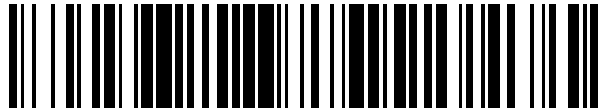


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 397 070**

51 Int. Cl.:

A01H 5/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.07.2009 E 09780557 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2012 EP 2306808**

54 Título: **Plantas de puerro androestériles citoplasmáticas**

30 Prioridad:

14.07.2008 NL 1035698

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

04.03.2013

73 Titular/es:

**BEJO ZADEN B.V. (100.0%)
Trambaan 1
1749 CZ Warmenhuizen, NL**

72 Inventor/es:

**VAN CAPPELLEN, WITTE;
ADRIAANSE, MARCEL;
LANGEDIJK, EDUARD, ALPHONSUS;
BONGERS, HENRICUS, CHRETIEN, MARIE,
LOUISE y
SCHRIJVER, ALBERTUS, JOHANNES, MARIA**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 397 070 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).

DESCRIPCIÓN

Plantas de puerro androestériles citoplasmáticas.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a plantas de puerro androestériles citoplasmáticas (CMS).

5 Antecedentes de la invención

El puerro (*Allium porrum* o *Allium ampeloprasum*), pertenece a la familia de las Liliáceas y se utiliza como cultivo en diversos países. Las variedades de puerro de que se disponía en el comercio han sido cruces obtenidos por polinización abierta hasta que han sido desarrolladas plantas de puerro híbridas. Estas plantas de puerro híbridas son plantas producidas por cruzamiento de una población de puerros seleccionada, con otra población de puerros seleccionada. Las plantas de puerro híbridas proporcionan ventajas sobre las de los cruces obtenidos por polinización abierta, tales como uniformidad, vitalidad y tolerancia a las enfermedades, lo que ha dado por resultado un uso creciente de híbridos de puerro en las producciones comerciales de puerro.

Las plantas de puerro híbridas son producidas, generalmente, mediante un procedimiento designado en la técnica como "androesterilidad nuclear". La androesterilidad nuclear es una forma de androesterilidad en la que el factor genético responsable de la esterilidad observada ha sido codificado por el genoma nuclear.

El término "androesterilidad" indica que una planta carece de polen fértil y, debido a ello, la planta androestéril es incapaz de autopolinización

Como resultado de la androesterilidad codificada por el genoma nuclear, este tipo de esterilidad de los vegetales es heredado solamente por algunos miembros de la progenie. Por consiguiente, con objeto de mantener las características de la androesterilidad nuclear, con frecuencia se requiere la propagación vegetativa de una línea parental afectada de androesterilidad nuclear.

Un ejemplo de propagación vegetativa para obviar la pérdida parcial de esterilidad anterior en la progenie, es la propagación por cultivo de tejidos. Un inconveniente de la propagación vegetativa por cultivo de tejidos es que el método consume mucho tiempo y es costoso. Otras formas de propagación vegetativa, tales como la producción de plantas jóvenes a este respecto, dan por resultado un riesgo importante de trastornos de desarrollo de las plantas y la diseminación de enfermedades e infecciones, por ejemplo, infecciones ocasionadas por virus.

Tomando en consideración entre otros factores, las desventajas indicadas asociadas con la propagación vegetativa, el uso de androesterilidad nuclear adolece de inconvenientes importantes en lo que respecta a su empleo para la producción, o propagación, de plantas de puerro híbridas.

Otra forma de androesterilidad es la androesterilidad citoplasmática codificada (CMS) En armonía con el conocimiento general en el campo de la producción vegetal, la androesterilidad citoplasmática codificada indica que la característica observada, o el rasgo fenotípico apreciado, se forman en plantas que no poseen polen fértil, lo que da como resultado que estas plantas no son capaces de autopolinización, está codificada genéticamente en el citoplasma, en la mayoría de los casos por el DNA mitocondrial y en algunos casos por el DNA de los cloroplastos. La androesterilidad citoplasmática codificada es heredada por medio de la línea femenina, es decir, la androesterilidad citoplasmática codificada es transferida a la progenie a través del citoplasma de una célula huevo. Es posible restaurar la fertilidad de la progenie utilizando genes Rf (restauración de la fertilidad). Dado que estos genes Rf se heredan de modo mendeliano, al contrario que el material genético codificante del citoplasma que solamente es heredado por medio de la línea femenina, es probable que estos genes Rf estén codificados por el genoma nuclear.

