21 y se seleccionó la adición ditelosómica de 6H^{ch}S en T218, que se llamó T593. Esta línea fue completamente fértil.

Con el fin de verificar que el cromosoma responsable de la restauración de la fertilidad fue 6H^{ch}S, seleccionamos el marcador ETS k01062. La PCR con este marcador da un amplificado diferente en trigo harinero y cebada (*H. vulgare* cv. Betzes) (Nasuda *et al.* 2005), y es asignado al brazo corto del cromosoma 6H en cebada. Más aún, se ha demostrado también amplificado en el cromosoma 6H^{ch} en *H. chilense* (Hagras *et al.* 2005). EST k01062 fue amplificado para el propósito del presente trabajo en líneas T21, H1, T218, T593, y la adición disómica de 6H^{ch} en T21 (llamada T21AH1-11) (Fig. 1). No se obtuvo ningún producto de amplificación cuando se usó T21 y T218 como patrón, mientras que se obtuvo un producto de unos 370 pb cuando se amplificaron las líneas 6H^{ch}S ditelo H1, T593 y T21. Este resultado confirma que la adición del brazo del cromosoma 6H^{ch}S es responsable de la restauración, y podría implicar que el brazo del cromosoma 6H^{ch}S lleva al menos un gen restaurador de la fertilidad.

55

Caracterización citogenética

La línea fértil T593 también se caracterizó mediante técnicas de hibridación *in situ* fluorescente (FISH), hibridación *in situ* genómica (GISH) en T593, usando el ADN genómico de *H. chilense* H1 como sonda, claramente detectó la adición ditelosómica de los cromosomas de *H. chilense*. (Fig. 2). La sonda pTa71, que contiene una unidad de 18S-5.8S-26S rDNA (localizada en la región organizadora nuclear de los cromosomas (NORs)) combinada con la sonda de ADN genómico de *H. chilense* se empleó para confirmar la presencia de la adición ditelosómica 6H^{ch}S en la línea restauradora T593 (Fig. 2). La NOR en *Hordeum* se localiza en los segmentos cromosómicos 5HS y 6HS, por lo que la presencia de la señal de la sonda pTa71 en los cromosomas de *H. chilense* confirma los resultados de los marcadores moleculares en identificar la adición ditelosómica 6H^{ch}S.

65

ES 2 343 934 B1

Caracterización molecular citoplásmica

Para comprobar que la restauración de la fertilidad es consecuencia de la adición cromosómica 6H^{ch}S, y no como resultado de la pérdida de aloplasmia (transmisión del citoplasma paternal a la línea T593), se emplearon varios pares de primers ccSSR, que detectan polimorfismos entre *H. chilense* y Chinese Spring, que son fácilmente visualizables en electroforesis en agarosa. Se ha visto que el cebador ccSSR-4 es polimórfico, amplificando productos de 200 bp en trigo, y 225 bp en el citoplasma H1 (Atienza *et al.* 2007c). La línea T593 fue amplificada con esta pareja de primers, confirmando que era una línea aloplásmica (Fig. 3).

Caracterización morfológica: morfología, fertilidad y medioambiente

La CMS de la línea aloplásmica T218, así como la fertilidad de la línea restauradora T593, fueron estables bajo diferentes condiciones ambientales: cámara de crecimiento, invernadero y campo abierto. Cuando se compara con el trigo común, las líneas aloplásmicas T218 y T593 tuvieron un retraso de 3-4 días en la anthesis cuando se crecieron en el invernadero y en la cámara de crecimiento bajo condiciones de días largos, aunque la diferencia fue de 7 días cuando se creció en campo abierto. Aparte de la carencia de polen viable en la línea de esterilidad masculina, las plantas no exhibieron otras anomalías florales o del desarrollo. Ninguna arruga o defecto de germinación se observó en las semillas de las líneas aloplásmicas.

