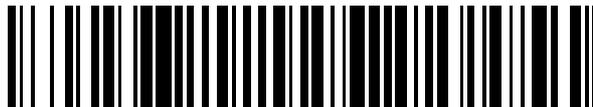


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 422 215**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/82** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.03.2006 E 06723274 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2013 EP 1853710**

54 Título: **Reproducción casi inversa**

30 Prioridad:

**03.03.2005 EP 05075519**  
**05.01.2006 EP 06075024**

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

**09.09.2013**

73 Titular/es:

**RIJK ZWAAN ZAADTEELT EN ZAADHANDEL B.V.**  
**(100.0%)**  
**BURGEMEESTER CREZEELAAN 40**  
**2678 KX DE LIER, NL**

72 Inventor/es:

**VAN DUN, CORNELIS, MARIA, PETRUS y**  
**DIRKS, ROBERT, HELENE, GHISLAIN**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 422 215 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

Reproducción casi inversa

5 La presente invención se refiere a un método para producir un organismo no humano homocigoto a partir de un organismo no humano heterocigoto, el cual puede ser cruzado con un organismo homocigoto para obtener un híbrido. La invención se refiere en particular a las plantas.

La mejora vegetal es una de las ocupaciones fundamentales de la humanidad que es de importancia esencial para proporcionar especies domesticadas que alimentan al mundo. La mejora vegetal es consecuentemente antigua y se basó originalmente en la selección y propagación de las plantas que destacaban en los campos de selección locales.

10 La mejora vegetal moderna depende altamente del conocimiento de la genética y con el apoyo tecnológico de métodos tales como doble haploides (DH) (véase *fi.* Haploids in Crop Improvement II eds; Palmer C, Keller W, and Kasha K (2005) in: Biotechnology in Agriculture and Forestry 56 Eds; Nagata T, Lörz H, and Widholm J. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, ISBN 3-500-22224-3) y los marcadores moleculares (véase *fi.* De Vienne ed. (2003) Molecular Markers in Plant Genetics and Biotechnology. Science publishers Inc. Enfield, NH USA. ISBN 1-57808-239-0).

15 Los mecanismos genéticos durante la reproducción sexual han evolucionado para aumentar la variabilidad genética que aumenta las posibilidades de supervivencia de una especie en un entorno cambiante. La recombinación meiótica, la distribución al azar de cromosomas y el sistema de apareamiento son los principales factores que contribuyen en este aspecto. Sin embargo, en la mejora vegetal estos mecanismos pueden actuar de forma contraproducente, sobre todo en aquellos casos en que plantas genéticamente heterocigóticas se han relacionado con un alto valor agronómico u horticultural. La redistribución de los factores genéticos da como resultado la producción de plantas genéticamente diferentes y por lo tanto plantas heterogéneas y por consecuencia la pérdida de las características comercialmente deseables.

20 Con el fin de contrarrestar este efecto, están disponibles varias tecnologías para el mejorador vegetal. Una posibilidad es propagar plantas vegetativamente lo que conduce a una conservación completa de su composición genética ya que la multiplicación se produce exclusivamente a través de la mitosis. Para muchas especies de plantas, el cultivo de tejidos *in vitro* se utiliza para propagar las plantas vegetativamente aunque también se pueden aplicar otros métodos como la producción de esquejes *in vivo*.

25 Una desventaja de la propagación vegetativa cuando se compara con la propagación a través de semillas es el hecho de que es un trabajo intensivo y por lo tanto costoso. Además, es difícil almacenar las plantas durante períodos más largos de tiempo que plantean problemas logísticos y los riesgos de infecciones del material vegetal con agentes patógenos, como los virus, son considerablemente mayores en comparación con una situación en la cual el material vegetal se propaga a través de semillas.

30 Como alternativa, la propagación vegetativa se puede lograr a través de la formación de semillas asexuales, que se conoce generalmente como la apomixis. La apomixis que se produce de forma natural en un número de especies se puede inducir en especies de plantas de propagación sexual por ingeniería genética. Actualmente, sin embargo, los genes responsables de las diferentes etapas de la apomixis i. e. la apomeiosis, la partenogénesis y el desarrollo autónomo del endospermo todavía no se han identificado y pueden interactuar de forma complicada. Por lo tanto, aunque el potencial de la tecnología de apomixis para la mejora vegetal está ampliamente reconocido desde hace ya un largo período de tiempo, el concepto aun no ha sido demostrado.

35 Como otra alternativa, puede hacerse uso de la tecnología de reproducción inversa como se describe en el documento WO-03017753. La reproducción inversa se basa en la supresión de la recombinación meiótica a través de la ingeniería genética y la posterior producción de plantas doble haploides (DH) derivadas de las esporas que contienen cromosomas paternos sin recombinar. Estos DH difieren con respecto a su composición genética exclusivamente como consecuencia de la distribución al azar de los cromosomas parentales que ocurre durante la meiosis. Por lo tanto, es suficiente con hacer uso de un marcador polimórfico co-dominante por cromosoma para determinar cuál de los DH o de las líneas derivadas de los mismos se deben combinar a través de cruzamiento para reconstruir la composición genética de la planta de partida original. Como tal, la aplicación de la tecnología de reproducción inversa permite la conservación genética de cualquier planta fértil seleccionada a través de semillas incluso si su composición genética es desconocida.

40 Sin embargo, una desventaja de esta tecnología es el hecho de que la supresión completa de la recombinación meiótica tiene como resultado la ausencia de quiasmas y por tanto de una inadecuada segregación de los cromosomas durante la meiosis I que podría llevar a la aneuploidía de los gametos y por lo tanto reduce la viabilidad. Cuando no se forman quiasmas durante la meiosis I, cada cromosoma independientemente tiene un 50% de probabilidad de desplazarse a cualquiera de los polos. Esto significa que la probabilidad teórica de hacer una espora con un juego cromosómico completo es  $(\frac{1}{2})^x$  donde x representa el número haploide de cromosomas. La frecuencia de gametos equilibrados por lo tanto disminuye al aumentar el número haploide de cromosomas.

5 Aunque muchas especies de cultivos tienen un número relativamente bajo de cromosomas (p. ej. el pepino tiene 7 cromosomas por genoma haploide y la espinaca tiene sólo 6) también hay especies de importancia económica con un número relativamente alto de cromosomas como el tomate, uno de los mayores cultivos vegetales, que tiene 12 cromosomas por genoma haploide. Esta restricción técnica reduce significativamente la eficiencia de la tecnología de reproducción inversa. Por lo tanto, existe una clara necesidad en la técnica de métodos alternativos que permitan la conservación de la composición genética en la descendencia sexual.

Por tanto, el objeto de la presente invención es proporcionar un método para conservar la composición genética de un organismo progenitor, en particular, una planta progenitora.

10 En la investigación que condujo a la presente invención, se encontró sorprendentemente que mediante el uso de las plantas regeneradas a partir de esporas no reducidas, por ejemplo como las que se pueden obtener como resultado de una restitución de la segunda división (SDR), denominadas "células SDR-O", es posible proporcionar este método. Este método también se puede realizar en otros organismos no humanos además de en las plantas, tales como hongos o peces, y con otras células reproductoras, tales como gametos.

15 La invención por tanto se refiere a un método para producir una planta homocigótica a partir de una planta heterocigótica, que comprende:

a) someter las plantas heterocigóticas a estrés ambiental, en donde el estrés ambiental se selecciona de entre estrés de temperatura, NO<sub>2</sub>, óxido nitroso N<sub>2</sub>O, o combinaciones de éstos, o modificar genéticamente la planta heterocigótica con una construcción genética que permita la intervención con las funciones génicas involucradas en la segunda división de la meiosis, para producir un número de esporas SDR-O superior al promedio;

20 b) regenerar plantas SDR-O a partir de esporas SDR-O; y

c) producir la planta homocigótica a partir de las plantas SDR-O así obtenidos.

Este método se denominará en este documento "Reproducción Casi Inversa".

25 Las esporas no reducidas se forman preferentemente como consecuencia de la omisión de la segunda división meiótica. Este fenómeno natural se conoce como restitución de la segunda división o SDR. La SDR puede ocurrir durante la reproducción sexual en las plantas de forma simultánea a eventos meióticos regulares. La tecnología de Reproducción Casi Inversa de la invención utiliza eventos SDR seleccionando específicamente esporas no reducidas que se producen a través de SDR natural o artificial para la regeneración. También se describe que las plantas resultantes, denominadas plantas SDR-O, que son en gran medida homocigóticas, se utilizan para producir DH. Sin embargo, el nivel de homocigosidad en las plantas SDR-O también se puede aumentar a través de la endogamia o de eventos SDR secundarios o de combinaciones de los mismos.

30 Se pueden utilizar marcadores moleculares que son polimórficos entre los genomas paternos y maternos de la planta de partida para identificar aquellas plantas SDR-O y DH derivados de los mismos que son esencialmente complementarios con respecto a su composición genética y cuyo cruzamiento tiene como resultado una reconstrucción casi completa de la composición genética de la planta de partida original.

35 La reconstrucción es "casi completa" como consecuencia de la recombinación meiótica durante la formación de los eventos SDR-O y durante la formación de los DH derivados de los mismos. Los híbridos reconstruidos en cierta medida se diferenciarán genéticamente entre sí, así como de la planta híbrida de partida original. Sin embargo, esta variación se reduce considerablemente en comparación con una situación en la cual los DH se derivan directamente de un evento meiótico regular. Además, los DH están fijados genéticamente lo que significa que no hay margen para una mayor selección.

40 La ventaja de la integración de un evento RDS en este proceso es que la selección de complementariedad genética se produce en un proceso de dos etapas. La primera etapa se concentra en las regiones proximales de los cromosomas i. e. incluyendo los centrómeros. La segunda etapa se dirige hacia los extremos distales de los cromosomas i. e. aquellas regiones que fueron intercambiados debido a la recombinación. Esta fijación genética desfasada reduce la complejidad y aumenta las posibilidades de encontrar genotipos en gran medida complementarios, especialmente cuando hay marcadores moleculares disponibles para la selección.

Una ventaja adicional de esta estrategia es el hecho de que la SDR es un proceso natural que se produce durante la reproducción sexual y que pueden ser utilizada como tal sin más necesidad de interferir en los procesos de reproducción sexual.

50 Las **Figuras 1 y 2** ilustran esquemáticamente la diferencia entre un evento meiótico normal (seguido de la formación de DH) y un evento SDR. En ambas figuras se han representado cuatro pares de cromosomas y sus homólogos se muestran en estructuras en forma de barras de color claro y oscuro respectivamente, en las que los círculos negros en las barras representan los centrómeros. Las figuras sirven meramente para ilustrar el principio de esta invención. Es obvio para los expertos en la técnica que en la práctica el número de pares de cromosomas implicados depende

de las especies involucradas. Además, los puntos de sobrecruzamiento son variables con respecto a su número / cromosoma y su posición en el cromosoma.

La **Figura 1** representa una meiosis normal y la duplicación (que puede ser espontánea o inducida) de los cromosomas después de que las dos divisiones meióticas se llevaran a cabo. En este caso, el sobrecruzamiento ha dado lugar a la aparición de dos cromosomas progenitores y dos recombinantes por pareja. Además, debido a la distribución independiente de los dos cromosomas homólogos de cada par, es obvio que pueden formarse muchas esporas / gametos genéticamente diferentes.