La androesterilidad citoplasmática codificada parece ser una alternativa adecuada y ventajosa para la producción de plantas de puerro híbridas. Esta razón, entre otras, es debida a la posibilidad de mantener esa propiedad en la progenie sin necesitar ninguna medida adicional.

Compendio de la invención

Por consiguiente, es un objeto, entre otros objetos, de la presente invención, proporcionar plantas de puerro (*Allium ampeloprasum*) androestériles citoplasmáticas. Este objeto, entre otros objetos, se cumple por la presente invención a través de un método según se describe en esta memoria.

5 En su búsqueda para proporcionar plantas de puerro (*Allium ampeloprasum*) androestériles citoplasmáticas, se ha seguido una ruta no convencional. Específicamente, se comenzó a identificar formas de androesterilidad citoplasmática codificada en una planta en la que no se habían conocido, o no se habían observado, formas de androesterilidad citoplasmática codificada. Esto dio por resultado la identificación de androesterilidad citoplasmática en el ajo (*Allium sativum L.*).

10 Específicamente, usando las técnicas descritas en el documento WO9847371, los inventores intensificaron sus estudios sobre la fertilidad del polen del ajo. Esto permitió una búsqueda enfocada hacia la androesterilidad del ajo. En particular, los inventores han tenido éxito en el desarrollo de plantas de ajo con una inflorescencia androestéril, al tiempo que mantienen su fertilidad femenina. Después de estudiar la herencia, es decir, el legado de la esterilidad observada, se puso de manifiesto que esta androesterilidad se hereda a través de la línea femenina, lo que es indicativo de una forma de androesterilidad citoplasmática codificada.

Según esto, se ha depositado una planta de ajo (*Allium sativum L.*) androestéril citoplasmática en el NCIMB de Aberdeen, Escocia, Reino Unido, con el número de depósito NCIMB 41563.

15 Conforme a una realización preferida, la androesterilidad citoplasmática codificada (CMS) de las presentes plantas de puerro (*Allium ampeloprasum*) es androesterilidad codificada por mitocondrias. La expresión "codificada por mitocondrias" indica que el factor genético que produce la androesterilidad se encuentra en las mitocondrias.

20 Según la presente invención, las actuales plantas de puerro (*Allium ampeloprasum*) androestériles citoplasmáticas (CMS) comprenden mitocondrias de una planta de ajo (*Allium sativum L.*) con el número de depósito NCIMB 41563 que codifican androesterilidad citoplasmática. Por consiguiente, la planta de ajo (*Allium sativum L.*) específica, con el número de depósito NCIMB 41563, se designa también en esta memoria como el donador de androesterilidad citoplasmática codificada.

25 La actual planta de puerro (*Allium ampeloprasum*) androestéril citoplasmática (CMS) puede ser una planta de puerro con el número de depósito NCIMB 41556. Los inventores han depositado esta planta de puerro específica en el NCIMB de Aberdeen, Escocia, Reino Unido, con el número de depósito NCIMB 41556, o planta desde la que se origina la androesterilidad citoplasmática.

La presente invención, según otro aspecto, se refiere a las semillas, el polen, partes de plantas maduras, o partes de plantas o células embrionarias, de las actuales plantas de puerro (*Allium ampeloprasum*) androestériles citoplasmáticas (CMS).

30 Pueden ser ejemplos no limitativos, aunque preferidos, de partes de plantas maduras, un foliolo, limbo, ovario, filamento, estilo, estigma, peciolo, yema lateral, tallo, cotiledón, hipocotilo, flor, raíz ramificada, o raíz principal.

Pueden ser ejemplos no limitativos, aunque preferidos, de plantas o células embrionarias, una radícula, un hipocotilo, epicotilo, bulbo, bulbillo, una raíz fibrosa, un foliolo o una túnica.

Se describe una planta de ajo (*Allium sativum L.*) androestéril citoplasmática (CMS) con el número de depósito NCIMB 41563.

35 Tal planta de ajo androestéril citoplasmática puede ser obtenida mediante selección de plantas procedentes de una población de plantas de ajo con inflorescencia mejorada según el método descrito en el documento WO9847371. El Ejemplo 1 que figura más adelante expone una descripción más detallada para obtener una planta de ajo con androesterilidad citoplasmática, o CMS. Semillas procedentes de plantas con CMS han sido depositadas en el NCIMB, Aberdeen, Escocia, Reino Unido, con el número 41563.

