

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 554 471**

51 Int. Cl.:

A01H 1/00 (2006.01)

A01H 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.03.2006 E 06707461 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.11.2015 EP 1855518**

54 Título: **Mapeado de progenie inverso**

30 Prioridad:

03.03.2005 EP 05075519

06.01.2006 EP 06075041

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

21.12.2015

73 Titular/es:

**RIJK ZWAAN ZAADTEELT EN ZAADHANDEL B.V.
(100.0%)**

**Burg. Crezeelaan 40
2678 KX De Lier, NL**

72 Inventor/es:

**DIRKS, ROBERT HELENE GHISLAIN y
SCHUT, JOHANNES WILHELMUS**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 554 471 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

Mapeado de progenie inverso

La presente invención se refiere a un método para mapear rasgos en plantas.

- 5 Los rasgos de cultivo complejos tales como el rendimiento, la tolerancia a estrés, la composición de metabolitos y fenómenos relacionados tales como la heterosis y la habilidad combinada son difíciles de estudiar debido a su naturaleza genética cuantitativa y a la fuerte interacción con el entorno. Adicionalmente, la genética de dichos rasgos/fenómenos provocados por los mismos muy a menudo también es compleja y mayoritariamente cuantitativa y poligénica, lo que significa que el fenotipo resultante viene dado por la interacción de los diferentes alelos que están codificados por diferentes localizaciones genéticas.
- 10 Los intentos para caracterizar las localizaciones individuales que contribuyen a un rasgo cuantitativo han tenido éxito cuando cada una de las localizaciones individuales presenta una contribución medible al efecto total independientemente de la presencia o la ausencia de alelos del resto de localizaciones, que contribuye al rasgo cuantitativo. En este caso, los QTLs individuales, como son denominados, son de naturaleza aditiva y se heredan de un modo Mendeliano simple.
- 15 Se han descrito con detalle varios métodos para el mapeado de QTL, sin embargo la mayoría de estos métodos fallan cuando los fenotipos se deben a la interacción de numerosas localizaciones heterocigotas, especialmente cuando dichas localizaciones son interdependientes. Esto significa que es necesario que haya dos o más localizaciones específicas presentes simultáneamente para la expresión de un rasgo específico. En ausencia de los alelos requeridos sobre cualquiera de las dos localizaciones, el rasgo fenotípico no se expresará. Los alelos requeridos individualmente pueden existir tanto en forma homocigota como heterocigota. Dependiendo del rasgo específico, pueden requerirse diferentes constituciones genéticas de las localizaciones. Por ejemplo, solo se observa un efecto medible cuando hay presentes 2 ó más localizaciones en estado heterocigoto y no se observa cuando alguno de las localizaciones es homocigota. En tal caso, se podría afirmar que dichas localizaciones son interdependientes.
- 20
- 25 Como se ha mencionado anteriormente, los rasgos complejos tales como el rendimiento y la tolerancia a estrés, son de una alta importancia industrial, y por lo tanto es altamente deseable disponer de herramientas como marcadores moleculares ligados a dichos rasgos complejos, que permitan una mejor eficacia del desarrollo de dichos rasgos en cultivos diferentes.
- 30 La crianza de plantas contemporánea se lleva a cabo rutinariamente mediante tecnologías de marcador genético (molecular) tales como AFLP, RAPD's, SSR's, SNP's, etc., para una revisión véase, p.ej., Lakshmikumaran, T. et al., *Molecular markers in improvement of wheat and Brassica*. En: Plant Breeding – Mendelian to Molecular approaches. H. Jain y M. Kharkwal (eds.) Copyright 2004 Narosa Publishing House, Nueva Delhi, India, páginas 229-255.
- 35 Los marcadores moleculares son muy deseables como herramientas diagnósticas que indican la presencia de un rasgo particular incluso en una etapa de desarrollo durante la cual el rasgo no es expresado. Adicionalmente, los marcadores moleculares son insensibles a las condiciones ambientales.
- 40 Como ejemplo, se puede tener marcadores moleculares (por ejemplo en la forma de SNP = polimorfismo de nucleótido único, o asociado a bandas de ADN en geles de agarosa o poliacrilamida) que estén ligados genéticamente a genes responsables del color de los frutos de pimienta cuando están maduros. Se puede usar una muestra de ADN tomada de un semillero para determinar qué color tendrán finalmente los frutos de la planta. Por tanto, en este caso, existe una asociación directa entre la presencia de una secuencia de ADN particular que esté siendo "convocada" y la presencia de un rasgo particular.
- 45 En esencia, el mismo procedimiento es válido para muchos rasgos poligénicos (véase, p.ej., Tanksley S., *Mapping polygenes*, Annu. Rev. Genet. 1993, 27: 205-233). En el último caso, el rasgo, sea cual sea, por ejemplo, resistencia a enfermedad, resistencia a estrés, producción de vitaminas, etc., puede estar controlado por más de una localización. Se supone que la contribución de cada localización individual, y su marcador de ADN asociado, pueden medirse y que la suma de las diferentes localizaciones y sus respectivos marcadores de ADN dará como resultado fenotípicamente la presencia del rasgo particular (en un determinado grado). Este concepto se remonta al trabajo clásico de R. A. Fisher (*The correlations between relatives on the supposition of Mendelian inheritance*, Trans. R. Soc. Edinb. (1918) 52, 399-433), que unía la genética Mendeliana con las estrategias estadísticas previas de correlación entre parientes, para explicar los rasgos heredados cuantitativamente.
- 50 El mapeado de cromosomas eucarióticos mediante recombinación es una técnica bien conocida por los especialistas en el campo (Griffiths AJF et al., (2005) Eukaryote chromosome mapping by recombination, En: *Introduction to Genetic Analysis*, 8ª edición. W. H. Freeman and Company, Nueva York, páginas 115-137).
- 55 El mapeado de rasgos segregativos, es decir mapeado-QTL (QTL = Localización de Rasgo Cuantitativo, del inglés "Quantitative Trait Locus"), no depende solo de cuestiones técnicas o de recombinación sino que es igual de importante la observación o la puntuación precisas, cualitativamente o cuantitativamente, respectivamente, del

fenotipo. En este sentido, cuando se mapean rasgos o efectos complejos, la persona especialista en la técnica usa preferentemente una población de líneas haploides dobles (DH) o una población de líneas innatas recombinantes (RIL), que son segregativas para el(los) rasgo(s) de interés, y que derivan de una única planta F1.

5 Las líneas DH derivan directamente de gametos vegetales F1 haploides, mediante regeneración de plantas y duplicado de cromosomas. Las RILs son líneas altamente innatas, derivadas mediante descendencia de semilla individual (SSD), es decir a través de cultivo a lo largo de varias generaciones, donde cada planta individual proporciona una semilla para la siguiente generación, comenzando en la F2.