En la **Figura 1**, sólo se han representado tres resultados arbitrarios de este proceso. Después de regenerar plantas a partir de dichas esporas, se pueden obtener DH. La producción de DH es de suma importancia en la mejora vegetal moderna y se aplica como una tecnología establecida para la mayoría de cultivos. Las plantas regeneradas a partir de esporas diploides se nombrarán más adelante DH-O i. e. doble haploides como regenerante primario de una espора diploidizada de forma espontánea o inducida procedente de un evento meiótico normal. El término "SDR-O" se utiliza para el regenerante primario de la célula o espора que carecía de la segunda división meiótica. Cuando se auto-polinicen plantas DH-O se dará origen a plantas descendientes (DH-1) que son genéticamente idénticas al 100% y completamente fijas en todos los alelos. Por lo tanto, aunque las esporas (gametos) que se forman en las plantas DH-O experimentasen de nuevo la meiosis y la recombinación, no tendrían lugar redistribuciones genéticas. Por tanto, esto significa que la llamada "línea pura" se inmortaliza por el hecho de que no puede darse segregación. No obstante, dicha línea puede mostrar fenotípicamente apariencia diferente cuando se cultiva en diferentes condiciones, como temperaturas bajas o altas, o por ejemplo, en diferentes zonas climáticas. Las diferencias que se pueden observar son, sin embargo válidas para todos los "miembros" de la línea en otras palabras, no habrá variación "intra-línea". Puede haber, sin embargo, diferencias entre las distintas líneas puras (DH-1), que se denomina variación "inter-línea".

La **Figura 2** representa un evento RSG. En contraste con la **Figura 1**, donde una duplicación cromosómica espontánea o inducida se llevó a cabo después de la finalización de la meiosis, la aparición de esporas diploides se causa por la ausencia de la segunda división meiótica.

La diferencia fundamental entre los DH y las plantas SDR diploides se ilustra por el hecho de que hay segmentos heterocigóticos presentes en los diferentes cromosomas en la planta SDR, mientras que los DH son completamente homocigóticos. Además, debe tenerse en cuenta que en las plantas SDR todos los pares de cromosomas son homocigóticos con respecto a sus regiones centroméricas. Si la heterocigosidad está presente, reside en los extremos cromosómicos distales. Esto contrasta con otra aberración meiótica llamada Restitución de la Primera División o FDR, que se caracteriza por la ausencia de la primera división meiótica y que da como resultado la heterocigosidad en las regiones centroméricas de todos los pares de cromosomas.

En el caso teórico mostrado en la **Figura 2**, la planta de partida (planta-donante) que se utilizó para generar DH y SDR, respectivamente, contiene cromosomas homólogos que son completamente heterocigotos. Esto significa que todos los alelos de los genes contenidos en estos cromosomas son polimórficos. En la práctica, sin embargo, esto es muy poco probable, por lo que este caso es un ejemplo de la situación heterocigótica más extrema.

En la **Figura 2** también está claro que para un evento SDR los puntos de sobrecruzamiento de cada par de cromosomas determinan la proporción entre los loci homocigóticos y los loci heterocigóticos. Esta proporción aumenta para aquellos eventos SDR que en promedio tienen su lugar de sobrecruzamiento situado más hacia el telómero mientras que disminuye cuando en promedio el lugar de sobrecruzamiento se encuentra más hacia el centrómero. Con la disponibilidad de marcadores moleculares suficientes estos puntos de sobrecruzamiento se pueden determinar fácilmente para cada evento SDR.

El grado de sobrecruzamiento para cada brazo cromosómico está limitado por la posición del centrómero. Además, se debe señalar que, en caso de que la heterocigosidad residual sea relativamente baja los eventos SDR se asemejan a los sucesos RIL y BIL pero en formas heterocigóticas.

La SDR es sólo una forma dentro de una más amplia clase de los fenómenos que conducen a la formación de esporas / gametos no reducidos (Veilleux, Plant Breeding Reviews 3, 253-288 (1985)) describe los mecanismos por los cuales se forman los gametos no reducidos y proporciona una lista de la aparición de gametos no reducidos en las plantas de cultivos. En ese momento se reconocieron concretamente principalmente dos clases diferentes de gametos no reducidos SDR y FDR. Recientemente, se ha publicado una tercera clase de gametos no reducidos llamada Restitución Meiótica Indeterminada o IMR (Lim et al. (2001) Theor. Appl. Genet. 103:219-230).

Para el propósito de esta invención sólo es relevante la SDR. La SDR ocurre de forma natural en una amplia variedad de cultivos como demuestra la lista presentada por Veilleux, *supra*, y otra investigación independiente (Lim K et al. (2004) Breeding Science 54: 13-18). Curiosamente, se encontró que la frecuencia de gametos SDR 2n (polen) en pimientos aumentó desde menos de 1% a un máximo de 10,5% (promedio) por exponer las plantas a 11°C durante 48 horas (Zhang X et al. (2002) Journal of Horticultural Science & Biotechnology 78: (1) 84 a 88). La frecuencia máxima de aparición de SDR medida fue del 81,3%. Por lo tanto, es posible aumentar el número de casos de SDR por estímulos externos.

La aparición de esporas o gametos  $2n$  no se limita al gametofito masculino si no que también hay evidencia de que se produce en el nivel del gametofito femenino. Por ejemplo Zagorcheva L (Genetics and Plant Breeding 9 (5), 386-399 (1976)) informó de la aparición de desviaciones de macrosporogénesis y macrogametogénesis en pepino.

5 La Reproducción Casi Inversa utiliza la aparición de esporas no reducidas que son el resultado de SDR con el fin de reconstruir en gran medida la composición genética del material vegetal heterocigótico de partida. Básicamente, con el fin de reconstruir la planta híbrida original se comienzan a seleccionar aquellas plantas SDR-O que son complementarias en la región centromérica de cada cromosoma. Esto se puede lograr con el genotipado de la región centromérica de cada cromosoma utilizando marcadores moleculares polimórficos. Como los regenerantes SDR-O son homocigotos en la región centromérica de cada cromosoma, las plantas totalmente (o parcialmente) complementarias se pueden identificar fácilmente de esta manera. La probabilidad de encontrar una planta SDR-O complementaria (sobre la base de la complementariedad de los centrómeros, y sin tener en cuenta la heterocigosidad residual) cuando se ha seleccionado al azar 1 planta SDR-O es  $(1/2)^x$  donde  $x$  es el número de cromosomas.

15 En el caso de que las líneas parentales originales tengan que ser reconstituidas, la probabilidad de encontrar uno de los progenitores es  $(1/2)^{x-1}$  y para el otro progenitor la probabilidad es  $(1/2)^x$ . Como se dijo anteriormente, tales líneas "casi progenitoras" también pueden ser consideradas como "Back-crossed Inbred Lines" (BIL) en que los segmentos de introgresión son generados por ambos progenitores. Estas plantas complementarias posteriormente se pueden cruzar con el fin de reconstruir el genotipo de la planta híbrida original.

20 Sin embargo, puesto que, debido a la recombinación meiótica, las regiones distales de los brazos de los cromosomas de las plantas SDR-O serán heterocigóticos (en el caso de un solo sobrecruzamiento por brazo cromosómico) se producirá segregación en el híbrido reconstruido que puede conducir a un cierto nivel de no uniformidad. Cuando la información genética que se encuentra en las regiones distales de los casos SDR-O complementarios no contribuye de manera significativa a la variación fenotípica debido a que la recombinación se ha producido en posiciones cromosómicas relativamente distantes y por lo tanto el contenido de genes es bajo o porque la variación alélica no contribuye significativamente a la variación fenotípica, el híbrido reconstruido será relativamente uniforme.

También se describe que se generan SDR-O en las que la recombinación meiótica se produjo exclusivamente en las regiones teloméricas de los extremos de los cromosomas. En tales casos los cromosomas se han recombinado físicamente pero no genéticamente.

30 Con el fin de obtener plantas híbridas genéticamente reconstruidas totalmente homogéneas, los DH se producen a partir de cada uno de las SDR-O complementarias. Este principio que se ilustra esquemáticamente en la **Figura 3** muestra la formación de esporas/gametos que se producirían para la planta que se regenera a partir de la SDR-O 3 de la **Figura 2**.

35 Las esporas que se forman se pueden regenerar y tras la duplicación cromosómica se pueden producir DH. Mediante el uso de marcadores moleculares se puede seleccionar aquellos DH que sean genéticamente muy similares a cualquiera de las líneas progenitoras. Esto se ilustra en la **Figura 4** con el conjunto cromosómico que se ha duplicado.

40 Debido a la segregación, los extremos distales de los cromosomas (desde el punto de ruptura de la recombinación hasta el telómero) de estas plantas doble haploides contienen en promedio un 50% de la información genética de cada progenitor. Cuando dos plantas doble haploides derivadas de SDR-O complementarias elegidas al azar se combinan a través de cruzamiento, las regiones proximales del brazo serán un 100% heterocigóticas mientras que las regiones distales del brazo será un 50% heterocigóticas en la planta híbrida reconstruida. Como se supone que las SDR-O en promedio son un 60% homocigóticas (Carputo, D. et al. (2003) Genetics 163, 287-294), la reconstrucción con eventos complementarios dará como resultado un promedio de heterocigosidad del 80% ( $100\% \times 60\% + 50\% \times 40\%$ ) y homocigosidad del 20%. La homocigosidad entre los puntos de sobrecruzamiento proximal y distal estará sesgada hacia el genotipo de la regenerante SDR-O que era homocigótica para esta región, mientras que distal al punto de sobrecruzamiento distal, la homocigosidad será igual para ambos genotipos progenitores.

50 Está claro para un experto en la técnica que las cifras mencionadas en relación a los porcentajes de heterocigosidad representan valores extremos i. e. partiendo de una planta que es 100% heterocigótica lo que significa que todos los alelos de los genes contenidos en los cromosomas son polimórficos. En la práctica esto es muy poco probable, y por lo tanto los porcentajes de heterocigosidad en promedio serán más bajos.

55 También se describe un método para producir un híbrido, que comprende cruzar un primer organismo homocigótico que se produce según la invención con un segundo organismo homocigótico. Según la invención, es posible reconstruir la composición genética del híbrido original mientras que, además, se pueden obtener variantes que se aproximan a la composición genética de los híbridos originales.

También se describe que el segundo organismo homocigótico es al menos parcialmente complementario al primer organismo homocigótico de tal manera que el híbrido resultante se asemeja al organismo heterocigótico de partida.

5 Adecuadamente, la semejanza con el organismo heterocigótico de partida supone que el híbrido tenga al menos el 50% de la heterocigosidad del organismo de partida. Preferiblemente, la semejanza en heterocigosidad es cualquier porcentaje entre 50 y 100%, más específicamente la semejanza en heterocigosidad es cualquier porcentaje entre 50% y 60%, preferiblemente entre 60% y 70%, más preferiblemente entre 70% y 80%, aún más preferiblemente entre 80% y 90% y más preferiblemente entre 90% y 100%. La frase "cualquier porcentaje" tiene la intención de abarcar todos y cada uno de los porcentajes dentro del rango establecido, aunque el porcentaje en cuestión no figure explícitamente.

10 Alternativamente, se selecciona el segundo organismo homocigótico de tal manera que el híbrido resultante supere al organismo heterocigótico de partida original. El "organismo heterocigótico de partida original" es el organismo que se utiliza en la etapa a) de la reivindicación 1.