40 Se describen semillas, polen, partes de plantas maduras, o partes de plantas o células embrionarias, de una planta de ajo (*Allium sativum L.*) con el número de depósito NCIMB 41563.

Pueden ser ejemplos no limitativos de partes de plantas maduras, un foliolo, limbo, ovario, filamento, estilo, estigma, peciolo, yema lateral, tallo, cotiledón, hipocotilo, flor, raíz ramificada o raíz principal.

45 Pueden ser ejemplos no limitativos de plantas o células embrionarias, una radícula, un hipocotilo, epicotilo, bulbo, bulbillo, raíz fibrosa, foliolo o túnica.

Se describe el uso de la actual planta de puerro (*Allium ampeloprasum*) androestéril citoplasmática (CMS) para proporcionar androesterilidad citoplasmática codificada. Además, se describe el uso de una planta de ajo (*Allium sativum L.*) con el número de depósito NCIMB 41563 para proporcionar androesterilidad citoplasmática codificada.

Además, se describe el uso de las semillas, el polen, partes de plantas maduras, o partes de plantas o células embrionarias procedentes de dicho puerro y dicho ajo, para proporcionar androesterilidad citoplasmática codificada.

Se describe el uso de una planta de ajo (*Allium sativum* L.) para proporcionar androesterilidad citoplasmática codificada en una planta, preferiblemente una planta de puerro (*Allium ampeloprasum*).

- 5 Se describe una planta de ajo utilizada para proporcionar androesterilidad citoplasmática codificada en una planta escogida del género *Allium*, por ejemplo puerro (*Allium ampeloprasum*), cebolla (*A. cepa* L.), cebollino (*A. schoenoprasum*), ramson (*A. ursinum*), cebollino chino (*A. tuberosum* Rottier) o (*Allium sativum* L.).

Se describe una planta de ajo androestéril citoplasmática.

- 10 Se describen métodos para producir una planta de puerro (*Allium ampeloprasum*) androestéril citoplasmática (CMS) que comprende androesterilidad citoplasmática codificada procedente de una planta de ajo (*Allium sativum* L.) con el número de depósito NCIMB 41563, que comprende las etapas de :

- 15 (i) cruzar una planta de puerro (*Allium ampeloprasum*) con una planta de ajo (*Allium sativum* L.) en la que dicha planta de ajo (*Allium sativum* L.) trae su origen de, o es, una planta de ajo (*Allium sativum* L.) con el número de depósito NCIMB 41563, para proporcionar una población de plantas F1 que comprenden androesterilidad citoplasmática codificada:
- (ii) someter a retrocruzamiento una de las plantas androestéril citoplasmática, F1, obtenida en la etapa (i), con una planta de puerro (*Allium ampeloprasum*), preferiblemente la planta de puerro de la etapa (i), para proporcionar una población de plantas androestériles citoplasmáticas retrocruzadas, BC₁;
- 20 (iii) opcionalmente, someter a retrocruzamiento una o más veces una planta BC₁ obtenida en la etapa (ii), con una planta de puerro (*Allium ampeloprasum*), preferiblemente la planta de puerro de la etapa (i), para proporcionar una población subsiguiente de plantas androestériles citoplasmáticas retrocruzadas, BC_n.

- 25 En el método se combina una planta de ajo androestéril citoplasmática, como donador mitocondrial, con una planta de puerro androfértil. Una planta de ajo (*Allium sativum* L.) que trae su origen de, o que es, una planta de ajo (*Allium sativum* L.) con el número de depósito NCIMB 41563, puede ser considerada como la reserva de semillas (o intermediaria) para proporcionar plantas CMS.

- 30 El primer cruzamiento da por resultado el desarrollo de híbridos de ajo – puerro que comprenden androesterilidad citoplasmática codificada, que forman una población de plantas F1. Estos híbridos proporcionan una vía para el desarrollo con éxito de las actuales plantas de puerro. Las plantas de la población F1 pueden ser ensayadas para detectar la presencia de CMS mediante el estudio de su capacidad de autopolinización, y determinando si la androesterilidad observada se transfiere a través de la línea femenina, es decir, el citoplasma.