Los datos de la tabla 2 muestran los resultados de comparar las líneas T21, T218, la adición ditelosómica de 6H^{ch}S a T21 y T593, en términos de morfología y fertilidad en condiciones de invernadero. El ditelo 6H^{ch}S T21 fue incluido en el cuadro para comparar T593 vs ditelo 6H^{ch}S T21, por ejemplo, los mismos genotipos en los citoplasmas de H1 y T21, respectivamente. Por esta comparación es posible un mejor análisis del efecto del citoplasma H1. Se ha visto que la línea T218 era alrededor de 18 cm más corta (en altura) que la T21. Sin embargo, aunque se observó que la línea restauradora T593 era unos 10 cm más corta que la T21, en este cuadro no se encontró diferencias significativas, ni con la T21 ni con el ditelo 6H^{ch}S T21. El número de aristas por planta no fue estadísticamente significativo entre los genotipos. El número de espiguillas por espiga fue menor en la línea con esterilidad masculina T218 que en cualquier otro genotipo, mientras la línea restauradora T593 mostraba un valor intermedio entre el T21 y el ditelo 6H^{ch}S T21. El número de vástagos por planta no fue significativamente diferente entre los genotipos. El número de espiguillas por espiga fue menor en la línea con esterilidad masculina T218 que en cualquier otro genotipo, mientras que la línea restauradora T593 muestra un valor intermedio entre el T21 y el ditelo 6H^{ch}S T21. El grado de esterilidad en la línea con esterilidad masculina T218 fue de un 100%, y la línea restauradora T593 mostró aproximadamente un 68% de granos viables comparado con T21, y un 77% comparado con el ditelo 6H^{ch}S T21.

Cruzamientos con 25 genes restauradores de la fertilidad conocidos

La línea estéril aloplásmica T218 se cruzó con 25 líneas restauradas de diferentes sistemas CMS de trigo para testar su habilidad de restaurar la fertilidad. Ninguna de las plantas F1 mostró ningún grado de fertilidad cuando se crecieron en campo abierto. Se llevó a cabo un segundo experimento empleando 25 líneas en condiciones de invernadero, pero de nuevo, ninguna de las plantas F1 mostró ningún grado de fertilidad.

TABLA 2

Comparación de las líneas T21, T218, y la adición ditelosómica de 6H^{ch}S a T21 y T593, en términos de morfología y fertilidad en condiciones de invernadero

Genotipo	Citoplasma	Número de cromosomas	Longitud de la planta (cm)	Vástagos por planta	Espiguillas por espiga	Semillas por planta
T21	T21	42	98.6 ± 4.6a	6.8 ± 0.6a	17.2 ± 1.0b	232 ± 33.8a
T218	H1	42	80.7 ± 4.1b	8.2 ± 1.2a	13.6 ± 0.2c	0.0c
T21AH1-11	T21	42 + 6H ^{ch} S 6H ^{ch} S	96.0 ± 2.8a	6.6 ± 0.2a	20.2 ± 0.7a	204.8 ± 16.6ab
T593	H1	42 + 6H ^{ch} S 6H ^{ch} S	98.6 ± 2.5a	6.8 ± 1.9a	15.6 ± 0.7bc	157.2 ± 18.5b

REIVINDICACIONES

1. Célula de trigo **caracterizada** por que su material genético comprende:

5

a. un fragmento del cromosoma 1H^{ch} de *Hordeum chilense*,

b. una doble monosomía para 6H^{ch} y 6D,

10

c. la traslocación 6H^{ch}S/6DL,

o cualquiera de sus combinaciones.

15

2. Célula de trigo según la reivindicación 1, donde dicha célula procede de embriones, células meristemáticas, polen, hojas, raíces, raíz inclina, antera, pistilo, flor, semilla, vaina o vástago.

3. Cultivo de células que comprende la célula según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2.

20

4. Uso de la célula de trigo según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, o del cultivo de células según la reivindicación 3, para regenerar una planta de trigo.

5. Método de obtención de una planta que comprende la célula según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, que comprende:

25

a. obtener una línea euplásmica formada por plantas híbridas entre *Hordeum chilense* y *Triticum* sp.,

b. obtener una línea aloplásmica formada por plantas de trigo con androsterilidad génico-citoplasmática,

30

c. obtener una línea restauradora que comprende células según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde dicha línea restauradora se identifica mediante la amplificación por PCR del marcador ETS k01062 que corresponde a un fragmento del cromosoma 6H^{ch}S de *H. chilense*, y

d. cruzar la línea obtenida en b) con la línea obtenida en c).