La variación del nivel relativo de homocigosidad así como su origen parental en la planta híbrida reconstruida depende del punto de sobrecruzamiento dentro de cada brazo cromosómico de cada progenitor. Mediante el uso de marcadores moleculares se puede seleccionar ambas SDR-O, así como los DH derivados de los mismos que tras la hibridación producen híbridos F1 con niveles relativamente bajos de homocigosidad.

15 También se describe que para los eventos SDR-O se deben seleccionar aquellos que tengan en promedio sobrecruzamientos mas distales mientras que para los DH se deben seleccionar aquellos que sean más complementarios.

20 Por otro lado, sin embargo, puede ser deseable seleccionar aquellos casos que tienen una distancia relativamente grande entre los puntos de sobrecruzamiento proximal y distal para introducir homocigosidad en el híbrido F1 que puede estar sesgada hacia cualquiera de los progenitores.

De lo anterior es evidente que la Reproducción Casi Inversa permite a un mejorador vegetal reconstruir en gran medida una planta híbrida pero que la variación significativa debida a los diferentes niveles y origen de los alelos que son homocigóticos también se puede obtener entre los híbridos experimentales F1 que puede dar como resultado en la mejora del rendimiento de la planta híbrida (de partida) original.

25 Además, es posible producir híbridos que son complementarios sólo para un subconjunto dado de cromosomas. Esto se puede hacer mediante la selección de aquellas SDR-O que en la base de su genotipo centromérico son complementarias para los pares cromosómicos deseados e idénticas para los otros. Tales híbridos producidos a partir de las llamadas líneas de casi-sustitución serán en gran parte homocigóticos para pares cromosómicos no complementarios con niveles similares de heterocigosidad en las regiones distales de los cromosomas en comparación con los pares cromosómicos complementarios. En su forma más extrema, los doble haploides completamente no complementarios se pueden cruzar lo que conduce a plantas híbridas con heterocigosidad limitada a las partes distales de los cromosomas.

Con el fin de utilizar la tecnología de SDR para la Reproducción Casi Inversa se puede hacer uso de la aparición espontánea de SDR o se pueden inducir SDR p. ej. por ingeniería genética.

35 También se describe el retrocruzamiento. El retrocruzamiento es un término de la mejora vegetal que es bien conocido por los expertos en la técnica y que se refiere a un procedimiento en el que se produce la introgresión de un rasgo específico en una línea vegetal con una composición genética deseada (el llamado fondo genético). El resultado deseado de este procedimiento es una línea vegetal que es genéticamente casi idéntica a la línea vegetal de partida, pero a la cual se le añaden a través de la recombinación sólo los factores genéticos que subyacen a la característica deseada. Con el fin de lograr este objetivo las plantas que llevan el fondo genético deseado y el rasgo deseado se cruzan y de la descendencia se seleccionan las plantas que presenten el rasgo, así como, lo más posible del fondo genético. Puesto que con cada ciclo de retrocruzamiento el incremento del fondo genético deseado se reduce en promedio a la mitad, en la práctica se tardan de 4 a 5 ciclos de reproducción para completar el procedimiento de retrocruzamiento.

45 La Reproducción Casi Inversa permite agilizar el retrocruzamiento ya que el procedimiento para llegar a la homocigosidad requiere sólo dos etapas. La primer etapa es idéntica a un procedimiento de retrocruzamiento tradicional i. e. el cruzamiento de las plantas que llevan el fondo genético deseado y el rasgo deseado. El híbrido resultante se utiliza para generar SDR-O que se seleccionan para el rasgo deseado, el cual puede estar basado en el fenotipo o marcador asistido y el fondo genético deseado basado en marcadores centroméricos específicos para el fondo genético.

50 La segunda etapa consiste en la producción de DH seleccionando los que tengan la cantidad máxima de fondo genético utilizando marcadores moleculares. La reproducción casi inversa fija el procedimiento para llegar a homocigosidad pero permite dos etapas de selección. Cuando se dispone de suficientes marcadores genéticos el producto de retrocruzamiento deseado puede obtenerse de forma mucho más eficiente en comparación con el procedimiento tradicional ya que el número de ciclos de reproducción y el tiempo requerido se puede reducir significativamente.

- 5 Con el método de reproducción casi inversa de la invención se puede realizar la introgresión de CMS en un fondo deseado de una manera muy eficiente. Con el fin de aplicar la reproducción casi inversa para la transferencia de CMS, la línea donante de CMS es preferiblemente genéticamente distinta de la línea que se tiene que convertir a la esterilidad masculina para un gran número de marcadores genéticos nucleares de manera que la diferencia entre los cromosomas de la CMS y los del donante fértil se puedan determinar más fácilmente.
- 10 Con el fin de convertir una línea pura o una línea endogámica deseada (homocigótica o casi homocigótica) en una línea similar, pero con un fondo de CMS, se realiza un primer cruzamiento mediante la polinización de dicho CMS con el polen de la línea deseada. La progenie F1 resultante contiene CMS y 50% de los cromosomas de la línea deseada. Las plantas de la progenie F1 son inducidas a realizar meiosis SDR durante la ginogénesis ya sea por tratamiento con productos químicos tales como el óxido nitroso o condiciones de estrés tales como temperatura baja. La SDR también puede ocurrir espontáneamente durante la ginogénesis.
- 15 En caso de que se aplique androgénesis, se debe hacer uso de un gen restaurador que pueda suprimir el efecto del citoplasma inductor de la esterilidad masculina.
- Las plantas SDR-O resultantes se analizan genéticamente utilizando marcadores de ADN que son polimórficos para las regiones centromérica del híbrido F1. Se seleccionan las plantas SDR-O que contienen exclusivamente las regiones centroméricas de la línea que se tiene que convertir en una CMS. En caso de que se disponga de un gran número de marcadores discriminantes que abarquen el genoma, se pueden seleccionar las SDR-O que en promedio tienen las posiciones de sobrecruzamiento más proximales en el cromosoma. Esto convierte en gran parte una línea seleccionada en una CMS en una sola etapa. Si es necesario, se puede reiterar este ciclo de retrocruzamiento.
- 20 La aparición espontánea de SDR puede ser aumentada por condiciones específicas de estrés abiótico tales como el calor o los choques en frío. Se sabe que tales condiciones de estrés aumentan la formación de esporas diploides no reducidas (X Zhang X et al., (2002) *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 78: (1) 84-88). Además, es posible inducir la formación de polen 2n mediante la aplicación de óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) gas (Okazaki, K. et al. (2005) *Euphytica*, 143, 101-114).
- 25 Cuando las esporas diploides se producen a través de la meiosis masculina también es posible enriquecer estas células por medio de citometría de flujo y clasificación de células activadas por fluorescencia. Tales tecnologías son en sí conocidas por un experto en la técnica y se han aplicado a microsporas en el pasado (Deslauriers C et al., (1991) *Flow cytometric characterisation and sorting of cultured Brassica napus microspores*. *Biochem. Biophys. Acta*: 1091, 165-172).
- 30 Además, se sabe que las esporas o polen diploides son más grandes en tamaño que sus iguales haploides (Lemmi G and Negri V. (1994) *Research on 2n pollen production in Lotus tenuis an I.M.G.V. of Perugia University*. *Lotus newsletter Vol; 25*, pp 24-27). Sorprendentemente, el mero hecho de que las esporas diploides son físicamente distintas de las esporas haploides hace que sea posible enriquecer específicamente las esporas diploides a través de citometría de flujo y clasificación de células activadas por fluorescencia.
- 35 Por otra parte, la optimización de las condiciones ambientales que conducen a la formación de esporas diploides se puede hacer fácilmente utilizando las diferentes tecnologías de clasificación.
- 40 La regeneración de las esporas no reducidas puede ocurrir a través de androgénesis, ginogénesis o partenogénesis por polinización de inyección de una manera similar a la regeneración de esporas reducidas. En caso de aplicar la partenogénesis por polinización inyección, puede ser ventajoso el uso de polen diploide, especialmente para aquellas especies que tienen una baja tolerancia a las modificaciones de la proporción de genomas materno a paterno en el endospermo. Para la mayoría, si no todos los cultivos estos protocolos de regeneración se describen en la bibliografía y son conocidos para un experto en la técnica.
- 45 Una vez que las plantas se regeneran a partir de esporas diploides, se pueden usar marcadores moleculares para determinar si las regiones centroméricas de los pares cromosómicos son homocigóticas o heterocigóticas lo cual es diagnóstico de SDR o FDR, respectivamente o no. De esta manera, las SDR se pueden seleccionar fácilmente.
- 50 Un experto en la técnica conoce diferentes enfoques genéticos que permiten interferir con las funciones de los genes que participan en la segunda división celular de la meiosis. Tal interferencia puede ser o bien a través de mutagénesis o transgénesis. Los enfoques transgénicos tienen por objeto la introducción permanente o transitoria de un fragmento de ADN que modifica la segunda división de la meiosis formando esporas diploides de tipo SDR. Esta modificación puede ocurrir a través de la interferencia con los factores genéticos implicados en los procesos meióticos especialmente aquellos involucrados en la segunda división celular. La interferencia se puede establecer a través de una determinada disminución de la expresión génica basada en el silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS). El PTGS se puede lograr a través de ARN interferente (ARNi) o el silenciamiento génico inducido por virus (VIGS).
- 55 Sin embargo, en otro enfoque, la interferencia se puede establecer a través de la sobreexpresión de proteínas que ejercen un efecto negativo dominante en la segunda división de la meiosis dando lugar a la SDR.

Independientemente del enfoque adoptado, el gen diana se tiene que conocer a nivel molecular. Se han descrito varios mutantes recesivos de la patata (pcpc, osos, fcfc) que dan como resultado una meiosis de tipo SDR (Carpato, D. et al (2003) Genetics 163, 287-294). También para el maíz la mutación elongate1 conduce a la ausencia de la meiosis II (Barell, PJ y Grossniklaus, U. (2005) Plant J. 43, 309-320).

Aunque los genes que han sido mutados en estos ejemplos concretos aún no se han identificado a nivel molecular el experto en la técnica será capaz de hacerlo y por lo tanto, estos y otros genes aún desconocido son candidatos excelentes para conseguir la SDR en las especies diana utilizando tecnologías de supresión molecular. La presente invención se refiere al principio general de reproducción casi inversa y el hecho de que no se hayan descrito todas las formas posibles de realizar la inducción de la SDR en un organismo de partida no es relevante para la invención.

Alternativas a los genes descritos anteriormente se pueden encontrar en genes como DUET (Venkata Reddy et al. (2003) Development 130, 5975-5987.) y CYC1 ; 2 (Wang et al. (2004) Plant Physiology 136, 4127-4135) que se han descrito para *Arabidopsis thaliana* y que, tras la mutación conduce a una forma aberrante de la meiosis.

Los productos meióticos diploides de estos mutantes son similares a la SDR y por lo tanto DUET y CYC1 ; 2 así como sus homólogos funcionales en otras especies vegetales son genes diana candidatos para lograr una meiosis de tipo SDR.

Sin embargo, otro gen diana candidato es TETRASPORE / STUD (Yang et al (2003) Plant J. 34, 229-240) que tras la eliminación conduce a la ausencia de la división celular después de la meiosis. Los regenerantes diploide de microsporas de un mutante tetraspore / stud pueden ser similares a SDR.