- 35 En general, las células que proceden de las plantas F1 obtenidas según la etapa (i) poseen un genoma nuclear que puede ser considerado como un genoma intermedio entre ajo y puerro, es decir, estas plantas comprenden un genoma nuclear que trae su origen desde ambos, puerro y ajo. Debido al uso de ajo como el donador femenino, esencialmente, el citoplasma y, más particularmente, las mitocondrias y los cloroplastos, son derivados desde la planta de ajo femenina donadora. Con objeto de proporcionar plantas de puerro, es decir, plantas que comprenden sustancialmente el DNA nuclear del puerro, las plantas androestériles citoplasmáticas F1 según la etapa (i), son sometidas a retrocruzamiento con plantas de puerro (etapa (ii)), preferiblemente, la actual planta de puerro masculina donadora, hasta que son proporcionadas plantas de puerro.

- 40 El retrocruzamiento de plantas androestériles citoplasmáticas BC₁, es decir, las plantas del primer cruce, con una planta de puerro fértil, puede continuar a lo largo de un par de generaciones, preferiblemente generaciones sucesivas, con objeto de incrementar la cantidad del material genómico de la planta de puerro en el genoma nuclear de la línea de plantas BC.

- 45 Este retrocruzamiento puede continuarse a lo largo de varias generaciones (por ejemplo BC₂ a BC_n) de la línea BC. En general, en cada retrocruzamiento, la cantidad del material genómico del ajo - puerro se reducirá a la mitad. De este modo la utilización de retrocruzamientos proporciona una planta en la que el genoma nuclear comprende sustancialmente material genético nuclear de puerro. Una planta tal es considerada en la técnica como una planta de puerro, es decir, que proporciona todos los rasgos fenotípicos asociados generalmente en la técnica con las plantas de puerro y de codificación nuclear.

Las plantas con un genoma nuclear de puerro que es, por lo menos, 95%, preferiblemente 98%, más preferiblemente 99% y, lo más preferible, sustancialmente el 100%, y que comprenden además la actual androesterilidad citoplasmática codificada, son preferidas y adecuadas para obtener otras plantas de puerro con propiedades de androesterilidad citoplasmática codificada.

- 5 El método anterior para producir una planta de puerro (*Allium ampeloprasum*) androestéril citoplasmática (CMS), puede comprender seleccionar plantas androestériles citoplasmáticas que comprenden mitocondrias que codifican androesterilidad citoplasmática que trae su origen de NCIMB 41563, utilizando análisis de DNA.

- 10 El análisis de DNA puede estar basado en el análisis del DNA mitocondrial, por ejemplo, sondas mitocondriales específicas que son específicas del citoplasma del ajo y que, por tanto, están enlazadas con la propiedad de androesterilidad citoplasmática codificada.

El análisis de DNA puede estar basado en el análisis del DNA nuclear. Por ejemplo, pueden seleccionarse desde la progenie BC, plantas BC cruzadas, con una proporción importante de material genómico del puerro. Pudo observarse que la eliminación del material genético del ajo sucede más rápidamente de lo que era de esperar sobre la distribución teórica mutua de los cromosomas.

- 15 Después de cada generación, se usa citometría de flujo, para medir la cantidad relativa de DNA, y determinar en que extensión las plantas híbridas obtenidas comprenden un genoma intermedio de ajo - puerro. Sorprendentemente, se puso de manifiesto que algunas plantas no comprendían una cantidad que pudiera medirse del genoma del ajo después de dos generaciones de retrocruzamiento y, por tanto, dentro del error experimental de este tipo de medidas, estas plantas comprendían sustancialmente el 100% del DNA nuclear que trae su origen desde el puerro.

- 20 El método anterior para producir plantas de puerro (*Allium ampeloprasum*) androestériles citoplasmáticas (CMS), puede comprender, además, un tratamiento hormonal para influir en el tiempo de floración de las actuales plantas de puerro (*Allium ampeloprasum*) y/o ajo (*Allium sativum* L.)

- 25 Como es conocido en la técnica, los procedimientos tales como rescate embrionario u otros procedimientos tales como germinación *in vitro* o tratamiento hormonal para influir en el tiempo de floración de las plantas, pueden ofrecer ventajas para cruzar plantas de diferentes especies. En diversos casos, puede ser necesario el uso de estos procedimientos.

El método da por resultado una planta con un genoma nuclear de puerro, que comprende androesterilidad citoplasmática codificada (CMS) que trae su origen desde el ajo (*Allium sativum* L.) con el número de depósito NCIMB 41563.