10 Alternativamente, se usan las denominadas Líneas Casi Isogénicas (NIL). Las NILs son líneas homocigotas que difieren en un pequeño fragmento de ADN. Normalmente derivan de retrocruces, pero también pueden obtenerse a partir de RILs segregativas (Tuinstra et al., (1997) *Theor. Appl. Genet.* 95: 1005-1011).

15 Las líneas DH, las RILs y las NILs han contribuido enormemente a la genética contemporánea y al mapeado genético. La ventaja de dichas líneas puras reside exactamente en el hecho de que una variación fenotípica entre líneas (variación inter-línea) se registra fácilmente en comparación con la segregación al nivel de plantas individuales para una población de mapeado F2 clásico. Por supuesto, la disponibilidad de líneas puras tiene cada vez mayor importancia, ya que la influencia ambiental también puede ser tenida en cuenta a través de la replicación de plantas genéticamente idénticas de una línea pura. Esto contrasta con los fenotipos de planta F2 individuales, no replicados, sencillos, que son producto de la interacción de genes y el entorno.

20 La elucidación de efectos complejos tales como la heterosis o combinar capacidades entre líneas es uno de los mayores retos en la genética y el cultivo de plantas contemporáneos. Para la heterosis, se han formulado varias hipótesis (véase, p.ej., Birchler J. et al. (2003) *The plant Cell* 15, 2236-2239). Las denominadas explicaciones históricas para la heterosis son la "sobredominancia" y la dominancia. Sobredominancia se refiere a la idea de que se producen interacciones alélicas en el híbrido de tal modo que la clase heterocigota se comporta mejor que cualquier clase homocigota. Dominancia se refiere a la situación en la que el alelo recesivo subóptimo de un progenitor se complementa con el alelo dominante del otro progenitor. Aunque los efectos heteróticos explicados por la dominancia pueden en principio fijarse en un estado homocigoto, es obvio que para los efectos explicados por la sobredominancia esto es imposible. Recientemente ha quedado claro que las dos explicaciones de localización sencilla en competencia para la heterosis son insuficientes y que también los efectos epistáticos, es decir las interacciones inter-localización, desempeñan un papel fundamental como base genética en la heterosis (Yu SB et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 9226-9231).

30 Como se ha mencionado antes, las estructuras de población de mapeado usadas tradicionalmente con individuos homocigotos, tales como las poblaciones de Línea Innata Recombinante (RILs) y las poblaciones de Haploide Doble (DH), no pueden aplicarse fácilmente para mapear el efecto específico del estado heterocigoto en una localización determinada. Esta desventaja ha sido superada cruzando dichas poblaciones con evaluadores, y determinando los fenotipos de los retoños híbridos. Sin embargo, esta estrategia presenta tres desventajas. En primer lugar, requiere más trabajo, espacio y tiempo. Además, compara el estado heterocigoto de una localización solo con uno de los dos posibles estados homocigotos, salvo que se use al menos un evaluador adicional. Y finalmente, no establece completamente la interacción entre la localización heterocigota y el fondo genético, es decir la interacción genética con efectos específicos debidos a la heterocigotidad.

40 El uso de poblaciones reproductoras de dialelo, propuesto por Charcosset et al. (1994) y Rebaï et al. (1994) (ambos en: *Biometrics in plant breeding: applications of molecular markers*; Editores: Ooijen J. y Jansen J. CPRO-DLO, Wageningen, Holanda), solventa parte de las últimas dos desventajas, pero requiere incluso más trabajo y espacio.

45 Se pueden aplicar poblaciones F2 y de retro-cruce para determinar el mapeado del efecto específico del estado heterocigoto en una localización determinada. Sin embargo, solo se permite una interacción genética limitada en el análisis QTL basado en F2, debido al espacio de parámetros disponible en el modelo estadístico, que está limitado por el tamaño poblacional. Las poblaciones de retro-cruce requieren más tiempo y trabajo para producir las, y el efecto del estado heterocigoto en una localización determinada tan solo es estimado para el fondo genético del progenitor recurrente, sin tener en cuenta las posibles interacciones con otras localizaciones.

50 Otra estrategia para evitar grandes inversiones de tiempo, espacio y trabajo para desarrollar poblaciones de mapeado es el mapeado de desequilibrio de enlace (mapeado LD; Kraakman ATW et al. (2004) *Genetics* 168, 435-446; Kraft T et al. (2000) *Theor. Appl. Genet.* 101, 323-326). Este método hace uso de material genético existente disponible, tal como las variedades y los números de acceso de bancos genéticos. Si dicho material es suficientemente heterocigoto, por ejemplo un conjunto de mapeado de variedades híbridas, es posible estimar el efecto específico de las localizaciones heterocigotas. Sin embargo, en general los métodos de mapeado LD no consideran efectos epistáticos y requieren grandes números de acceso para detectar QTLs que trabajen de forma aditiva entre el ruido estadístico generado por los efectos epistáticos, que son debidos a los diferentes fondos genéticos a lo largo de los números de acceso. (Flint-Garcia SA et al. (2003) *Annu. Rev. Plant Biol.* 54, 357-374).

55 Los rasgos que son dependientes de la combinación de la constitución alélica de dos o más localizaciones son mucho más difíciles de identificar o de mapear. En la genética poblacional esta interacción entre varias

localizaciones se denomina “epistasis”. En este caso, la contribución de una localización solo es medible en una determinada constitución alélica de otra localización, o de una tercera, cuarta, etc.

En un caso teórico sencillo se podría imaginar que una enzima homodimérica que está codificada por un gen específico (1 localización) puede ser más efectiva en catálisis si los dímeros son ligeramente diferentes (1 localización pero 2 alelos en el heterocigoto) de tal modo que, por ejemplo, se forme un centro catalítico más efectivo. En este caso AA' es superior en catálisis respecto a AA ó A'A'. Además de esto, es muy posible que una ruta biosintética dicha enzima codificada por el gen “A” (sea cual sea la composición genética) pudiera ser dependiente de la catálisis de otra enzima que esté antes o después de la enzima particular en la cascada de transformaciones. Se puede entender fácilmente que si la enzima “A” se vuelve más eficiente, que dicho incremento de la eficiencia pueda ejecutarse eficazmente solo si no hay limitación en el sustrato que “alimenta” a la enzima codificada por “A”. En el caso de que el sustrato usado por la enzima A sea proporcionado por otra enzima (B) en la que se cumpla la misma regla (enzima homodimérica mejorada por 2 alelos) entonces la mejora se obtiene solo a través de la combinación. En ese caso, AA'/BB' es mejor que AA/BB' ó AA'/BB y que todas las demás combinaciones en las que ambos estados heterocigotos estén ausentes.

Por otro lado, si el resultado de la ruta ya no está limitado por la etapa que controla A, pero si una enzima posterior a A constituye la etapa limitante, entonces el efecto de diferentes alelos de A no es medible y por tanto la localización que es responsable de la enzima posterior a A es epistática respecto a A.