Una vez se han obtenido las plantas SDR-O pueden ser además descritas molecularmente. Inicialmente, se pueden determinar los haplotipos de las regiones centroméricas lo que proporciona conocimiento del nivel de complementariedad de los cromosomas homólogos entre las plantas SDR-O. Dependiendo de la aplicación se puede seleccionar plantas SDR-O total o parcialmente complementarias. Las plantas SDR-O posteriormente se pueden utilizar para generar mapas de haplotipos más densos. Esto se puede lograr usando tecnologías de tipificación molecular bien conocidas por un experto en la técnica. Ejemplos de ello son RFLP (Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (Beckmann, J.S. y Soller, M (1983) Theor. and Appl. Genet. 67, 35-43)), RAPD (Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico (Welsh, J. y McClelland, M. (1990) Nucleic Acids Res. 19, 961-866.)), AFLP (Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos Amplificados (Vos, P. et al (1995) Nucleic Acids Res. 23, 4.407-4.414.)) o SFP (Polimorfismo de un Solo Rasgo (Borovitz , J. et al (2003) Genome Research 13, 513-523)). Estas tecnologías pueden utilizarse sin el conocimiento previo de la naturaleza de los polimorfismos de ADN.

En el caso de que los polimorfismos de ADN se describan p. ej. como SNP se puede hacer uso de una gran cantidad de tecnologías de detección de SNP (Kwok, P.Y. y Chen, X (2003) Curr. Issues Mol. Biol. 5, 43-60). Se pueden usar los mapas de haplotipos para seleccionar las plantas para la producción de DH. Los DH obtenidos se pueden hacer haplotípicos para las regiones que eran heterocigóticas en la planta SDR-O de partida. Este análisis proporciona la información genética que se puede utilizar para dirigir la relación de heterocigosidad / homocigosidad en el híbrido F1 y proporciona la posibilidad de seleccionar cualquiera de los orígenes parentales de las regiones homocigóticas del genoma del híbrido F1.

La probabilidad de encontrar al menos una combinación complementaria de dos organismos homocigóticos (una combinación que después del cruzamiento pueda "resintetizar" el organismo de partida), es una función del número cromosómico haploide  $x$  de una especie dada y el número  $k$  de organismos homocigóticos producidos a partir de un organismo de partida heterocigótico en el cual ha tenido lugar la SDR.

Cuando el número cromosómico haploide de una especie de cultivo dada se expresa como  $x$ , el número máximo de genotipos SDR-O, teniendo en cuenta sólo las regiones cromosómicas próximas a los puntos de sobrecruzamiento y por tanto incluyendo la región centromérica, que se obtienen a partir de una planta de esa especie de cultivo es de  $2^x$ . La probabilidad de que un par de plantas SDR-O elegido al azar, o plantas DH derivadas de las mismas, de esta población, al cruzar, den como resultado un híbrido F1 que tiene un genotipo casi idéntico al genotipo que produjo las SDR-O (genotipo original) es  $(2^x-1)/2^x$ . En el caso en que se producen un total de plantas SDR-O, existen  $1/2k(k-1)$  combinaciones de 2 plantas SDR-O genéticamente distintas o plantas DH derivadas de las mismas que se pueden cruzar. La probabilidad de que cualquier combinación elegida al azar de 2 plantas SDR-O o plantas DH derivadas de las mismas sean complementarias es  $1/2^x$ . Por lo tanto, la probabilidad de que cualquier combinación elegida al azar de 2 plantas SDR-O o de DH de las mismas no sean complementarias es  $1-1/2^x = (2^x-1)/2^x$ . En el caso de  $k$  SDR-O o DH derivadas de las mismas, se pueden hacer  $1/2k(k-1)$  combinaciones y por lo tanto la probabilidad de que no haya plantas complementarias dentro de esta población SDR-O o de DH derivadas de la misma es  $((2^x-1)/2^x)^{1/2k(k-1)}$  y por lo tanto la probabilidad de que haya al menos una combinación complementaria de dos plantas SDR-O o DH derivadas de las mismas es  $1-((2^x-1)/2^x)^{1/2k(k-1)}$ . El resultado de este análisis se muestra en la tabla 1.

Tabla 1: La probabilidad de encontrar al menos una combinación de dos SDR-O o DH derivados de los mismos complementarias, utilizando tecnologías de reproducción casi inversa como una función del número de cromosomas haploide  $x$  y el número de plantas SDR-O producidas al azar disponibles  $k$ .

x/k	2	4	8	16	24	32	48	64	128	256
7	0.008	0.046	0.197	0.610	0.885	0.980	1.000	1.000	1.000	1.000
9	0.002	0.012	0.053	0.209	0.417	0.621	0.890	0.981	1.000	1.000
11	0.000	0.003	0.014	0.057	0.126	0.215	0.424	0.626	0.981	1.000
12	0.000	0.001	0.007	0.029	0.065	0.114	0.241	0.388	0.863	1.000

5 Este análisis demuestra que el genotipo original se puede resintetizar en gran parte como un híbrido F1 de acuerdo con la presente invención con una alta probabilidad usando 48 plantas SDR-O o DH o derivadas de las mismas para las especies vegetales con un número cromosómico haploide de 7 como el pepino, 128 para una especie vegetal con un número cromosómico haploide de 9 como la coliflor y 256 para una especie vegetal con un número cromosómico haploide de 12 como el tomate, el melón y el pimiento. Estas cifras ilustran el hecho de que el número de plantas SDR-O necesarias para aplicar la reproducción casi inversa en estas especies de cultivo es relativamente bajo y por lo tanto la producción de estos números es altamente factible, especialmente en un entorno industrial. Para un experto en la técnica es obvio que estos cálculos se pueden hacer para cualquier especie vegetal de la que se conoce el número cromosómico haploide.

10 "Plantas o células SDR-O" como se utiliza en esta solicitud se aplica para referirse a las plantas y las células resultantes de gametos no reducidos. Tales gametos no reducidos pueden a su vez ser el resultado de un proceso de restitución de la segunda división (SDR), pero también pueden ser el producto de una forma aberrante de meiosis que produce diploides.

15 La invención por tanto describe los medios para utilizar los organismos, en particular las plantas, y sus progenies, regeneradas a partir de gametos no reducidos SDR o similares a SDR, por ejemplo para la reconstrucción genotípica, para producir líneas parentales casi complementarias, para producir líneas de casi sustitución cromosómica y para optimizar híbridos F1 mediante la introducción de segmentos genómicos homo y heterocigóticos.

20 La presente invención se ilustrará más adelante en los siguientes ejemplos no limitativos que se refieren a las siguientes figuras:

La **Figura 5** muestra los patrones AFLP de plantas F2 típicas de pepino. Cada línea horizontal representa una planta individual. Cada columna vertical representa un grupo de enlace. Los segmentos gris claro representan zonas heterocigóticas, las zonas negras y oscuras representan las áreas homocigóticas respectivas.

25 La **Figura 6** muestra el análisis AFLP de líneas DH típicas de pepino. Cada línea horizontal representa una planta individual. Cada columna vertical representa un grupo de enlace. Sólo están presentes las áreas negras y oscuras como se esperaba en los DH los segmentos gris claro están ausentes.

30 La **Figura 7** muestra el análisis AFLP de plantas SDR-O típicas de pepino. Cada línea horizontal representa una planta individual. Cada columna vertical representa un grupo de enlace. Los segmentos gris claro representan zona heterocigóticas, las zonas negras y oscuras representan las áreas homocigóticas respectivas.

La **Figura 8** muestra el polen recogido de las plantas de pimiento tratadas con baja temperatura. El panel A representa el polen de las plantas tratadas con frío mientras que el panel B representa el polen de la planta de control como se observan a través del microscopio óptico.

**EJEMPLOS**

35 **EJEMPLO 1**

Demostración de la existencia de un nivel relativamente bajo de heterocigosidad en plantas de pepino (*Cucumis sativus* L.) obtenidas a través qinogénesis

40 Produciendo haploides y doble haploides de pepino según el documento EP-374755 se encontró mediante el uso de análisis AFLP (llevado a cabo según el documento EP-534858) que entre los doble haploides esperados, un determinado porcentaje resultó no haber sido originado a partir de megasporas haploides sino más bien derivaban de una megaspora no reducida (2n). Esto se demuestra bien en las **Figuras 5, 6 y 7** que muestran que los inicialmente supuestos doble haploides (**Figura 6**) todavía contienen sectores heterocigóticos, que por definición no es posible en verdaderos doble haploides.

45 Este ejemplo muestra que a través de la ginogénesis en pepino se pueden obtener DH pero que además se obtienen plantas que muestran algunas regiones que son heterocigóticas. Este nivel de heterocigosidad es considerablemente reducido en comparación con la producción de F2 por lo que probablemente esté causado por un mecanismo similar a SDR.

**EJEMPLO 2**Mejora de la formación de esporas / gametos no reducidos en pimiento (*Capsicum annuum L.*)

5 Con el fin de aumentar la frecuencia de formación de esporas / gametos no reducidos, se aplicó estrés por frío como inductor. Con este fin, se expusieron a 11°C durante 5 días plantas de pimiento en flor que contenían yemas florales pre-meióticas y cultivadas a 23°C según Zhang et al. (2002) *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 78, 84-88. Después de este golpe de frío, se cosecharon los brotes y el polen se obtuvo mediante la apertura de las anteras con pinzas de disección y bisturí. Posteriormente se transfirió el polen a un portaobjetos de vidrio para microscopio y se tiñeron para la viabilidad usando una gota de carmín acético. Se colocaron cubreobjetos encima de la suspensión que fue investigada mediante microscopía óptica. Como control, se recolectó polen de plantas de pimiento cultivadas a 23°C.

10 La **Figura 8** muestra ejemplos representativos de las morfologías del polen recogido de las plantas tratadas con frío (8A) en comparación con las plantas de control (8B). Como puede verse, la cantidad de polen con un aumento del tamaño indicativo de haber derivado de esporas no reducidos se incrementa considerablemente en la planta tratada en frío. En este ejemplo particular, se estima que el % de esporas no reducidas aumentó hasta 25 debido al tratamiento con frío. Como tal la mejora de la formación de esporas no reducidas mediante el estrés por temperatura demuestra ser altamente factible.

**EJEMPLO 3**Enriquecimiento de esporas diploides de origen natural en brócoli (*Brassica oleracea L.*) mediante citometría de flujo

20 Para el brócoli (y otras especies vegetales) se sabe que las esporas diploides son más grandes que las esporas haploides. Con el fin de determinar si es factible enriquecer las esporas diploides utilizando citometría de flujo se realizaron diferentes mezclas de esporas obtenidas a partir de plantas diploides y tetraploides. Las esporas fueron aisladas moliendo yemas florales (3-4 mm de tamaño) en una disolución amortiguadora (8,2 g / L de NaCl, 1,9 g / L de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0,3 g / L de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, pH = 7,4) y la posterior filtración con un filtro de 110 µM. Las células se lavaron dos veces con la disolución amortiguadora de extracción y se contaron.

25 Se hicieron las siguientes mezclas de células haploides frente a diploides: 1:1, 10:1 y 100:1. La clasificación se llevó a cabo sobre la base de los parámetros de granularidad, vitalidad y tamaño. El enriquecimiento de las células diploides se obtuvo para todas las proporciones y en base a cada uno de los tres parámetros. En un experimento posterior una población de microsporas haploides natural se clasificó en base a los parámetros mencionados anteriormente. Se descubrió que se pueden clasificar microsporas diploides que se estima están presentes en la población de microsporas con una frecuencia de 0,7%. La **Figura 9** muestra las microsporas diploides purificadas (fila inferior) obtenidas en este experimento en comparación con microsporas haploides normales como se observan a través del microscopio óptico. Las fotografías fueron obtenidas por cortesía de Ing. M. Vennik; TNO Leiden (Países Bajos).