30 Descripción breve de los dibujos

La invención se ilustra, además, en los siguientes ejemplos no limitativos. En los ejemplos se hace referencia a las figuras adjuntas, en las que:

- 35 La figura 1 muestra fotografías de A: la inflorescencia de una planta de ajo estéril citoplasmática de la invención, B: la inflorescencia de una planta de ajo androfértil, y C: la inflorescencia de una planta estéril citoplasmática con un genoma nuclear que deriva del puerro.

La figura 2 muestra la estructura de un fragmento de restricción que puede obtenerse del experimento de amplificación por PCR y digestión del ejemplo 2 que figura más adelante.

Ejemplos

Ejemplo 1

- 40 Por aplicación del método según se describe en el documento WO9847371, se obtienen plantas de ajo que ponen de manifiesto una floración fértil. Se entiende que una floración fértil significa la ausencia parcial o total de bulbillos en la inflorescencia de este ajo. Al mismo tiempo las flores actuales se desarrollan buenas y completas.

El tratamiento de plantas de ajo del modo descrito por esta patente conduce a un primer estudio en profundidad sobre la inflorescencia del ajo.

- 45 Sorprendentemente, pudieron seleccionarse algunas plantas de ajo en las que se determinó una forma de androesterilidad (CMS) no mendeliana en los descendientes. Se determinó que esas plantas no habían formado

polen y que esta propiedad se transmite al 100% de la siguiente generación por medio de las células huevo. Si hubiera descendencia mendeliana se supuso que, entonces, contenía esta propiedad el 50% de la generación siguiente.

5 La inflorescencia de una planta de ajo CMS se ilustra en la figura 1A. Comparando esta inflorescencia con la inflorescencia de una planta de ajo androfértil, como ilustra la figura 1B, queda claro que en la inflorescencia de la figura 1A están presentes estambres que no son portadores de polen.

Ejemplo 2

10 Seis líneas de plantas de ajo CMS, caracterizadas por los números G18110, G18132, G18133, G18135, G18161 y G18166, fueron hechas florecer conjuntamente con un amplio espectro de líneas de puerro con objeto de aumentar los turnos de polinización Este espectro fue escogido de tal modo que la floración del polinizador de puerro fuera tan larga como sea posible.

En estas seis líneas se determinó en diferentes extensiones fructificación asimétrica, y se utilizó germinación *in vitro*, preferiblemente dentro de 6 – 8 semanas después de la polinización.

15 Si los embriones que se desarrollan no se retiraran y fueran conservados, tendría lugar una degeneración del endospermo.. este fenómeno ha sido descrito claramente, por ejemplo, por Sharma et al., y no lleva al desarrollo posterior de semillas viables. Esta técnica se empleó si la fructificación asimétrica típica era claramente visible a simple vista. El cambio de color de un ovario, desde el color pardo ligero hasta el color negro, tuvo lugar en un medio B5 (Gamborg et al.), que es un medio utilizado con frecuencia en la técnica de germinación *in vitro*.

20 Se puso de manifiesto que era esencial para el uso de esta técnica, que el retardo de floración del puerro y la estimulación de la floración del ajo estuviera influida por tratamientos que influyeran en el tiempo de floración Son ejemplos de ello, tratamientos hormonales, variaciones de temperatura y de la longitud de días.

En este caso específico, un centenar de ovarios diferentes, en diferentes fases de desarrollo, fueron sometidos a examen. Brotaron 43 plantas individuales.

25 Mediante la utilización de citometría de flujo (Partec, Münster, Alemania) se midieron las cantidades relativas de DNA del material que se había desarrollado. Aplicando esta técnica se determinó que:

- 27 plantas tenían la estructura intermedia esperada entre ajo y puerro,
- 14 plantas habían escapado (estructura FCM de ajo),
- 2 plantas ponían de manifiesto una estructura desviada.