Un ejemplo bien conocido en el que los individuos heterocigotos son superiores a los individuos homocigotos es la anemia de célula falciforme. La investigación sobre la persistencia de un alelo que es tan claramente nocivo en individuos homocigotos condujo al descubrimiento de que el alelo confiere una resistencia pequeña pero significativa a las formas letales de la malaria en individuos heterocigotos. La selección natural ha dado como resultado una población de alelos que equilibra los efectos negativos de la condición homocigota con la resistencia a la malaria producida por la condición heterocigota.

Es obvio que una heterocigocidad y una epistasis superiores pueden estar presentes simultáneamente y los efectos descritos para homodímeros también pueden ser válidos para heteromúltimeros.

En conclusión, esto significa que la contribución de una localización particular por sí misma no se puede medir o visualizar fácilmente, debido a que al menos parte de la contribución de la localización individual es no aditiva e interactúa con el estado alélico de una o más localizaciones adicionales. Por lo tanto, el mapeado QTL de rasgos epistáticos no puede ser llevado a cabo fácilmente mediante métodos tradicionales, que generalmente asumen una aditividad entre localizaciones. La incorporación de interacciones inter-localizaciones en estos métodos a menudo da como resultado problemas con la estimación de parámetros estadísticos y una baja potencia para detectar QTLs, debido a la alta parametrización de los modelos genéticos usados para este fin.

Métodos alternativos que intentan solventar este problema son el mapeado QTL x fondo genético, que se aplica sobre poblaciones emparejadas de dialelo (Charcosset A et al. (1994) pág. 75-84, y Rebañ A et al. (1994) pág. 170-177, ambos en: *Biometrics in plant breeding: applications of molecular markers*; Eds: Ooijen J y Jansen J. CPRO-DLO, Wageningen, Holanda), y el mapeado QTL x población, aplicado sobre múltiples cruces de línea innata relacionados (Jannink J-L y Jansen R (2001) *Genetics* 157: 445-454). Este último establece que dichos métodos también pueden aplicarse a otras estructuras poblacionales.

Una estructura poblacional interesante para el propósito de la detección de interacciones epistáticas es la Familia Innata Heterogénea (HIF) (Haley S et al., (1994) *Theor. Appl. Genet.* 88, 337-342; Tuinstra M et al., (1997) *Theor. Appl. Genet.* 95: 1005-1011), debido a su propiedad de “múltiple ceteris paribus”, es decir, la familia contiene muchas sub-poblaciones posibles, donde cada una de ellas solo un QTL segrega un fondo homocigoto específico para los otros QTLs.

La construcción de poblaciones HIF es muy tediosa. Se necesitan varias generaciones de descendientes de semilla única, lo que significa que es un proceso laborioso y lento. Para cuando se haya completado la población HIF, puede que los progenitores de población elegidos ya no estén al día. Las instalaciones o localizaciones alternativas para disminuir el tiempo de generación requieren grandes inversiones. También considerando el hecho de que solo se analizan los alelos de QTL de dos progenitores, a menudo no merece la pena invertir en dichas poblaciones con fines de cultivo comercial.

Una estrategia más pragmática para el mapeado QTL en presencia de epistasis se presenta en la Solicitud de Patente de EE.UU. nº 2005/0015827. La posición y el efecto de los QTLs en el fondo dado tal como se encuentra en el programa de cultivo en marcha se monitorizan de forma recurrente. No se aplica una estructura poblacional específica, como en el mapeado de desequilibrio de enlace (ver más abajo), y se aceptan los cambios de posición y efecto de los QTLs como un hecho de la vida. Las principales desventajas de este método son el elevado número de accesos que han de ser analizados y la falta de potencia analítica para establecer efectos epistáticos específicos. En otras palabras, no se analiza qué localización específica del fondo genético está interactuando con los QTLs cambiantes.

Un modo más radical de evitar los efectos epistáticos en el análisis QTL es el uso de poblaciones de retro-cruce. De este modo, los efectos de QTL pueden analizarse en un fondo genético más o menos constante, es decir el del progenitor recurrente. La mayoría de los tipos de población de retro-cruce (por ejemplo las líneas innatas de retro-cruce o BIL's) pueden verse como análogos de tipos de población de mapeado regular donde se han incluido una o más generaciones de retro-cruce para crear un fondo genético más uniforme, y en varios casos para descartar uno de los tres estados alélicos de una localización.

En vista de lo anterior, un objetivo de la presente invención es proporcionar un método para mapear rasgos en plantas, que no presente las desventajas descritas anteriormente.

La presente invención se basa en el descubrimiento de que es posible mapear fácilmente las localizaciones que codifican rasgos complejos haciendo uso de gametos, derivados de una clase particular de divisiones meióticas anormales, y fenotipar la progenie de organismos generados a partir de dichos gametos.

El método de la invención, que se denomina en la presente memoria "Mapeado de Progenie Inverso" o "RPM", se basa en el uso de gametos, en particular esporas, que se forman debido a una anomalía en la segunda división de la meiosis, denominada Restitución de Segunda División o SDR (del inglés "Second Division Restitution") y consecuentemente dichas esporas son diploides (cuando la planta progenitora también es diploide) al contrario que las esporas normales que son haploides. Dichas esporas se denominan esporas SDR-0 y las plantas generadas a partir de las mismas son plantas SDR-0.

La restitución de segunda división es solo un caso de una clase más amplia de dichas esporas/gametos no reducidos. Veilleux R, ((1985) *Plant Breeding Reviews* 3, 253-288), describe los mecanismos mediante los cuales se forman los gametos no reducidos y proporciona una lista de la aparición de gametos no reducidos en plantas de cultivo. En ese momento, se reconocieron principalmente 2 clases diferentes de gametos no reducidos, a saber Restitución de Segunda División (SDR) y Restitución de Primera División (FDR). Recientemente, se ha publicado una tercera clase de gametos no reducidos denominada Restitución Meiótica Indeterminada (IMR) (Lim K et al. (2001) *Theor. Appl. Genet.* 103: 219-230). Para el propósito de esta invención solo es relevante la SDR. Otra publicación que muestra que la SDR es un fenómeno natural y extendido es Lim K et al. (2004) *Breeding Science* 54: 13-18.

Debido al cruce durante la meiosis I los cromosomas de las esporas SDR-0 pueden presentar segmentos que sean heterocigotos. En el contexto de la presente invención, heterocigocidad significa que los alelos de un gen de la planta híbrida inicial son polimórficos, mientras que homocigocidad significa que los alelos de un gen son idénticos.

Cuando las esporas producidas a través de SDR son regeneradas, se obtienen plantas diploides de media con un nivel reducido de heterocigocidad en comparación con las plantas obtenidas a través de meiosis y replicación normal (generación F2). Se estima que de media los eventos SDR contienen un 60% de homocigocidad (empezando con plantas híbridas 100% heterocigotas), mientras que para los eventos FDR es un 20%. El nivel real depende del número y posición relativa respecto al centrómero y de los cruces, que se han producido durante el evento SDR específico.