**EJEMPLO 4**35 Construcción de vectores de ARN interferente que se pueden utilizar para regular a la baja un gen diana candidato de tetraspora

40 Con el fin de disminuir la actividad de un gen diana candidato en una especie de planta concreta, se puede hacer uso de ARN interferente. Para este propósito se insertaron fragmentos de ADN de la tetraspora de *Arabidopsis thaliana* en pKANNIBAL (Wesley et al. (2001) *The Plant Journal* 27, 581-590) de tal manera que tras expresarse en plantas se forma una molécula de ARN que puede plegarse sobre sí misma por lo tanto formando una estructura de horquilla que desencadena la degradación específica del ARN homólogo.

45 El vector pKANNIBAL contiene un intrón situado aguas abajo del promotor 35S de CaMV y aguas arriba de una señal de poliadenilación de la octopina sintasa. A cada lado del intrón se posiciona un lugar de clonación múltiple que permite la inserción adecuada de los brazos izquierdo y derecho del ADN correspondiente al ARN interferente diana con una orientación invertida uno respecto a otro. Tras la transcripción el intrón se elimina mediante corte y empalme y los brazos izquierdo y derecho se doblan sobre sí mismos formando un ARN de doble cadena.

50 Se aislaron dos fragmentos de ADNc correspondientes al extremo 5' del gen (588 pb, cebador directo: 5'-ACC TCC GAG AAC TCC GTT AAG-3', cebador inverso: 5'-TGC CTG CTT TCT ACC ACT TC-3') y la parte media del gen (679 pb, cebador directo: 5'-TTC TCA AGT GGC AAG GTG TC-3'; cebador inverso: 5'-ATC CCT CTT TGG TGG AGT AG-3'). Se generaron lugares de reconocimiento de enzimas de restricción A ambos lados de cada fragmento lo que permitió la inserción de los fragmentos de ADNc como una repetición invertida en pKANNIBAL. El brazo izquierdo de ambos fragmentos está diseñado como un fragmento XhoI-KpnI mientras que el brazo derecho de ambos fragmentos está diseñado como un fragmento HindIII-XbaI. Como etapa final los cassettes en forma de horquilla completos, que contienen ambas secuencias de tetraspora como repetición invertida, se insertan por separado en un ADN-T de un vector binario llamado pART27 que contiene el gen de la neomicina fosfotransferasa II

como marcador seleccionable para la transformación vegetal. La integridad del ADN-T se confirmó por análisis de secuencia.

- 5 Los vectores binarios resultantes, denominados pRZ226 para el fragmento 5' y pRZ219 para el fragmento 3' se transfieren a *Agrobacterium tumefaciens* mediante un procedimiento de apareamiento triparental. En caso de que la similitud en la secuencia entre un fragmento de un gen diana candidato clonado y el gen específico que tiene que ser desregulado por ARN interferente sea demasiado baja, el método descrito anteriormente se puede utilizar para hacer una construcción similar que contenga fragmentos de ADN que son suficientemente homólogos al gen que tiene que ser desregulado.

#### EJEMPLO 5

##### 10 Transformación de *Arabidopsis thaliana* con pRZ226 y pRZ219

La cepa C58 de *Agrobacterium tumefaciens* que contiene los vectores de transformación vegetal pRZ226 y pRZ219 se cultivaron durante la noche en un medio LB que contiene estreptinomicina (100 mg / L) y espectinomicina (300 mg / L) para seleccionar los vectores y rifampicina (40 mg / L) y gentamicina (25 mg / L) para seleccionar el fondo de *Agrobacterium tumefaciens* C58 a 29°C.

- 15 Con el fin de producir plantas transgénicas, se utilizó el método de inmersión floral de *Arabidopsis* principalmente como se describe en Desfeux et al (2000) *Plant Physiology* 123, 895-904. Las células bacterianas se resuspendieron en la disolución de inmersión floral (50 g de sacarosa + 500 µl de tensioactivo silwett L-77 por litro de milli-Q). Las plantas en estado de producción prematura de semillas, que presentan múltiples yemas florales, fueron sumergidas en la solución de inmersión que contiene las células de *Agrobacterium* con una OD entre 1,0 y 1,5 durante 5-10 segundos con agitación suave. Después de la inoculación, las plantas se colocaron en un recipiente de plástico para mantener la humedad alta en condiciones de poca luz durante un día y posteriormente, las plantas desarrollaron las semillas.

- 20 Los transformantes fueron seleccionados por la germinación de las semillas esterilizadas en superficie en capas de agarosa al 0,1% en placas MS de dureza media que contienen 50 mg / L de kanamicina. Las plántulas resistentes a la kanamicina se transplantaron a tierra en un invernadero.

#### EJEMPLO 6

##### SDR de origen natural en *Brassica oleracea*

- 30 De los híbridos de col roja (*Brassica oleracea*) que portan esterilidad masculina citoplasmática Ogura (CMS) producidos mediante un amplio cruzamiento se seleccionaron las plantas diploides que eran fenotípicamente casi idénticas a la planta CMS de col roja original y que por lo tanto son el resultado de ginogénesis *in vivo*. Estas plantas que fácilmente se pueden distinguir de las plantas híbridas verdaderas en base a su fenotipo se identifican ciertamente con una frecuencia baja.

- 35 Estas plantas se originan a través de la partenogénesis de gametos reducidos que se duplicaron de forma espontánea o a partir de gametos no reducidos. Con el fin de distinguir entre estas posibilidades, el ADN derivado de dicha planta se analizó utilizando AFLP (llevado a cabo según EP-534 858). El análisis demostró la presencia de una frecuencia relativamente baja de loci heterocigóticos que indican que esta planta se originó a partir de un gameto no reducido. Este ejemplo muestra que a través de ginogénesis *in vivo* en *Brassica oleracea*, se pueden obtener plantas con un nivel relativamente bajo de heterocigosidad que probablemente se deba a un mecanismo similar a SDR.

- 40 La **Figura 10** muestra la huella AFLP de una planta *Brassica oleracea* derivada de un gameto no reducido. Las líneas grises indican un marcador homocigótico de uno de los progenitores, y las de color gris oscuro del otro. El gris claro indica el locus de un marcador híbrido.

#### EJEMPLO 7

##### Reproducción casi inversa en maíz

- 45 La incorporación de ácidos nucleicos en el genoma del maíz es un procedimiento rutinario conocido en la técnica y se han descrito métodos de cómo lograrlo (EP-801134; US-5,489,520; EP-97.114654.3). Usando cualquiera de los métodos de transformación descritos en estas solicitudes de patente, se introdujeron secuencias de ácidos nucleicos que confieren un efecto inhibidor específico en un gen o genes que están involucrados en la segunda división meiótica, en particular *elongate1* (Barell, PJ and Grossniklaus, U. (2005) *Plant J.* 43, 309-320) y que como consecuencia conlleva a la aparición de eventos meióticos aberrantes de tipo SDR. La frecuencia de SDR que se obtienen a veces difiere entre los transformantes independientes como consecuencia de diferentes lugares genómicos de integración de las secuencias de ácidos nucleicos transgénicos.

En otro experimento la frecuencia de esporas SDR se aumentó por el tratamiento de plantas de maíz con bajas temperaturas o mediante la aplicación de óxido nitroso gas según se describe en Kato, A and Birchler, JA (2006) *J. Hered.* 1, 39-44.

- 5 Como una consecuencia de la actividad de dichos ácidos nucleicos inhibidores o de la aplicación de bajas temperaturas o de tratamientos con óxido nitroso, se produjeron numerosas microsporas respectivamente macrosporas que son de tipo SDR.

La población de células producida de este modo se enriqueció en la presencia de microsporas SDR-O mediante el uso de citometría de flujo y la clasificación de células activadas por fluorescencia basándose en el hecho de que las microsporas SDR son más grandes en tamaño en comparación con las microsporas haploides normales.

10 Las microsporas o macrosporas que se producen como consecuencia de una SDR contienen un juego diploide de cromosomas. Estas microsporas o macrosporas diploides fueron el material de partida para la producción de regenerantes SDR-O.

15 También se han obtenido plantas de maíz haploides mediante polinización natural y artificial seguida de un inductor haploide. En este caso se obtienen semillas que contienen embriones haploides véase fi. Rotarenco V (2002) *Production of matroclinous maize haploids following natural and artificial pollination with haploid inducer. Maize Genetics Cooperation News Letter* 76: 16. Los protocolos mencionados para producir plantas de maíz DH también se han aplicado para producir embriones SDR-O de maíz a partir de células SDR-O, la formación de las cuales es inducida por los tratamientos especificados en este ejemplo. Con el fin de obtener el equilibrio adecuado entre los genomas materno y paterno en el endospermo de los granos SDR-O, también se ha utilizado una línea inductora tetraploide.

25 En el experimento específico en el que se aplica la transgénesis para inducir SDR, se prefirieron transformantes que contenían una sola copia del transgén. Después de la obtención de una línea transgénica que contiene una construcción de ácido nucleico que inhibe en gran medida la segunda división meiótica, esta línea se utilizó en cruzamientos con el fin de evitar eventos de transformación repetitivos. En ese caso la frecuencia de polen normal que contiene gametos haploides fue baja pero todavía suficiente para ser utilizados para el cruzamiento.

En un experimento adicional, se utilizó una construcción de ácido nucleico inhibidor que está controlada por un promotor que es químicamente inducible por p. ej. la dexametasona (Bohner, S. et al (1999) *Plant J.* 19, 87-95).

30 A continuación se obtuvieron haploides de maíz de forma rutinaria a partir de microsporas (Pescitelli S and Petolino J (1988) *Plant Cell Reports* 7: 441-444; Coumans M et al, (1989) *Plant Cell Reports* 7: 618-621; Pescitelli S. et al, (1989) *Plant Cell Reports* 7: 673-676; Buter B (1997) *In vitro* haploid production in maize. In: *In Vitro Haploid Production in Higher plants*, vol. 4, 37-71 Kluwer Academic Publishers Eds.; S Jain, S Sopory & R Veilleux).

35 Las plantas haploides de maíz también se obtuvieron con polinización natural y artificial seguida de un inductor haploide (Rotarenco V (2002) *Maize Genetics Cooperation News Letter* 76: 16.) En este caso se obtuvieron semillas que contienen embriones haploides.

Los protocolos mencionados anteriormente para producir plantas de maíz DH se aplicaron para producir plantas de maíz SDR-O a partir de células SDR-O, la formación de las cuales se induce transgénicamente o por los otros tratamientos especificados en este ejemplo.

40 Las plantas de maíz SDR-O se caracterizaron genéticamente con respecto a las regiones centroméricas de cada cromosoma usando un marcador molecular que es polimórfico para estas regiones en la planta original de partida. Para la detección del polimorfismo se utilizaron distintas tecnologías, seleccionadas de entre CAPS, dCAPS, Invader, pirosecuenciación, taqman.