30 De todas las plantas se determinó un citoplasma del tipo del del ajo CMS. Para este fin se utilizaron los cebadores que siguen:

p12351: 5'-ACC AGA AGG ATT CGG ATT GA-3'
 p12352: 5'-TGA CAT AAG TCC CTC CCT ACA A-3'

Las condiciones para la PCR fueron:		Programa SA59:		
DNA	2 µl	Etapa		
Solución tampón 10 x	2,5 µl	1	94 °C	5 minutoss
MgCl ₂ 50 mM	1,2 µl	2	60 °C	1 minuto
NTP's	0,6 µl	3	72 °C	1 minuto
p12351 (5 pM)	1 µl P12351	4	94 °C	30 segundos
p12352 (5 pM)	1 µl P12352	5	59 °C	1 minuto
H ₂ O	16,6 µl	6	72 °C	1 minuto
Taq platino	0,1 µl	7	Ir a la etapa 4	29 veces
		8	72 °C	5 minutos
		9	20 °C	20 minutos

35 La amplificación de un fragmento por medio de estos cebadores produjo en el ajo y en el puerro, en ambos, un fragmento de 845 bp.

Después de someter a digestión este fragmento por la enzima de restricción Taq1, el ajo CMS proporcionó tres fragmentos de 60 bp, 160 bp, y 625 bp, respectivamente, mientras que el puerro proporcionó cuatro fragmentos de 50 bp, 60 bp, 110 bp y 625 bp, respectivamente.

La figura 2 expone la estructura de la banda del fragmento de restricción perteneciente a este experimento determinada por electroforesis en gel. La diferencia más distintiva entre la estructura del ajo y la del puerro son los fragmentos de 110 bp y de 160 bp. Este fragmento de 110 bp está presente en la estructura del puerro y está ausente en la estructura del ajo CMS. Al revés, el fragmento de 160 bp está presente en la estructura del ajo CMS al tiempo que está ausente en la estructura del puerro. Con ayuda de la presencia del fragmento de 160 bp y la ausencia del fragmento de 110 bp, pudo determinarse el correspondiente citoplasma de los híbridos de ajo CMS-puerro en las calles 4 – 9 con respecto al citoplasma del ajo CMS.

El cruzamiento descrito entre ajo ($2n = 2x = 16$) y puerro ($2n = 4x = 32$) dio como resultado plantas que son triploides en cierto modo ($2n = 3x = 24$); tales plantas son, prácticamente siempre, plantas masculinas y femeninas estériles debido a los fallos de meiosis. Con objeto de comprobar que existe androesterilidad, una parte de las plantas que se desarrollaron fue desarrollada posteriormente a una planta $4n (= 6x = 48)$.

En este campo de estudio se emplea una técnica común de duplicación cromosómica por medio de un tratamiento con colchicina. Para ello, se colocaron meristemos durante 3-6 días en un medio de conservación, B5, a base de colchicina (completado con colchicina, 35 mg/litro) Después tuvo lugar un crecimiento posterior hasta una planta completa en un medio B5 sin aditivos.

La inflorescencia de esas plantas fue estudiada en la segunda estación.

Como conclusión, después de un examen visual, así como también el examen realizado mediante técnicas de coloración del polen y de germinación del polen, se determinó que todos los productos de cruzamiento que se habían producido eran androestériles. Incluso las plantas $4n (= 6x = 48)$ antes citadas pusieron de manifiesto que eran incapaces de autopolinización.

Con ello se ha verificado la transferencia al puerro del citoplasma de CMS desarrollado en el ajo después de tratamiento hormonal, con mantenimiento de funcionalidad.

Por medio de un cruzamiento posterior con puerro se puso de manifiesto que era posible obtener una progenie de cada una de las seis líneas CMS del ajo; para ello, una vez más, se empleó el método de germinación *in vitro* antes descrito.

Se llevaron a cabo medidas por citometría de flujo en estos productos de cruzamiento; sin embargo, como resultado del aumento de hibridación de los genomas, los picos del citograma se mueven unos a otros. Por ello, esta técnica de citometría de flujo no es distintiva después de varios cruzamientos. Debido a esta razón se prefirió para realizar una división global de la progenie en grupos.

En este caso se usó la siguiente división;

- Grupo 1: citograma de flujo esperado con una estructura BC 1 (retrocruzamiento 1).
- Grupo 2: citograma de flujo medido después de duplicación de material nuclear;
- Grupo 3: estructura FCM de la planta parental (en la que se propaga tejido madre en lugar de embriones aislados pasados de edad);
- Grupo 4: estructuras FCM desviadas.

En el primer grupo de "estructura BC 1 esperada", se puso de manifiesto que era posible un nuevo cruzamiento con puerro (BC2 = retrocruzamiento 2), aunque con la diferencia de que la maduración de la semilla tuvo lugar en la planta. Esto constituye una etapa importante hacia adelante para el desarrollo del producto debido a que la germinación *in vitro* bloquea el uso comercial de la invención en la aplicación práctica del cultivo con semillas.