Solo las localizaciones que están ubicadas en los segmentos heterocigotos de las plantas SDR-0 se pueden segregar. La segregación se produce en la siguiente generación, denominada SDR-1. El genotipo que producirá un fenotipo específico en la generación SDR-1 será diferente del genotipo de la generación SDR-0. Sin embargo, los fenotipos en segregación en la generación SDR-1 solo pueden producirse si la planta SDR-0 era heterocigota en un determinado grado. Esto significa que es suficiente con determinar en la generación SDR-0 qué localizaciones son heterocigotas con el objetivo de posicionar las localizaciones responsables del fenotipo de segregación en la generación SDR-1. La identificación y localización de los puntos de ruptura de cruce en las plantas SDR-0 individuales predice, y en consecuencia mapea, la posición de la localización responsable de la segregación de un rasgo fenotípico particular en la progenie SDR-1.

Por tanto, la presente invención se refiere a un método para mapear rasgos en plantas, que comprende las etapas de:

a) proporcionar una población de plantas SDR-0, que surjan cada una de un miembro de una población de gametos no reducidos resultantes de restitución de segunda división, en particular una población de esporas no reducidas;

b) producir poblaciones de progenie SDR-1 de cada una de dichas plantas SDR-0;

c) fenotipar las poblaciones de progenie SDR-1 para identificar rasgos segregadores en cada población de progenie SDR-1;

d) si la progenie segregadora está presente en una población de progenie SDR-1, genotipar la correspondiente planta SDR-0 y comparar el genotipo de la misma con el genotipo de las otras plantas SDR-0 para identificar regiones cromosomales heterocigotas asociadas a la presencia del rasgo segregador identificado en dicha población de progenie SDR-1.

- 5 En una realización específica, la población de gametos no reducidos que dan lugar cada uno de ellos a una planta de la población SDR-0 se obtiene clasificando una población de gametos, en particular esporas, en base al tamaño, la masa o el contenido de ADN, y seleccionando los gametos, en particular esporas, que presenten un mayor tamaño, masa o contenido de ADN como miembros de la población de gametos no reducidos, en particular esporas no reducidas. Los gametos, en particular esporas, pueden clasificarse mediante un citómetro de flujo, una centrifuga, manualmente con un micromanipulador o mediante cualquier otro medio de clasificación.
- 10 El fenotipado de poblaciones de progenie SDR-1 puede llevarse a cabo mediante cualquier método conocido por el especialista en la técnica, y en particular se puede realizar mediante observación visual o mediante análisis del contenido y/o la composición de iones, transcritos, proteínas, metabolitos o combinaciones de los mismos en cada planta SDR-1. El análisis del contenido y/o la composición de iones, transcritos, proteínas, metabolitos, se lleva a cabo, por ejemplo, con tecnologías tales como la ionómica, la transcriptómica, la proteómica, la metabolómica o combinaciones de las mismas.
- 15 Tras fenotipar las poblaciones de progenie SDR-1, se genotipan las plantas SDR-0 que dieron lugar a las poblaciones de progenie SDR-1 que se segregan. El genotipado se puede realizar mediante cualquier método conocido por los especialistas en la técnica. En una realización preferida, el genotipado de las plantas SDR-0 se lleva a cabo a través de un método que revela polimorfismos de ácido nucleico. Se conocen muchas técnicas que revelan dichos polimorfismos, tales como AFLP, RFLP, SNP, SFP, SSR, RAPD. Esta lista de técnicas de marcador molecular se presenta solo a modo de ejemplo y no pretende ser en modo alguno limitativa para la invención.
- 20 De forma ventajosa, la producción de la población de progenie de SDR-1 se lleva a cabo en condiciones variables, en particular variando las condiciones ambientales. Las condiciones ambientales variables se seleccionan entre condiciones de laboratorio y condiciones de campo. Ambos tipos de condiciones se pueden variar adicionalmente en relación a las condiciones climatológicas. De este modo es posible encontrar y mapear rasgos que son visibles fenotípicamente solo en determinadas condiciones.
- 25 En una realización adicional, se mapean los mismos rasgos en diferentes fondos genéticos. De este modo es posible encontrar localizaciones interaccionantes en un fondo genético que no son visibles en otro fondo genético.
- 30 La invención proporciona de hecho la combinación de una población de partida nueva y técnicas de mapeado QTL conocidas. Puesto que el nivel de heterocigocidad de esta población es mucho menor que el de otras poblaciones, el número de plantas que necesitan ser analizadas es mucho menor que en las técnicas existentes. Además, en la realización más básica de la invención, solo es necesario genotipar la planta SDR-0 que da lugar a una población de progenie SDR-1 que segrega para el rasgo que está siendo mapeado, en comparación con una planta SDR-0 cuya población de progenie SDR-1 no segrega para dicho rasgo. La localización responsable para el rasgo subyace entonces en el fragmento de cromosoma heterocigoto presente en la planta SDR-0 de la población de progenie SDR-1 segregativa.
- 35 Se han descrito mecanismos meióticos con un detalle considerable, incluyendo una serie de formas aberrantes, que entre otros han sido denominadas restitución de primera división o FDR y restitución de segunda división o SDR. Ambas formas de meiosis conducen a la formación de gametos diploides debido a la ausencia de la primera o la segunda división celular meiótica, respectivamente. La SDR conduce a la presencia de cromátidas hermanas en esporas/gametos, que por lo tanto son idénticas con respecto a su composición genética excepto para aquellas regiones que son heterocigotas como consecuencia de la recombinación meiótica (y que por tanto eran también heterocigotas en la planta donante, que es la planta que dona las esporas SDR-0).
- 40 En el caso de un único cruce por brazo de cromosoma, el extremo distal de los cromosomas, es decir desde el punto de cruce hacia los telómeros, será heterocigoto mientras que la región cromosomal proximal al punto de cruce, que incluye el centrómero, será homocigota.
- 45 Debido a la re-clasificación independiente de cromosoma durante la meiosis I, las regiones homocigotas de los cromosomas de los eventos SDR contienen información genética derivada del cromosoma heredado paternal o materno y por tanto una población SDR es muy heterogénea. No obstante, una población SDR podría describirse como población que contiene líneas que se asemejan parcialmente a RILs o HIFs heterocigotos, y líneas innatas de retro-cruce (BILs) parcialmente heterocigotas, las últimas con introgresiones en ambos fondos progenitores.
- 50 La existencia de esporas/gametos SDR es en sí misma bien conocida y se ha descrito para varias especies (véase, p.ej., Ki-Byung Lim et al. (2004) *Breeding Science* 54: 13-18; Veilleux R. (1985) *Plant Breeding Reviews* 3, 253-288; Bastiaanssen H. (1997) Marker assisted elucidation of the origin of 2N-gametes in diploid potato (Tesis doctoral) ISBN 90-5485-759-5 (Esta tesis también incluye referencias para muchos cultivos)).
- 55 Hasta ahora las localizaciones complejas no podían ser, o era difícil, localizadas genéticamente con los métodos conocidos por los especialistas en la técnica. La presente invención muestra un método completamente nuevo para preparar poblaciones de mapeado que permitan escanear el genoma completo en busca de localizaciones que

segreguen. El tipo de localización(es) no está(n) limitado(s) a los rasgos poligénicos, ya que la sistemática también se puede aplicar a rasgos monogénicos.