35

40

45

50

55

60

65

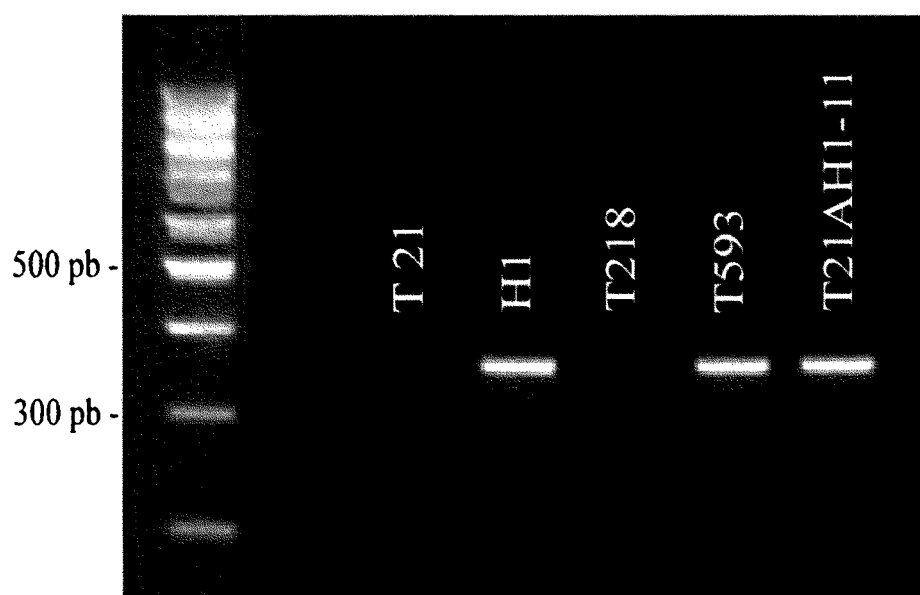


FIG. 1

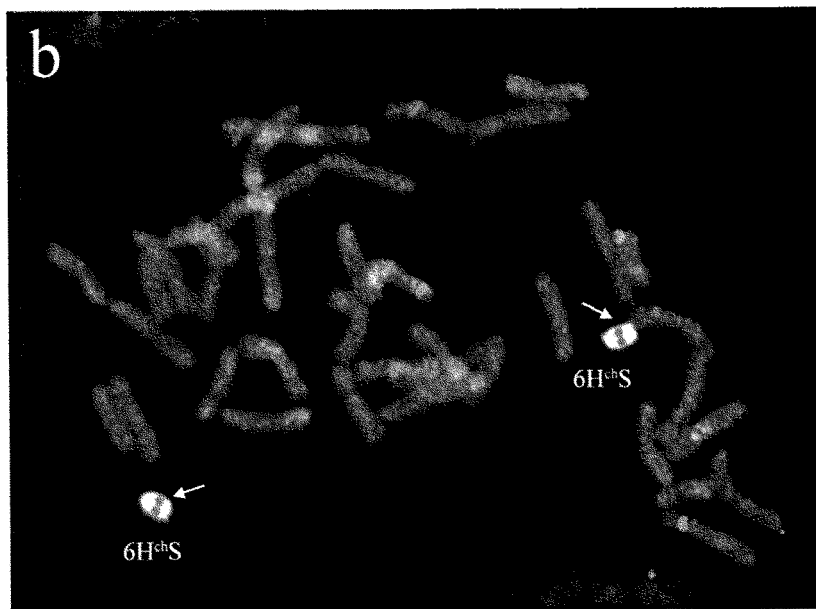
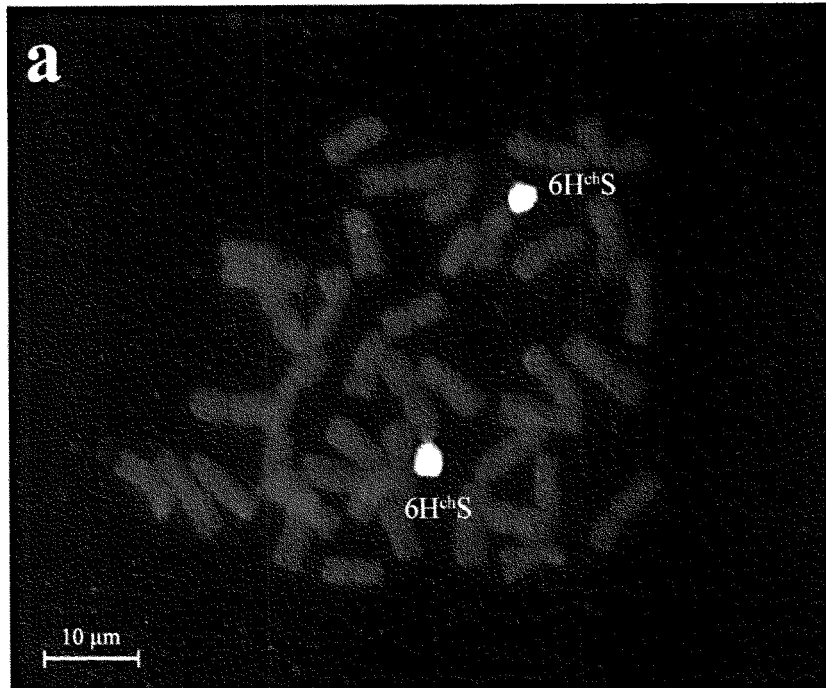