45 Por lo tanto, se identificaron las parejas de las plantas de maíz SDR-O que son complementarias para todos los pares cromosómicos con respecto a los resultados del marcador de las regiones centroméricas. Posteriormente se utilizaron estas parejas de plantas de maíz SDR-O para producir plantas doble haploides por cada planta complementaria SDR-O. Los DH individuales que se obtiene a partir de cada planta SDR-O complementaria se cruzaron por pares i.e. los dos DH que se utilizan para producir un híbrido F1 de maíz se originaron a partir de cualquiera de las SDR-O complementarias. Estos cruzamientos se hicieron recíprocamente. Los híbridos F1 producidos de este modo se evaluaron en ensayos de campo de rendimiento agronómico en los que se utilizó el híbrido de partida F1 como control.

50 Se descubrió que el comportamiento agronómico de los híbridos obtenidos mediante la reproducción casi inversa de la invención es similar al comportamiento del híbrido original.

**EJEMPLO 8**Reproducción casi inversa en pepino

5 La ginogénesis es una tecnología bien asentada en pepino y se lleva a cabo según el método descrito en el documento EP 0 374 755. Las SDR espontáneas que se producen durante ginogénesis cuando se aplica según el documento EP 0 374 755 conducen a la formación de regenerantes diploides que tienen alguna heterocigosidad residual. Estas plantas de pepino SDR-O se identificaron utilizando el análisis de AFLP llevado a cabo según el método proporcionado por el documento EP 534858.

10 Las plantas de pepino SDR-O así obtenidas se caracterizaron genéticamente con respecto a las regiones centroméricas de cada cromosoma utilizando marcadores moleculares que son polimórficos para estas regiones en la planta original de partida. Para la detección de los polimorfismos, se utilizaron tecnologías conocidas seleccionadas de entre CAPS, dCAPS, Invader, pirosecuenciación, taqman. Esto dio lugar a la identificación de parejas de plantas de pepino SDR-O que eran complementarias para todos los pares cromosómicos con respecto a los resultados del marcador de las regiones centroméricas. Estas parejas de plantas de pepino SDR-O se utilizaron posteriormente para producir plantas DH para cada planta SDR-O complementaria según el método descrito en el documento EP 0 374 755.

15 Las SDR que ocurren de forma espontánea fueron descartadas y sólo se usaron las verdaderas plantas doble haploides en las siguientes etapas. En caso de que se obtengan plantas haploides el número de cromosomas se duplica p. ej. aplicando colchicina. La duplicación cromosómica también puede ocurrir espontáneamente. Las plantas DH individuales obtenidas a partir de cada planta SDR-O complementaria posteriormente se cruzaron por pares i. e. las dos DH que se usaron para producir un híbrido F1 de pepino se originaron a partir de cualquiera de las SDR-O complementarias. Estos cruzamientos se hicieron recíprocamente. Los híbridos F1 producidos de este modo se evaluaron en ensayos de rendimiento agronómico en los que se utilizó el híbrido F1 de partida como control.

20 Se descubrió que el comportamiento agronómico de los híbridos obtenidos mediante la reproducción casi inversa de la invención es similar al comportamiento del híbrido F1 original.

25

**REIVINDICACIONES**

1. Método para producir una planta homocigótica a partir de una planta heterocigótica que comprende:
  - 5 a. someter las plantas heterocigóticas a estrés ambiental, donde el estrés ambiental se selecciona de estrés de temperatura, NO<sub>2</sub>, óxido nitroso N<sub>2</sub>O, o combinaciones de éstos, o modificar genéticamente la planta heterocigótica con una construcción genética que permita la interferencia con las funciones génicas involucradas en la segunda división de la meiosis, para producir un número de esporas SDR-O superior al promedio.
  - b. regenerar las plantas SDR-O a partir de esporas SDR-O; y
  - 10 c. producir la planta homocigótica a partir de las plantas SDR-O así obtenidas.
2. Método según la reivindicación 1, donde la modificación genética es transitoria.
3. Método según la reivindicación 1, donde la modificación genética es por incorporación estable dentro del genoma de un elemento genético que incrementa el número de eventos de restitución de la segunda división en la planta.
- 15 4. Método según la reivindicación 1, donde las plantas homocigóticas se preparan por técnicas de duplicación de haploides o restitución de la segunda división.

Fig. 1A

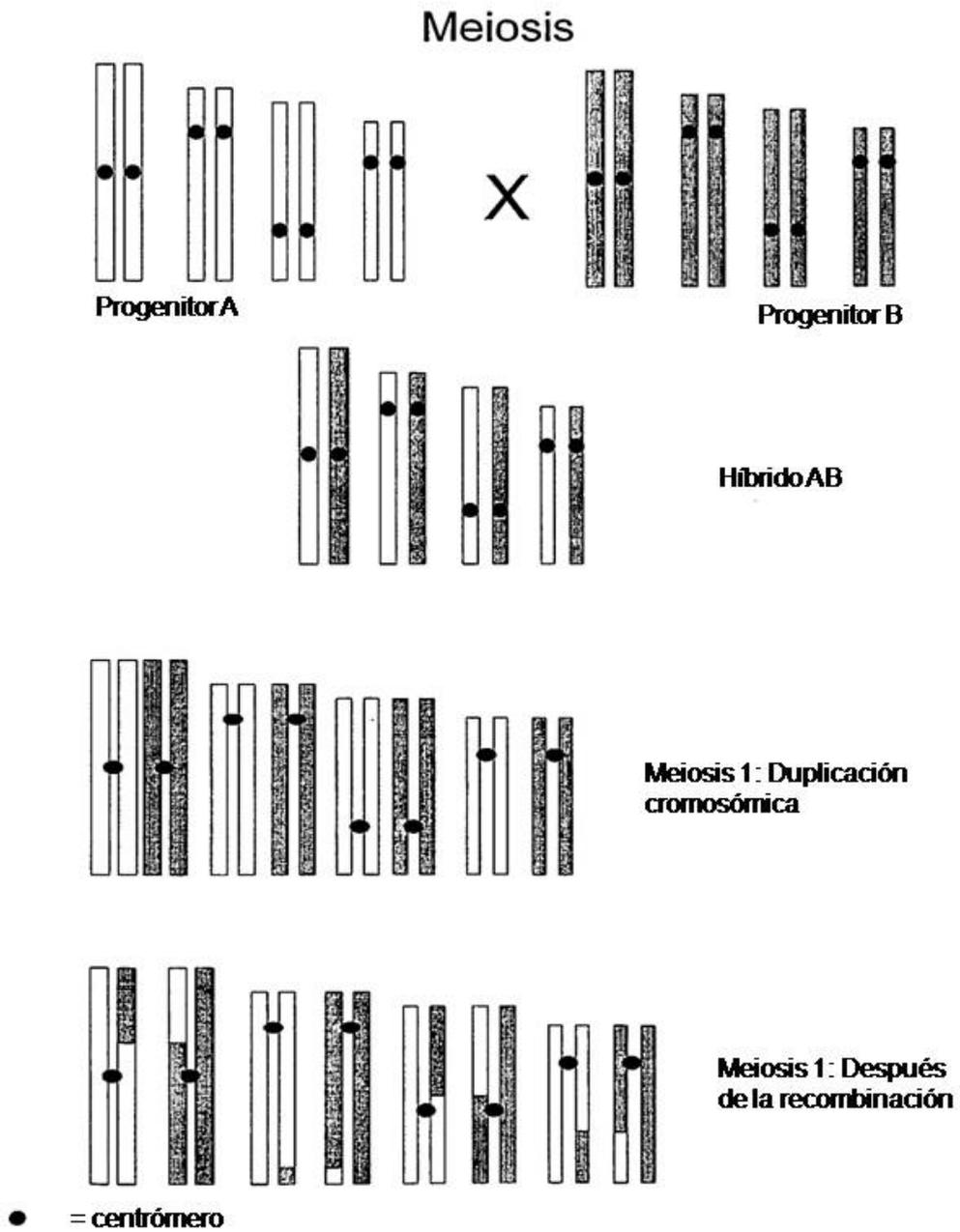
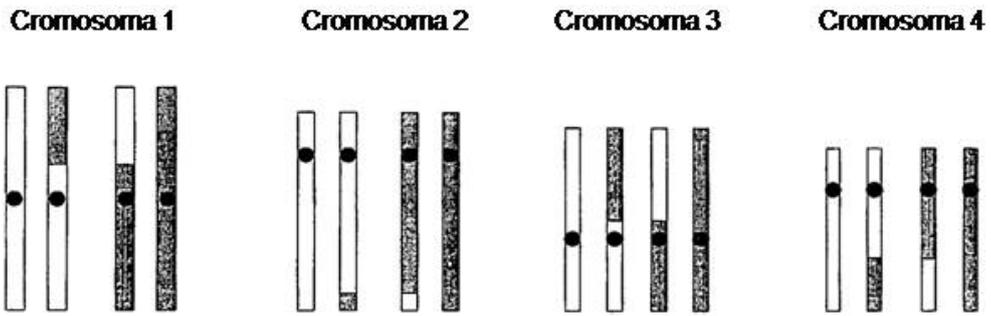


Fig. 1B

**Meiosis 2: Formación de esporas/gametos**



**Grupos de cromosomas recombinantes/progenitores**

**3 ejemplos posibles de esporas/gametos**



**Doble haploides correspondientes**

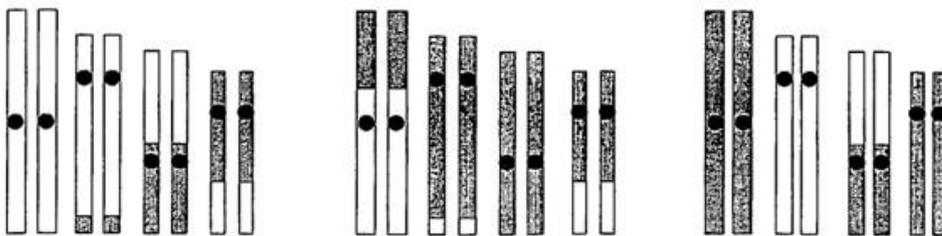
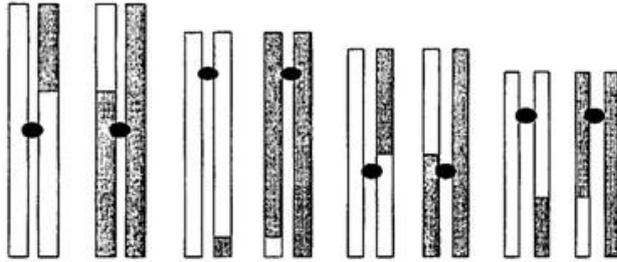


Fig. 2

Sin que tenga lugar la segunda división = restitución de la segunda división

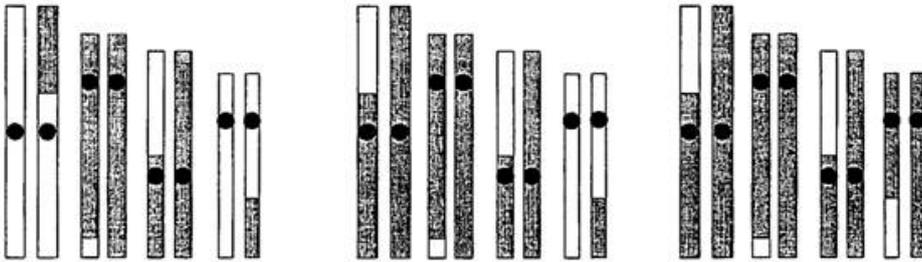


4 ejemplos de esporas/gametos (SDR-0):  
Observar la heterocigosidad parcial

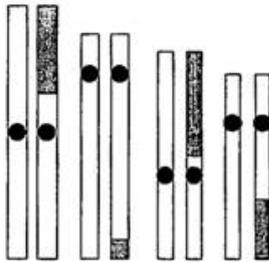
(1)

(2)

(3)



(4)

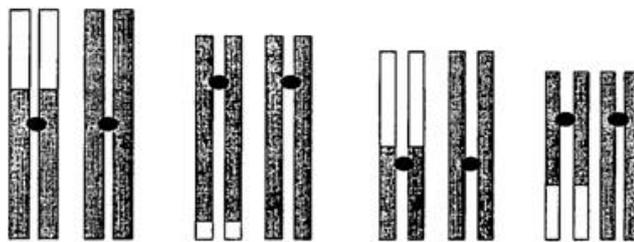
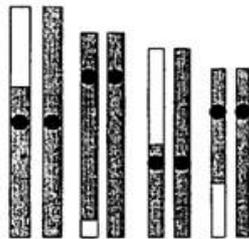


Observar que en los ejemplos 3º y 4º la composición básica de los juegos de cromosomas derivan de los progenitores respectivos; estos juegos se parecen a "BIL" pero en estado heterocigótico.