5 La invención proporciona un nuevo modo sorprendentemente sencillo para analizar localizaciones que puedan tener interacciones interdependientes y/o epistáticas. Además, el método no está limitado solo a 2 localizaciones sino que puede aplicarse a numerosas localizaciones que interaccionen, siempre que se pueda medir u observar la segregación intra-línea.

10 La variabilidad inter-línea es bien conocida entre líneas completamente homocigotas (p.ej., haploides dobles), mientras que la variabilidad intra-línea se refiere a la situación en la que un número limitado de caracteres fenotípicos difieren entre plantas individuales de la línea, debido a la segregación de la heterocigocidad remanente en la línea progenitora.

Según la invención, sorprendentemente se ha descubierto que plantas que son regeneradas a partir de esporas que han omitido la segunda división meiótica, denominadas plantas SDR-0, proporcionan un material único para mapear rasgos que incluyen los que son extremadamente complejos, tales como los rasgos que son dependientes de la presencia de localizaciones poligénicas en varias configuraciones alélicas y de efectos tales como la heterosis.

15 La combinación de la identificación, enriquecimiento o inducción de esporas no reducidas del tipo SDR, la subsiguiente regeneración de dichas esporas en plantas (SDR-0) y la caracterización molecular de las plantas SDR-0 (identificación de los segmentos de cromosoma heterocigotos residuales) y la correlación/asociación de dichos segmentos con la segregación para cualquier rasgo o efecto en la generación SDR-1, y la comparación entre las diferentes líneas SDR-0 heterocigotas y su modelo segregacional, permiten mapear e identificar todas las localizaciones que interaccionan o que no interaccionan, tanto poligénicas como no poligénicas.

20 La identificación y la localización de los puntos de ruptura de cruce en plantas SDR-0 individuales predice y en consecuencia mapea la posición de la localización responsable de la segregación de un rasgo fenotípico particular en la progenie SDR-1. Adicionalmente, se realiza automáticamente un mapeado fino dependiendo del número de plantas SDR-0 regeneradas y dependiendo del tamaño del mapa genético.

25 La **Figura 1** muestra la presencia de una meiosis normal para 4 pares de cromosomas de un híbrido completamente heterocigoto y el doblado espontáneo de los cromosomas después de que la división de reducción haya tenido lugar (denominados "correspondientes Haploides Dobles"). En el caso mostrado el cruce ha conducido a la aparición de 2 cromosomas progenitores y 2 cromosomas recombinantes por conjunto. Debido a la combinación de los homólogos individualmente diferentes a partir de los conjuntos de cromosomas diferentes, se pueden producir muchas esporas/gametos diferentes. En la **Figura 1** solo se muestra 3 posibilidades.

30 A partir de dichas "esporas" se generan plantas haploides dobles (DH). La producción de haploides dobles es una tecnología bien establecida (Doubled haploid production in crop plants, Editores: M. Maluszynski, K. Kasha, B. Forster e I. Szarejko. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/Londres, (2003) ISBN 1-4020-1544-5).

35 La **Figura 2** muestra una meiosis del mismo híbrido heterocigoto de la **Figura 1**, pero en la situación en la que no ha tenido lugar la segunda división (es decir, en el caso de Restitución de Segunda División). En este caso particular, se forman esporas diploides, sin embargo al contrario que la **Figura 1** en la que se produjo un doblamiento de cromosoma espontáneo o inducido, la aparición de esporas diploides está originada por la ausencia de la segunda división meiótica. En ambas figuras se han incluido cuatro pares de cromosomas y los homólogos se representan en claro, respectivamente estructuras de tipo varillas oscuras en las que los círculos negros sobre las varillas representan los centrómeros.

40 La diferencia principal entre una planta de haploide doble y plantas SDR diploides se observa claramente en el segmento heterocigoto de los cromosomas de la planta SDR, mientras que la planta DH es completamente homocigota.

45 En este caso teórico, la planta de partida (planta donante híbrido AB) que produjo las esporas haploides a partir de las cuales se formaron los DHs o que produjeron esporas SDR-0, respectivamente, contiene cromosomas homólogos que son completamente heterocigotos. Esto significa que todos los alelos de los genes portados por dichos cromosomas son diferentes. En la práctica, sin embargo, esto es altamente improbable y por lo tanto este caso sirve de ejemplo de la situación heterocigota más extrema.

50 A partir de la **Figura 2** también queda claro que lo que determina la ratio de localizaciones homocigotas frente a localizaciones heterocigotas en el caso de SDR es el grado de intercambio de las cromátidas no hermanas de los cromosomas homólogos debido al cruce. El límite del grado de cruce para cada brazo cromosomal está determinado por la posición del centrómero. Por supuesto también puede producirse el cruce desde el otro extremo del cromosoma y también en este caso hasta el centrómero. El partir de plantas que son un 100% heterocigotas, lo que significa que todos los alelos de los genes portados por los cromosomas son polimórficos, es una situación extrema.

55 En la práctica es altamente improbable que esto ocurra y, por lo tanto, los porcentajes de heterocigocidad de las plantas de partida en promedio serán inferiores.

Nótese también en la **Figura 2** la aparición de plantas SDR que se asemejan a RILs y BILs. En el caso de elementos semejantes a BIL los centrómeros descienden todos de uno y del mismo progenitor original, es decir A o B (véase la **Figura 1**).

5 Las plantas regeneradas a partir de esporas haploides que se originan en un evento meiótico normal en el que el número de cromosomas se ha doblado espontáneamente o por medio de agentes químicos se denominará además DH-0. Las plantas se denominarán SDR-0 en el caso de que el regenerante primario tenga su origen en una espora que resultó de un evento meiótico que carecía de la segunda división meiótica.

10 Las plantas DH-0 cuando se autopolinizan darán lugar a una progenie (DH-1) que es un 100% idéntica genéticamente y que está completamente fijada en todos los alelos. Por tanto, aunque las esporas (gametos) que se forman en las plantas DH-0 se vieron sometidas nuevamente a meiosis y recombinación, no pueden producirse redistribuciones genéticas. Esto significa que esta denominada “línea pura” es inmortalizada debido a que no se puede producir ninguna segregación.

15 Sin embargo, dicha línea pura puede mostrar fenotípicamente apariencias diferentes cuando se cultiva en diferentes condiciones, tal como temperaturas bajas o altas, o por ejemplo en diferentes zonas climáticas. Las diferencias que pueden observarse se deben a una variación ambiental y son válidas para todos los “miembros” de la línea. En otras palabras, no habrá variación “intra-línea”. La diferencia entre plantas de diferentes líneas DH1 descendientes de diferentes plantas DH-0 tiene una base genética y está indicada como variación “inter-línea”.