FIG. 2Ay 2B

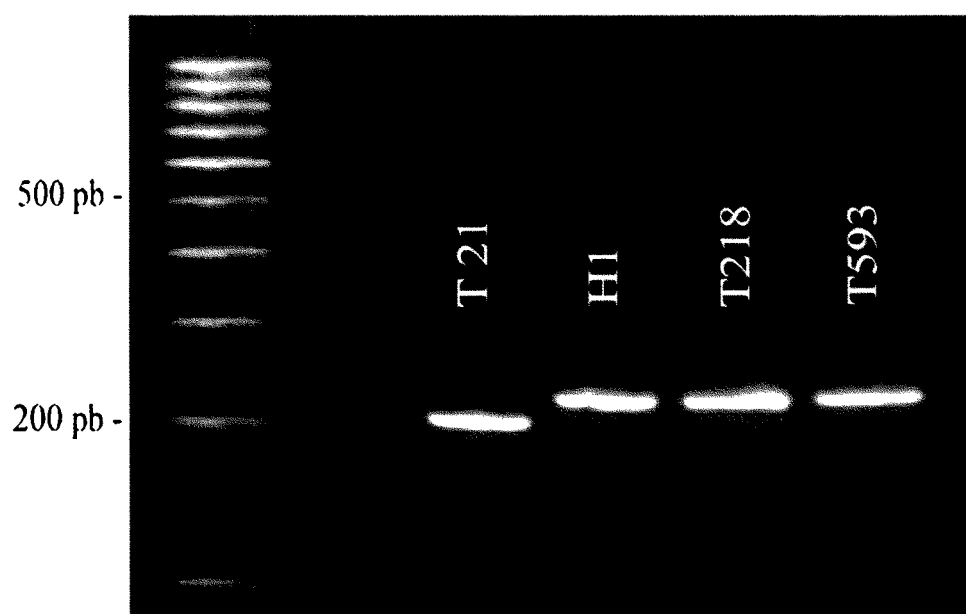


FIG. 3

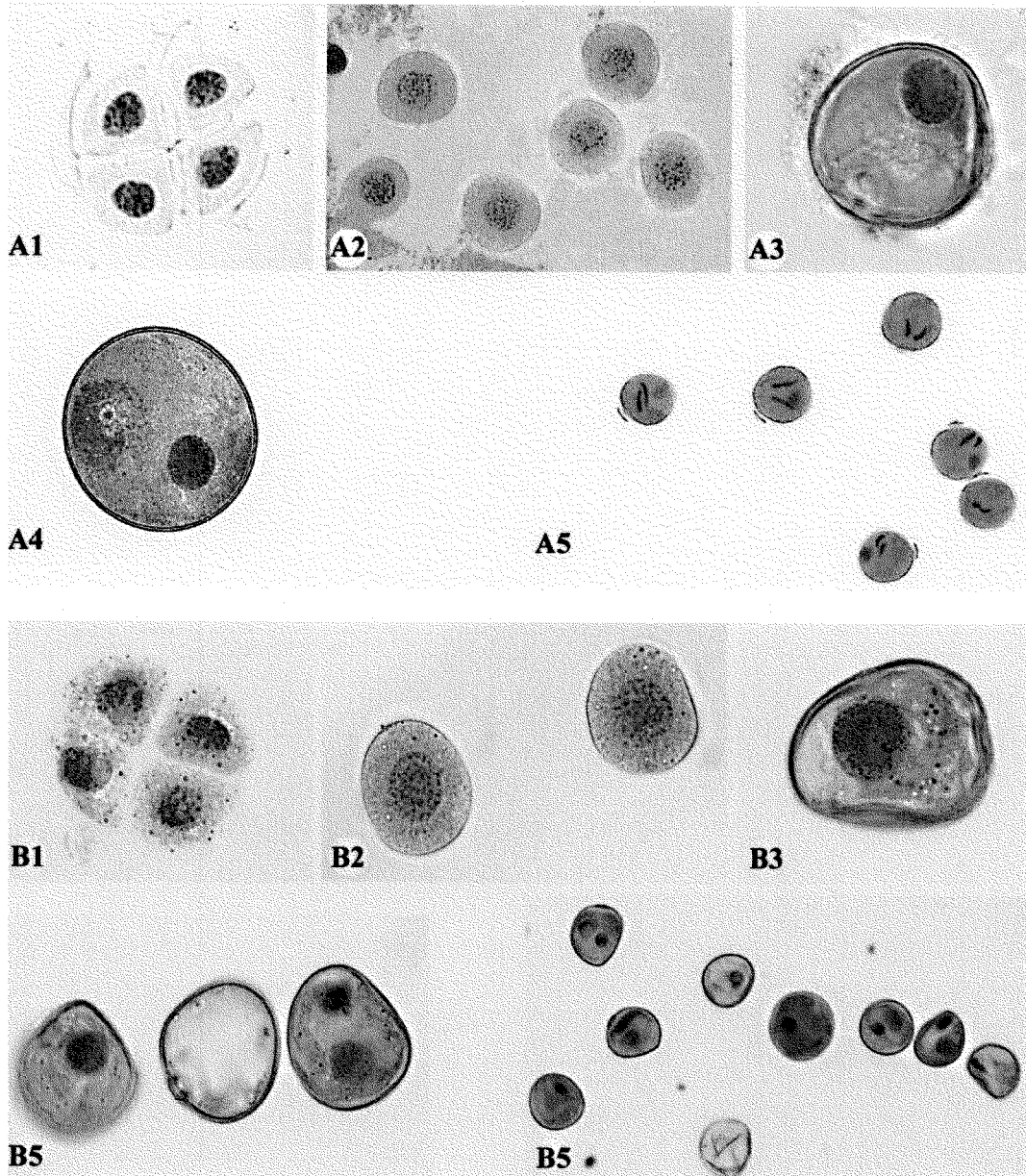


FIG. 4A y 4B

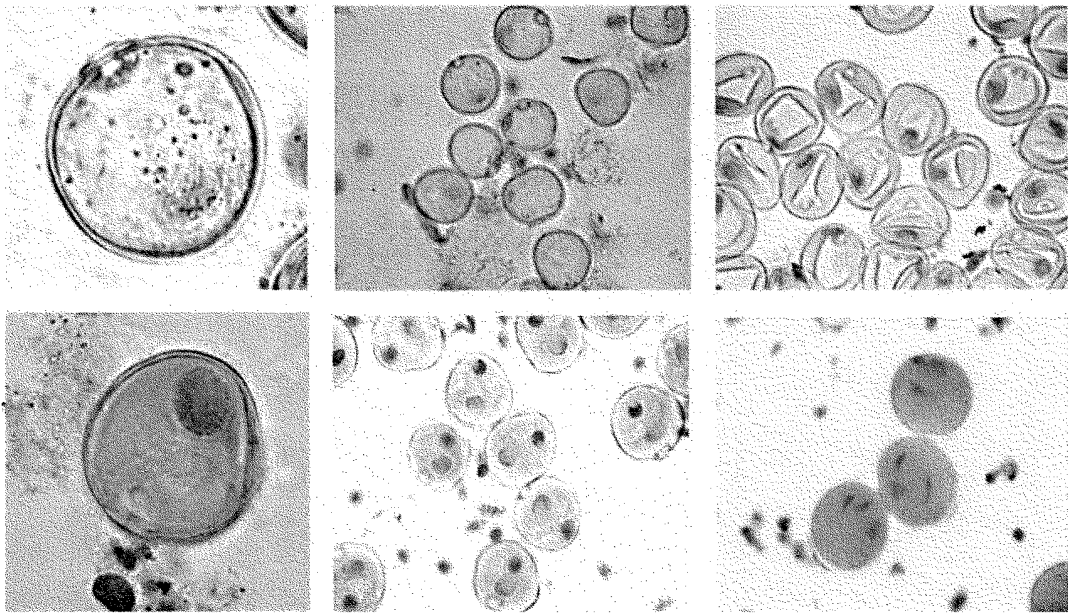


FIG. 5



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 343 934

② Nº de solicitud: 200803286

③ Fecha de presentación de la solicitud: 18.11.2008

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **A01H 1/00** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	MARTIN A.C, et al. Male fertility restoration of wheat in Hordeum chilense cytoplasm is associated with 6HchS chromosome addition. 11.03.2008. Australian Journal of Agricultural Research. Vol. 59(3), páginas 206-213.	1-5
A	WO 02098209 A3 (NORTHWEST PLANT BREEDING CO.) 12.12.2002	1-5
A	MARTIN A, et al. The development of tritordeum: a novel cereal for food processing. 1999. Journal of Cereal Science. Vol. 30, páginas 85-95.	1-5
A	WO 2007134122 A2 (THE CURATORS OF THE UNIVERSITY OF MISSOURI) 22.11.2007	1-5

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
29.07.2010

Examinador
I.Rueda Molins

Página
1/4

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

A01H

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

INVENES, EPODOC, WPI, TXT

OPINIÓN ESCRITA

Nº de solicitud: 200803286

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 29.07.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1 - 5	SÍ
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SÍ
	Reivindicaciones 1 - 5	NO

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

Base de la Opinión:

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