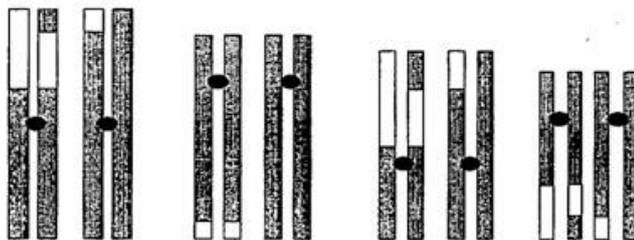
Los ejemplos 1 y 2 se parecen a "RIL" en un estado heterocigótico

Fig. 3A

(3)



**Meiosis 1: Duplicación cromosómica**



**Meiosis 1: Después de la recombinación**

Fig. 3B-1

**Gametos posibles a partir de un suceso de recombinación a partir de un suceso SDR 1**

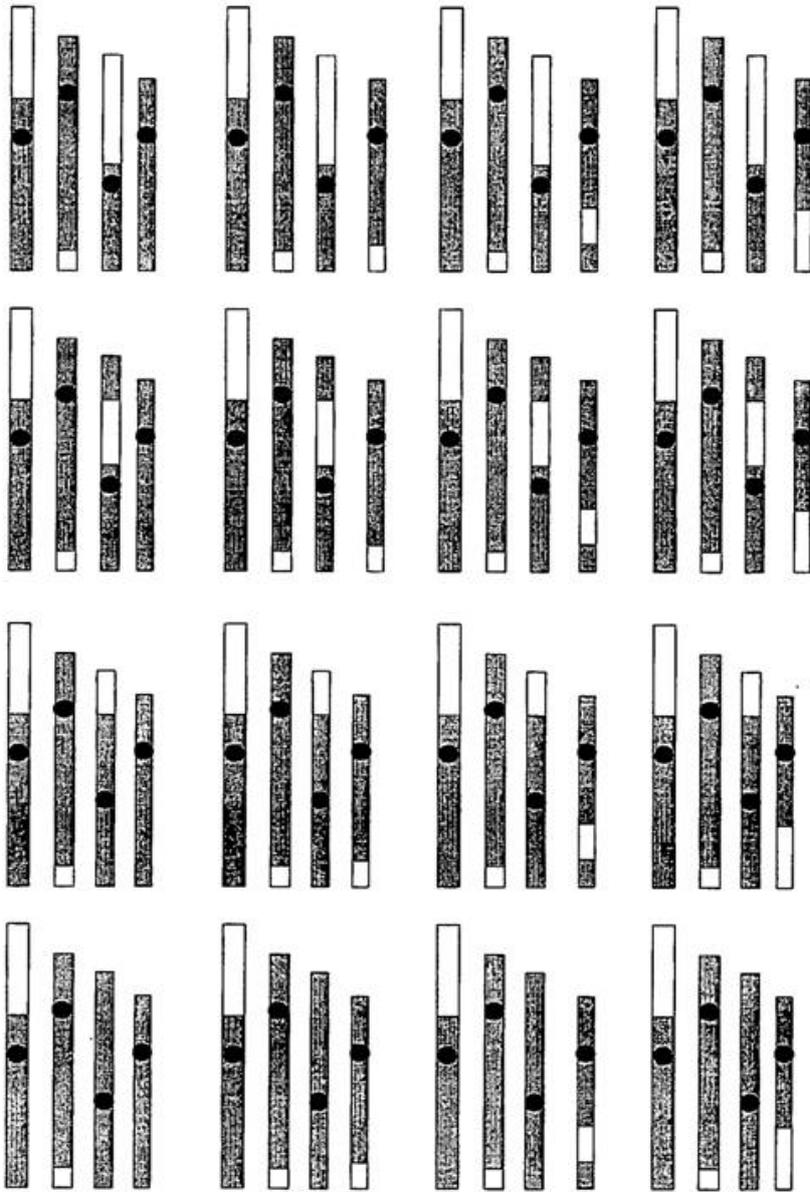


Fig. 3B-2

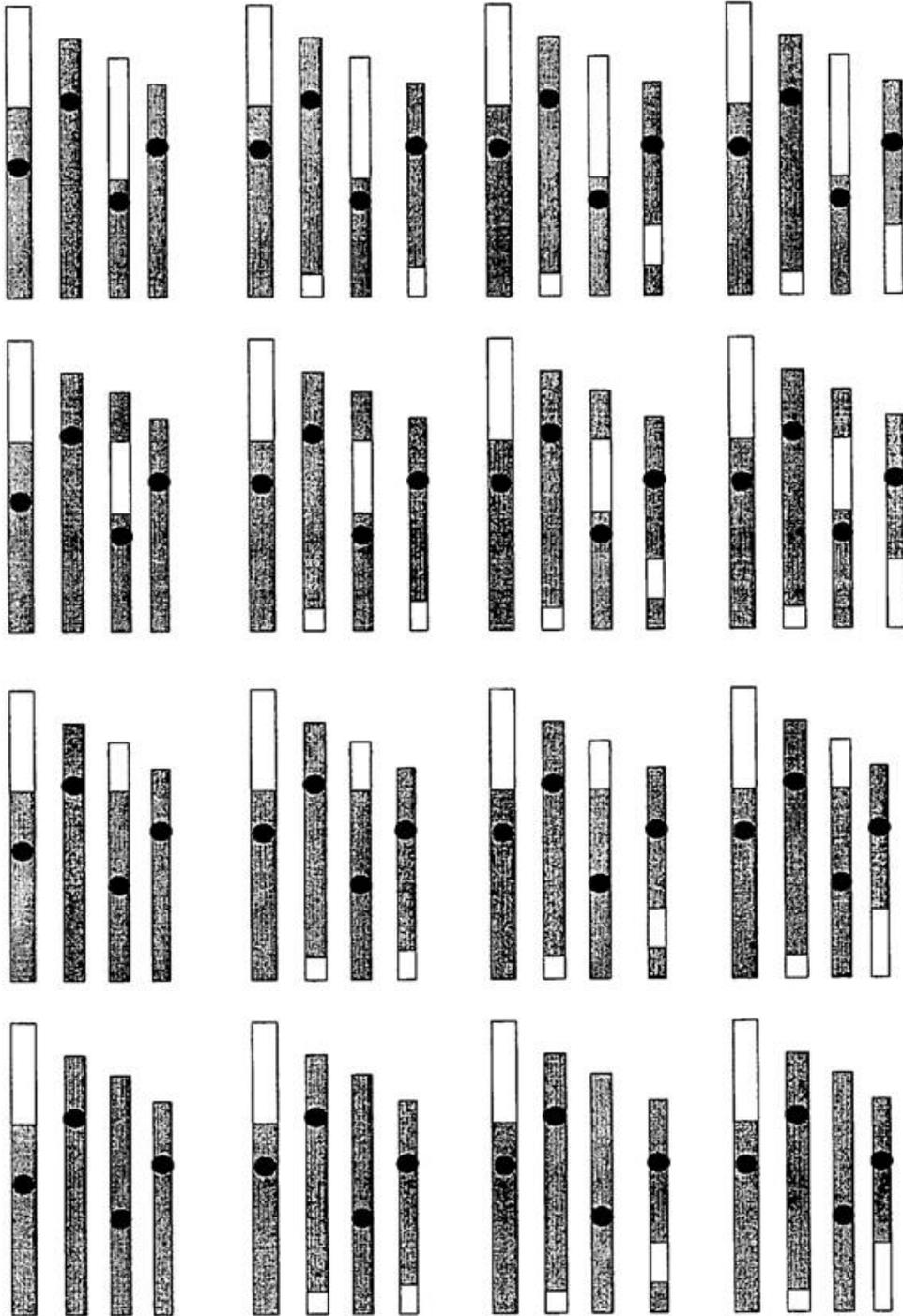


Fig. 3B-3

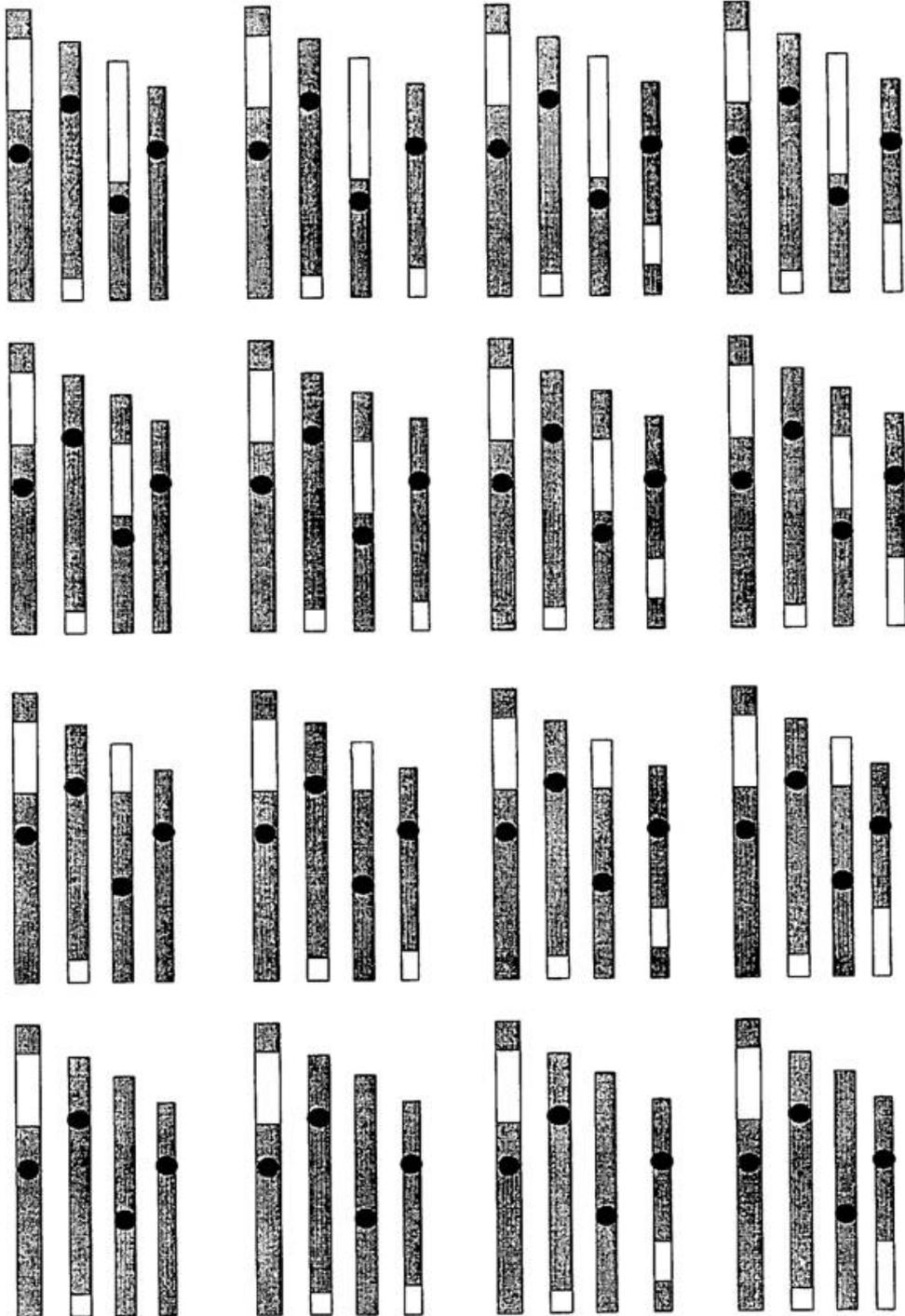