20 En el caso de SDR se observa una imagen diferente en la generación de SDR-1. Las **Figuras 3A y 3B** muestran la formación de esporas/gametos que se da en la planta que es regenerada del evento SDR-0 3 de la **Figura 2**. Es evidente a partir de la **Figura 3B** que mediante recombinación y combinación se puede producir una panoplia de combinaciones de cromosomas y obviamente el número de combinaciones aumenta al aumentar el número de cromosomas. Para encontrar un elemento similar a BIL (parcialmente heterocigoto) para uno de los dos progenitores innatos, la probabilidad es de $(1/2)^{x-1}$ donde x es el número de cromosomas. Para encontrar un elemento similar a BIL específico (parcialmente heterocigoto) la probabilidad es de $(1/2)^x$. La variación máxima que es observable fenotípicamente depende del grado de heterocigocidad en el material de partida y también del grado de recombinación que tuvo lugar. En la improbable situación de que no hubiera ninguna recombinación, o de que solo la hubiera en regiones homocigotas, el regenerante SDR-0 será equivalente, tanto genotípicamente como fenotípicamente, a un haploide doble (DH-0).

30 La **Figura 4** muestra plantas SDR-0 individuales teóricas (para un cromosoma) que solo difieren en el grado hasta el que tuvo lugar la recombinación. En caso de que se observe segregación para un rasgo o efecto en la generación SDR-1 para SDR-0 C pero no para el caso A y B, entonces se deduce que la región cromosomal responsable de la segregación está localizada entre las posiciones de cruce de B y C. Dependiendo de la disponibilidad de marcadores moleculares y del número de plantas SDR-0 disponibles, las localizaciones responsables de la segregación de fenotipos pueden ser mapeadas de forma muy precisa, y ser asociadas a marcadores moleculares conocidos.

35 Este método de la presente invención se denomina en la presente memoria “mapeado inverso de progenie”. La característica diferenciadora de este método es que usa información de segregación intra-progenie de progenies de plantas de una población de mapeado de plantas progenitoras para llevar a cabo un mapeado QTL. Al contrario que el uso de los medios de progenie, usados a menudo en el mapeado tradicional, el método utiliza la variación de progenie. Usa el contraste entre los individuos que son heterocigotos para una posición cromosómica determinada y los individuos que son homocigotos para dicha posición, independientemente de para qué alelo progenitor. Los métodos tradicionales utilizan el contraste entre los tres estados alélicos de una posición cromosómica (progenitor homocigoto (AA), heterocigoto (AB); progenitor homocigoto (BB)), poniendo el énfasis en el contraste entre los dos estados homocigotos.

45 En otra realización, el mapeado inverso de progenie se puede combinar con métodos de mapeado inter-línea regulares para aumentar la potencia de la detección QTL.

En una realización adicional, se pueden usar fenotipos de planta SDR-1 individuales en una estrategia de modelo de mezcla general (Jansen RC (1992) *Theor. Appl. Genet.* 85: 252-260), donde los tres posibles estados alélicos son modelados para cada individuo SDR-0, que es heterocigoto en una posición cromosómica analizada.

50 Alternativamente, es posible usar la varianza de línea SDR-1, por ejemplo para calcular una ratio de probabilidad adicional, que puede multiplicarse por la ratio de probabilidad regular, para el mapeado inter-línea, para obtener una estadística del ensayo mejorada.

Alternativamente, es posible usar la varianza de la línea SDR-1, por ejemplo para calcular una ratio de probabilidad adicional, que puede ser multiplicada por la ratio de probabilidad regular, para el mapeado inter-línea, para obtener una estadística del ensayo mejorada.

55 En otra realización, es posible usar simplemente la puntuación para la presencia o ausencia de segregación en una línea SDR-1. También en este caso se puede calcular una ratio de probabilidad adicional.

Los ejemplos anteriores no excluyen otras posibilidades para combinar el uso de segregación intra-línea e inter-línea de la invención con otra técnica de mapeado QTL.

Existen unas condiciones determinadas en las que el método de mapeado inverso de progenie funciona de manera óptima. En una realización preferida, el rasgo para el cual deberían mapearse los QTLs es segregativo solo en parte de las líneas SDR-1, preferiblemente entre el 50 y el 80%. Esto significa que para determinados rasgos poligénicos, para los cuales un número mayor de QTLs son segregativos en la población, se requiere un menor nivel de heterocigocidad. Si es necesario, esto se puede lograr mediante cultivo adicional en el caso de HIFs, o en el caso de SDR, mediante una segunda ronda de SDR, donde cada SDR-0 individual se usa para producir una nueva planta SDR-0, dando como resultado la denominada población SDR²-0. Debe tenerse cuidado en que el tamaño poblacional sea suficientemente grande para tener todo el genoma completo representado en un estado heterocigoto.

Según la presente invención, el Mapeado Inverso de Progenie (RPM, del inglés "Reverse Progeny Mapping") basado en SDR-0 combina las características ideales de líneas haploides dobles en el registro fenotípico y la posibilidad de establecer el efecto de localizaciones heterocigotas individualmente y en interacción con otras localizaciones heterocigotas u homocigotas.

Como ya se ha mencionado anteriormente, las líneas SDR son diferentes de las líneas DH en aquellas regiones cromosomales en las que son heterocigotas como consecuencia de la heterocigocidad en el material de partida, y debido a la recombinación en dichos segmentos heterocigotos. Esto significa que para todos los demás segmentos, las líneas SDR se asemejan a líneas DH. Esto significa que a un nivel fenotípico la segregación dentro de la línea se observa solo para un número de características limitado. No obstante, se pueden registrar las clases fenotípicas que requieren heterocigocidad de localizaciones específicas. Por ejemplo, si una localización que determina un rasgo específico es heterocigoto en la generación SDR-0, puede proporcionar una segregación Mendeliana tradicional de 1:2:1 (AA:Aa:aa) en la generación SDR-1 dependiendo de la posición de recombinación de la segunda ronda de formación de gametos. Si el fenotipo Aa es diferente de AA y aa, entonces se puede registrar todavía.

En el caso teórico de que una determinada localización tenga que estar en un estado heterocigoto para tener un cultivo rápido, las líneas SDR-1 que descienden de plantas SDR-0 que tienen dicha localización en un estado heterocigoto presentarán una segregación 1:1 de crecimiento más rápido frente a crecimiento normal, siempre que la segunda ronda de recombinación no cambiara la posición de recombinación de la planta SDR-0. Esto es un ejemplo claro de la aplicación de "variación intra-línea" en las líneas SDR-0, en oposición a la "variación inter-línea" que se produce entre líneas DH-1.

Nuevamente, la segregación para la característica de "crecimiento rápido" se puede explicar por la presencia de segmentos heterocigotos en la generación SDR-0. Así que es suficiente con analizar genéticamente la generación SDR-0 para explicar y mapear que ocurre fenotípicamente en la generación SDR-1.