Este cruzamiento "natural" con el puerro se estableció con la presente invención ya en la fase BC2.. Sin embargo, en algunos casos este cruzamiento se estableció en las generaciones BC3, BC4 o incluso en generaciones posteriores.

Ejemplo 3

Adicionalmente, se llegó a la conclusión de que era posible desarrollar una planta $4n (6x)$ directamente desde el conjunto de plantas entre ajo y puerro germinadas *in vitro*, F1, que se habían desarrollado, contrario a las plantas "3x" anteriormente citadas. Sorprendentemente, ocurrió una duplicación espontánea de los cromosomas en la célula huevo del ajo, que produjo un gameto $2n..$. Este hecho dio por resultado una progenie tetraploide después de cruzamiento con puerro ($2n$ polen).

El aspecto de gametos sin reducir está descrito en la bibliografía científica (Ramsey y Schemske).

El trabajo de Peterka et al. ha descrito que un gameto sin reducir de cebolla, ocasiona esto mismo, en el caso de un cruzamiento obtenido entre puerro y cebolla.

Esta planta $4n$ fue identificada mediante citometría de flujo y es compatible con el puerro.

- 5 Como resultado de ello, el establecimiento de semillas tuvo lugar espontáneamente, las que mediante germinación *in vitro* pudieron arraigar originando plantas maduras. La germinación tuvo lugar a 15°C por oscuridad.

Ejemplo 4

- 10 La cuarta posibilidad comprende el cruzamiento con puerro, a través de la etapa intermedia de obtención de un ajo tetraploide. Con esto la compilación genética de ambas especies de plantas es tetraploide en ambas, lo que acelera la fusión de los gametos proporcionando una combinación viable.

Sin embargo, el desarrollo de líneas de ajo CMS seguido por las técnicas antes citadas permanece, todavía, necesario.

REIVINDICACIONES

- 1.- Planta de puerro (*Allium ampeloprasum*) androestéril citoplasmática (CMS) que comprende androesterilidad citoplasmática codificada que trae su origen de una planta de ajo (*Allium sativum L.*) con número de depósito NCIMB 41563, en donde dicha planta de puerro comprende mitocondrias de dicha planta de ajo (*Allium sativum L.*) con número de depósito NCIMB 41563, que codifican dicha androesterilidad citoplasmática, y en donde dichas mitocondrias están indicadas por la presencia de una banda de 160 bp y la ausencia de una banda de 110 bp cuando se somete un fragmento de amplificación del cebador p12351, 5'-ACC AGA AGG ATT CGG ATT GA-3' y p12352, 5'-TGA CAT AAG TCC CTC CCT ACA A-3', de 845 bp, a digestión de restricción por Taq1.
- 2.- Planta de puerro (*Allium ampeloprasum*) androestéril citoplasmática (CMS) según la reivindicación 1, en donde dicha androesterilidad citoplasmática codificada es androesterilidad mitocondrial codificada.
- 3.- Semillas, partes de plantas maduras, o partes de plantas o células embrionicas, de una planta de puerro (*Allium ampeloprasum*) androestéril citoplasmática (CMS) según la reivindicación 1 ó 2, que comprende androesterilidad citoplasmática codificada que trae su origen de una planta de ajo (*Allium sativum L.*) con número de depósito NCIMB, en donde dichas semillas, partes de plantas maduras, o partes de plantas o células embrionicas, comprenden mitocondrias de dicha planta de ajo (*Allium sativum L.*) con número de depósito NCIMB 41563, que codifican dicha androesterilidad citoplasmática, y en donde dichas mitocondrias están indicadas por la presencia de una banda de 160 bp y la ausencia de una banda de 110 bp cuando se somete un fragmento de amplificación del cebador p12351, 5'- ACC AGA AGG ATT CGG ATT GA-3' y p12352, 5'- TGA CAT AAG TCC CTC CCT ACA A-3', de 845 bp, a digestión de restricción por Taq1.

Figura 1: Inflorescencia de ajo CMS (A), ajo androfértil (B) y una planta CMS con un genoma nuclear derivado de puerro (C).