Fig. 3B-4

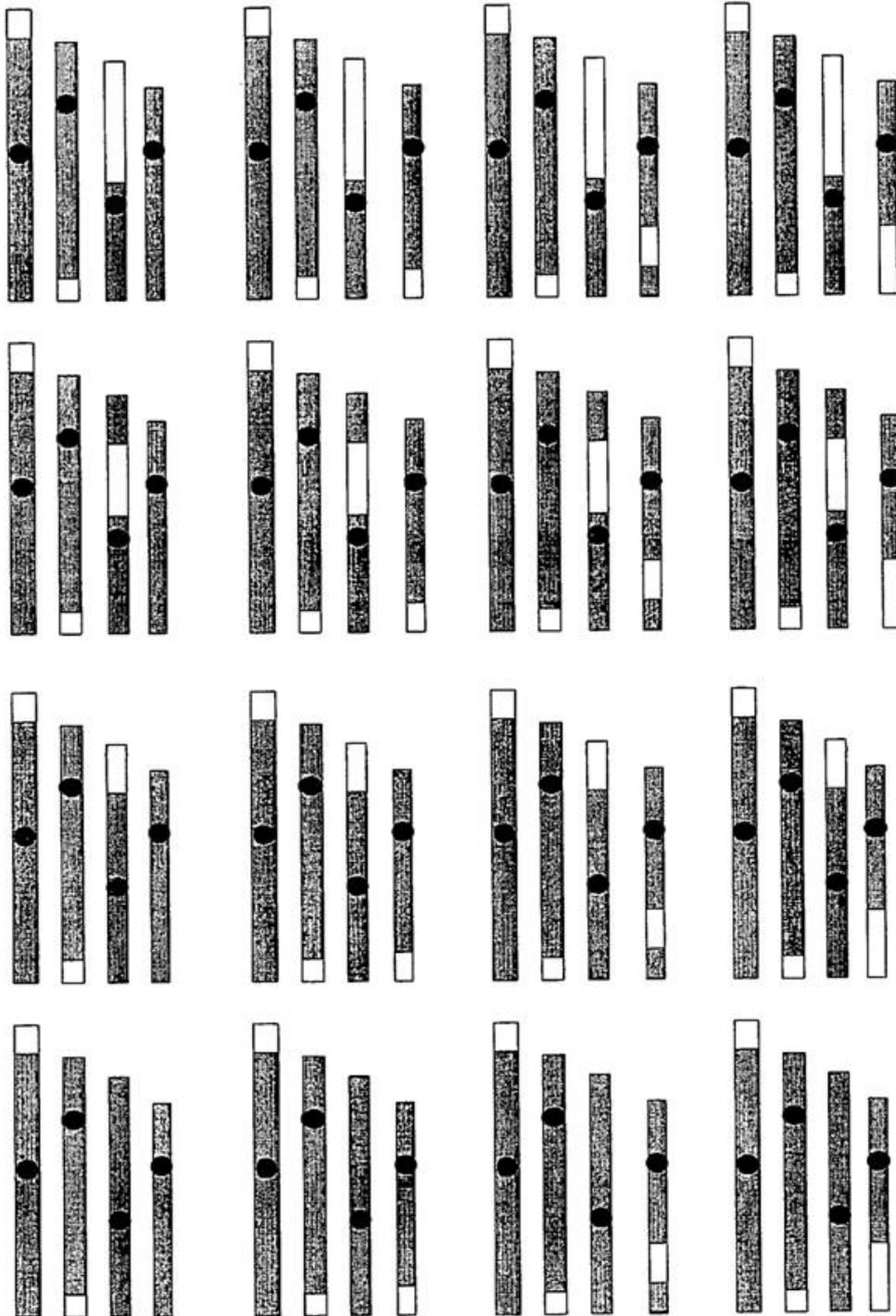


Fig. 3B-5

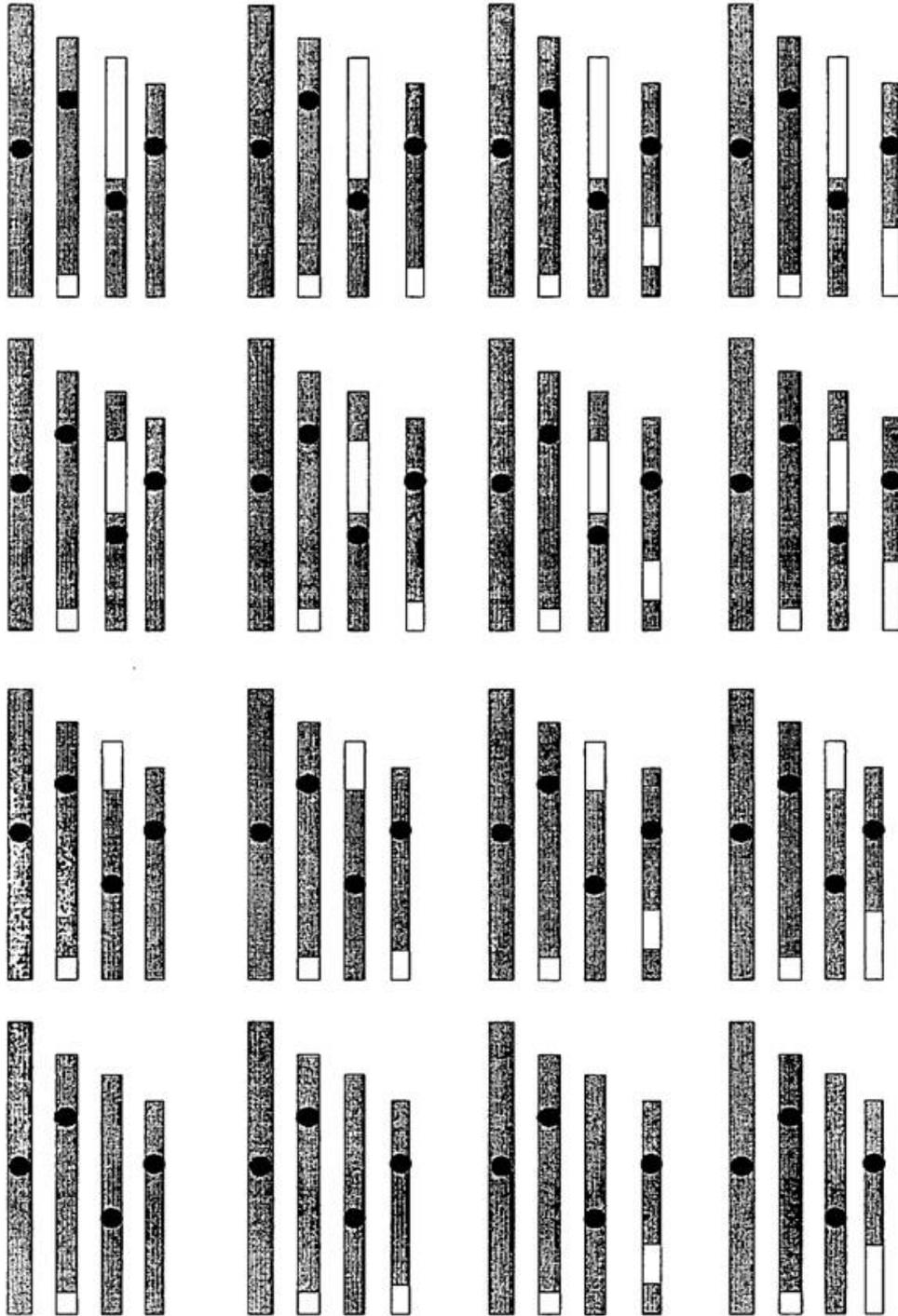


Fig. 4

Figura 4. Doble haploide (izquierda) de una espora/gameto a partir de un suceso SDR-0 parecido a una de las líneas progenitoras originales (derecha)



Fig. 5



Fig. 6



Fig. 7



Fig. 8A

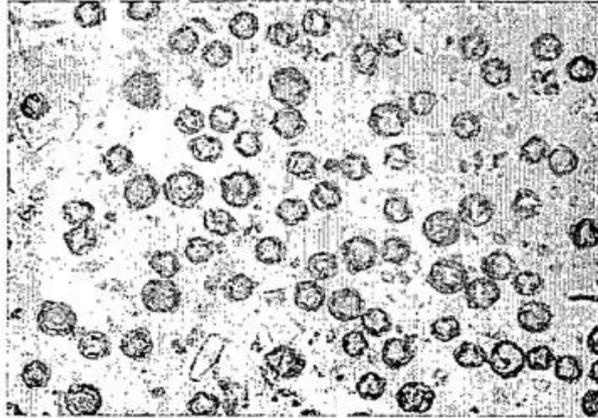


Fig. 8B

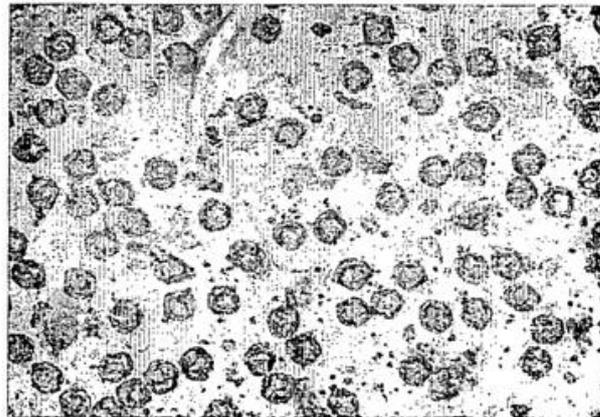


Fig. 9

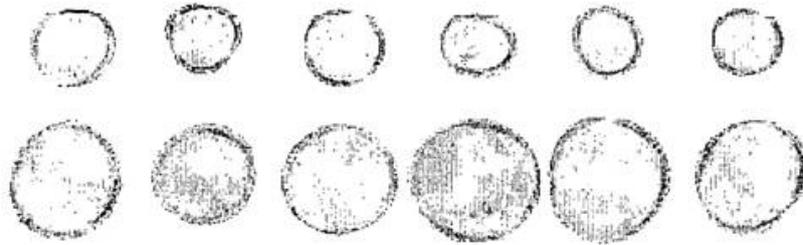


Fig. 10