1. Documentos considerados:

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	MARTIN A.C, et al. Male fertility restoration of wheat in Hordeum chilense cytoplasm is associated with 6HchS chromosome addition. Australian Journal of Agricultural Research. Vol.59(3), páginas 206-213.	11-03-2008
D02	WO 02/098209 A3 (NORTHWEST PLANT BREEDING CO.).	12-12-2002
D03	MARTIN A, et al. The development of tritordeum: a novel cereal for food processing. Journal of Cereal Science. Vol.30, páginas 85 - 95.	1999
D04	WO 2007/134122 A2 (THE CURATORS OF THE UNIVERSITY OF MISSOURI).	22-11-2007

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

La solicitud de patente divulga el modo en el que se puede restaurar la fertilidad en trigo, mediante la introgesión en el mismo, de genes procedentes de Hordeum chilense.

El documento D01, que es el que refleja el estado de la técnica más cercano, divulga como la restauración de la fertilidad de una línea aloplásmica de trigo obtenida con Hordeum chilense, está asociada con el cromosoma 6HchS.

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Artículos 6 y 8 LP 11/1986)

En las reivindicaciones 1 y 2 de la solicitud de patente se reivindica una célula de trigo caracterizada por que su material genético comprende un fragmento del cromosoma 1Hch de Hordeum chilense. La reivindicación 3 reivindica un cultivo de dichas células y en la reivindicación 4 se reivindica el uso de las citadas células o del cultivo para regenerar una planta. El documento D01 divulga la adición del brazo corto del cromosoma 6HchS de Hordeum chilense al trigo. La