La potencia del método de la invención también queda demostrada por el hecho de que puede explorarse la interacción entre localizaciones independientes. Como ejemplo, se considera una planta en la que una localización debería ser homocigota recesiva (aa) mientras que las dos otras localizaciones deberían ser heterocigotas para mostrar el rasgo de interés. En este caso, no se producirá segregación para el rasgo de interés si la generación SDR-0 era AA. Pero si la generación SDR-0 era aa entonces el rasgo todavía se puede segregar para las otras localizaciones. Tales efectos, denominados epistáticos, son difíciles de estudiar especialmente si el rasgo también es dependiente del entorno.

La ventaja del registro fenotípico de poblaciones DH queda anulada por la falta de segregación dentro de la línea, y por la falta de heterocigocidad de plantas DH. Sin embargo, una población F2 mostrará la segregación deseada del rasgo, pero el análisis está dificultado por el hecho de que el genoma completo es segregativo, produciendo cada uno de los individuos F2 con un fondo genético diferente. Esto genera un gran ruido estadístico que disminuye la potencia de detección del efecto QTL epistático. Además de lo anterior, la planta F2 solo puede ser fenotipada una vez, lo que introduce un gran error medioambiental. La posibilidad de replicar una línea DH en diferentes entornos y registrar las diferencias fenotípicas varias veces, es una gran ventaja para obtener un mapeado QTL fiable.

Lo mismo es cierto con el método de la invención. Cuando se producen suficientes semillas a partir de las líneas SDR-0 para permitir la evaluación de la misma generación SDR-1 en diferentes condiciones, se pueden registrar no solo las localizaciones que contribuyen a un estado homocigoto sino también las localizaciones que actúan diferente en un estado heterocigoto. Adicionalmente, el registro es posible para interacciones epistáticas entre localizaciones tanto heterocigotas como homocigotas, y por supuesto para localizaciones monogénicas que codifican cualitativamente o rasgos cuantitativos. Esto supone una clara ventaja sobre las técnicas existentes.

Las distancias de mapa en cromosomas se expresan en centimorgan (cM) como es bien conocido por los especialistas en la técnica. En un intervalo de 100 centimorgan, de media se produce un cruce por cromátida (Van den Berg J et al. (1997) páginas 334-396 en: *Plant molecular biology – a laboratory manual*, Editor M. Clark, Springer Verlag, Berlín). Esto significa que si uno está buscando mapear un rasgo que está posicionado a 1 cM del

centrómero, hay 1 de 50 recombinantes que tiene un cambio de cromátida hasta un 1 cM del centrómero. Esto se aplica, por supuesto, a ambos lados del centrómero.

En la **Tabla 1** se resumen las ventajas y desventajas de usar determinados tipos de población para el mapeo QTL. La mayoría de ellas han sido mencionadas anteriormente; y si no, se incluyen en la tabla. A partir de la tabla es evidente que en comparación con otras poblaciones, crear poblaciones basadas en SDR requiere un tiempo y unos recursos limitados, con la perspectiva de resultados marcadamente buenos. De este modo, la estrategia SDR combina las ventajas de las poblaciones haploides dobles (DH), es decir un rápido desarrollo poblacional con un coste limitado, con el potencial del mapeo QTL para familias innatas heterogéneas (HIFs), es decir un fenotipado fiable, una fuerte potencia de detección de QTLs, que incluyen sus efectos heterocigotos y epistáticos, y el potencial para un mapeo fino.

Tabla 1. Visión global de los esfuerzos requeridos para crear y usar varios tipos de población para el mapeo QTL y los resultados potenciales. Esfuerzos (costes/marco temporal): *: muy limitados, **: limitados, ***: medios, ****: grandes, *****: muy grandes; Resultados (excepto para: estimación de efecto QTL para heterocigotos): --: muy pobres, -: pobres, =: moderados, +: razonables, ++: buenos, +++: muy buenos; Resultados (solo para: estimación de efecto QTL para heterocigotos): -: imposible, =: posible, +: bueno. BCx: población de retro-cruce tras x ciclos de retrocruzado; RIL: líneas innatas recombinantes; HIF: familias innatas heterogéneas; BIL: líneas innatas de retro-cruce; DH: líneas de haploide doble; SDR: líneas derivadas de restitución de segunda división.

TIPO DE POBLACIÓN	ESFUERZOS				RESULTADOS					
	Trabajo para producir la población	Tiempo para producir la población	Número de marcadores requeridos (mapeado aproximado)	Tamaño de población requerido (mapeado aproximado)	Número de alelos QTL por localización	Fiabilidad de fenotipo	Potencia de detección de QTL	Estimación de efecto QTL para heterocigoto	Mapeo fino (número de recombinaciones y/o heterocigocidad residual)	Análisis de epistasias
F2	**	**	*	*	2	-- ^{6,8}	-	=	-	+
BCX	***/ ³ *****	***/ ³ *****	*/ ³ **	** ⁵	2	=	+	+	=	-
RIL	****	****	***	*	2	++ ⁷	++	-	+	++ ¹²
HIF	*****	*****	***	*	2	+ ⁸	++	+	++	+++
BIL ¹	*****	*****	**	*	2	++ ⁷	++	+ ⁹	++ ⁹	-
DH	***	**	*	*	2	++ ⁷	++	-	-	++ ¹²
SDR	***	**	*	*	2	+ ⁸	++	+	++	+++
aleatorio ²	*	*	**** ⁴	***	>=2	++ ⁷	=	+ ¹⁰	-/ ¹¹	=

¹ Véase por ejemplo: Jeuken MJW, Lindhout P (2004): *The development of lettuce backcross inbred lines (BILs) for exploitation of the Lactuca saligna (wild lettuce) germplasm*; Theor. Appl. Genet. 109(2): 394-401.

² Poblaciones de líneas de cultivo, variedades, accesos de banco genético, usados para, p.ej., mapeo LD.

³ El esfuerzo aumenta con el número de generaciones de retrocruce (x).

⁴ Se requiere un número elevado de marcadores para haplotipar alelos múltiples.

⁵ Se requiere un número mayor de cobertura de genoma suficiente, especialmente en generaciones de retrocruce superiores.

⁶ El fenotipado de línea F3 es más fiable que el fenotipado de planta F2.

⁷ Replicación ilimitada posible.

⁸ Replicación limitada posible, dependiendo de la cantidad de semillas por línea.

⁹ Posible vía cruce con progenitor recurrente.

¹⁰ Solo en caso de híbridos.

¹¹ Dependiendo del grado de desequilibrio de enlace en la población.

¹² Solo interacciones QTL entre localizaciones homocigotas.

Zhang X et al. ((2002) *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 78(1), 84-88) descubrieron que en la pimienta la frecuencia de gametos SDR 2n (polen) podría aumentarse desde <1% hasta un 10,5% (promedio) mediante 48 horas de exposición de las plantas a 11°C. Se determinó que la aparición máxima de SDR era del 81,3%. Este método puede usarse según la invención para aumentar el número de eventos SDR y de este modo el número de gametos SDR-0.