A

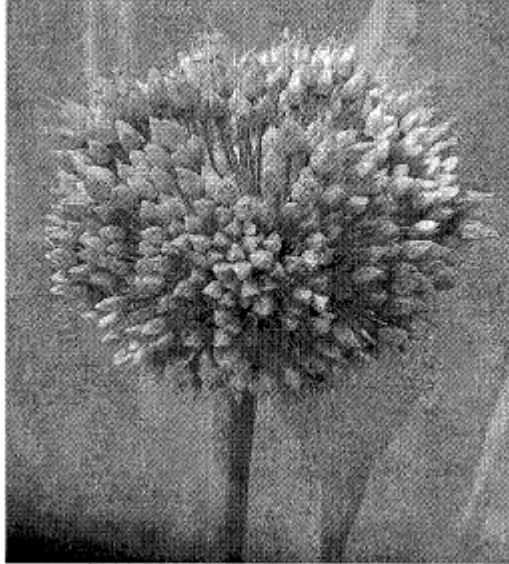


Figura 1 (continuación)

B

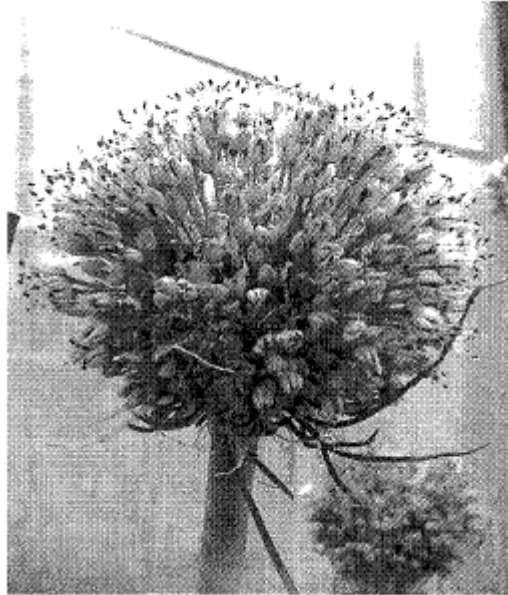
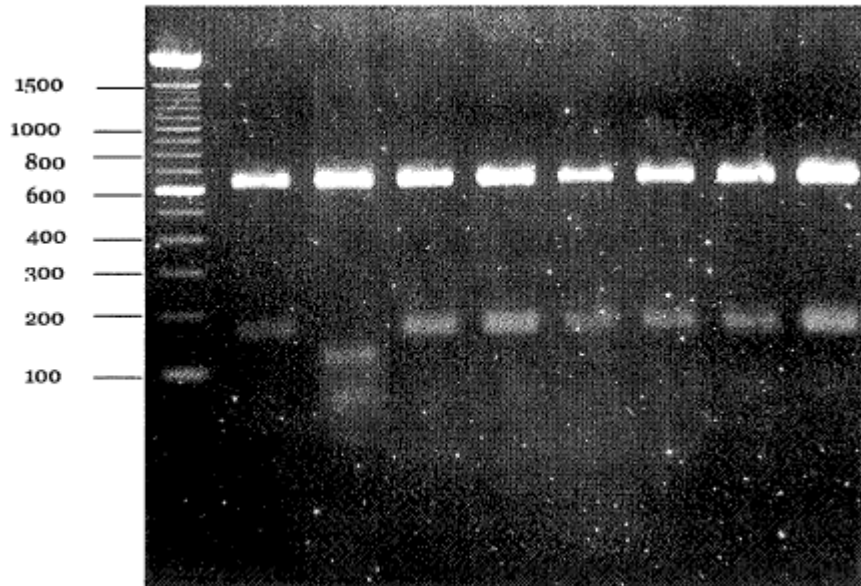


Figura 1 (continuación)

c



Figura 2: Estructura de un fragmento de restricción obtenido mediante el experimento de PCR-digestión del ejemplo 2.



Leyenda: calle 1: escala de 100 bp (1500 bp - 100 bp)

calle 2: ajo CMS

calle 3: puerro fértil

calle 4 – calle 9: cíbridos de ajo CMS – puerro

4: J18319 (F1 de G18110 según se cita en el ejemplo 2)

5: J18320 (F1 de G18132 según se cita en el ejemplo 2)

6: J18332 (F1 de G18133 según se cita en el ejemplo 2)

7: J18323 (F1 de G18135 según se cita en el ejemplo 2)

8: J18335 (F1 de G18166 según se cita en el ejemplo 2)

9: J18338 (F1 de G18161 según se cita en el ejemplo 2)