diferencia entre la solicitud de patente y el documento D01, reside en que en la solicitud de patente se introduce un fragmento del cromosoma 1Hch en trigo procedente de Hordeum chilense, mientras que, en el documento D01, el fragmento introducido corresponde al brazo corto del cromosoma 6HchS de Hordeum chilense. El modo de realización de la invención de la solicitud de patente (que se muestra en las páginas 11 - 19), coincide con la información divulgada en el apartado de material y métodos del documento D01. Teniendo en cuenta toda esta información, se puede afirmar, que el objeto reivindicado en las reivindicaciones 1 - 4 deriva de manera evidente del estado de la técnica y la realización del mismo, no presentaría dificultad técnica para un experto en la materia. Por tanto, las reivindicaciones 1 - 4 presentan novedad, pero carecen de actividad inventiva según lo establecido en los Artículos 6 y 8 LP 11/1986.

En la reivindicación 5 de la solicitud de patente se reivindica un método de obtención de una planta que comprende la célula anteriormente reivindicada (en las reivindicaciones 1 y 2). Dicho procedimiento es un procedimiento de cruce y selección, que emplea un marcador determinado. La obtención de una planta mediante realización de cruces y empleando marcadores para su selección es un procedimiento ampliamente conocido en el estado de la técnica que no presentaría dificultad técnica para un experto en la materia. Por tanto, la reivindicación 5 presenta novedad, pero carece de actividad inventiva según lo establecido en los Artículos 6 y 8 LP 11/1986.