Además de la aparición espontánea de SDR o la inducción de un aumento en el número de eventos SDR-0 por estrés medioambiental, se proporcionan diferentes estrategias genéticas, que permiten la interferencia con las funciones genéticas implicadas en la segunda división celular de la meiosis. Dicha interferencia puede producirse a través de mutagénesis o de transgénesis. Las estrategias transgénicas están dirigidas a la introducción estable o transitoria de un fragmento de ADN que modifica la segunda división de meiosis que conduce a esporas diploides del tipo SDR. La modificación se puede producir a través de la interferencia con factores genéticos implicados en

procesos meióticos, especialmente los implicados en la segunda división celular. La interferencia puede establecerse a través de la regulación a la baja específica de la expresión génica en base a un silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS). El PTGS se puede alcanzar a través de interferencia de ARN (ARNi) o silenciamiento génico inducido por virus (VIGS). Las técnicas para ello son bien conocidas en el estado del arte.

- 5 En otra estrategia adicional, la interferencia se puede establecer a través de la sobre-expresión de proteínas, que ejercen un efecto negativo dominante sobre la segunda división de meiosis que conduce a SDR.

Por tanto, en una primera realización de la invención, la población de gametos SDR-0 no reducidos es producida por una planta seleccionada para mostrar una restitución de segunda división por encima de la media. Alternativamente, la población de gametos SDR-0 es producida por una planta que está modificada genéticamente para mostrar una restitución de segunda división por encima de la media. La modificación genética es transitoria o por incorporación estable en el genoma de un elemento genético que aumenta el número de eventos de restitución de segunda división en la planta.

En una realización adicional, la población de gametos SDR-0 no reducidos es producida por una planta que está sometida a estrés ambiental para mostrar una restitución de segunda división por encima de la media. Los ejemplos de estrés ambiental son estrés por temperatura, NO₂, óxido nitroso N₂O, o combinaciones de los mismos.

15 También se describe en la presente memoria el uso de una población de mapeado que puede obtenerse mediante las etapas de:

a) proporcionar una población de plantas SDR-0, en particular plantas que procedan cada una de un miembro de una población de gametos no reducidos resultantes de restitución de segunda división, en particular una población de esporas no reducidas; y

b) producir poblaciones de progenie SDR-1 de cada una de estas plantas SDR-0;

para mapear uno o más rasgos en una especie.

Independientemente de la estrategia elegida, es necesario conocer el gen diana a nivel molecular. Se ha descrito una serie de mutantes recesivos de la patata (pcpc, osos, fcfc) y del maíz (elongado), que dan como resultado un tipo de meiosis SDR. Los genes, que han sido mutados en estos ejemplos específicos, aún no han sido identificados a nivel molecular pero son candidatos excelentes para lograr SDR en especies diana usando tecnologías de supresión molecular aunque aún no hayan sido clonados. La presente invención se refiere al principio general de mapeado inverso de progenie y el hecho de que no todas las realizaciones posibles para inducir SDR en una planta donante hayan sido descritas no es relevante para la invención.

30 Se pueden encontrar alternativas 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 han sido descritos en *Arabidopsis thaliana* y que tras mutación conducen a una meiosis aberrante. Los productos meióticos diploides en estos mutantes son de tipo SDR y por tanto DUET y CYC1;2 así como sus homólogos funcionales en otras especies vegetales son genes diana candidatos para alcanzar la meiosis SDR.

35 Otro gen diana candidato es TETRASPORE/STUD (Yang et al. (2003) *Plant J.* 34, 229-240), que tras bloqueo conduce a la ausencia de división celular tras meiosis. Los regenerantes diploides de las microesporas de un mutante de tetraespora/criadero pueden ser de tipo SDR.

La aparición de esporas o gametos 2n no está restringida al gametofito masculino, sino que también hay evidencias de que se produce a nivel de gametofito femenino. Zagorcheva L (1976) publicó la aparición de desviaciones de macroesporo-y macrogametogénesis en el pepino, véase: *Macrosporgenesis and macrogametogenesis* ((1976) *Genetics and Plant Breeding* 9(5), páginas 386-399).

Adicionalmente, preparando haploides y haploides dobles en pepino según el documento EP 0 374 755 los inventores observaron usando análisis AFLP (llevado a cabo según EP 0 534 858) que entre los haploides dobles esperados, un determinado porcentaje no procedía de megaesporas haploides sino de una megaespora no reducida (2n). Esto se demuestra en las **Figuras 5, 6 y 7**.

La **Figura 5** muestra estructuras AFLP de una línea F2 típica en el pepino. Cada línea horizontal representa 1 planta individual. Cada columna vertical representa un grupo de enlace. Los segmentos gris claro representan áreas heterocigotas, mientras que las áreas negras y oscuras representan las respectivas áreas homocigotas.

La **Figura 6** muestra el análisis AFLP de líneas DH típicas en el pepino. Cada línea horizontal representa 1 planta individual. Cada columna vertical representa un grupo de enlace. Solo las áreas negras y oscuras están presentes como era de esperar en DH's. Los segmentos gris claro están ausentes.

La **Figura 7** muestra el análisis de AFLP de plantas SDR-0 típicas en el pepino. Cada línea horizontal representa 1 planta individual. Cada columna vertical representa un grupo de enlace. Los segmentos gris claro representan áreas

heterocigotas, mientras que las áreas negras y oscuras representan las respectivas áreas homocigotas. Se deduce a partir de la comparación de las figuras que la heterocigocidad en estas plantas es mucho menor que en la F2 ordinaria.

5 Por tanto, las figuras demuestran que los haploides dobles supuestos originalmente (**Figura 7**) todavía contienen sectores heterocigotos, lo cual por definición no es posible en haploides dobles verdaderos (**Figura 6**). A modo de comparación, la **Figura 5** muestra el análisis AFLP de una población F2 típica.

10 Dependiendo de la cantidad de polimorfismo del material de partida, se pueden obtener esporas/gametos no reducidos, y las plantas de los mismos, que contengan solo uno o un número muy limitado de segmentos heterocigotos. Si se da este caso, existe una relación causal entre el rasgo segregativo de la generación SDR-1 y la posición del segmento heterocigoto, en la planta SDR-0, el mapeado es muy fácil y se puede llevar a cabo un mapeado fino a fin de incluso disminuir el tamaño del segmento heterocigoto mediante métodos conocidos por los especialistas en la técnica.

15 Con el objetivo de obtener gametos SDR, se puede usar una serie de estrategias diferentes. En muchas especies los gametos diploides se producen espontáneamente, tanto en el lado masculino como en el lado femenino, lo que puede ser potenciado mediante condiciones de estrés específicas. La regeneración se puede producir a través de androgénesis, ginogénesis o partenogénesis mediante polinización de pepinillos. Se puede llevar a cabo una optimización mediante polinización usando polen diploide y a través de la determinación del nivel de ploidéz del retoño.

20 Cuando se producen meiocitos SDR a través de meiosis masculina es posible enriquecer para gametos diploides mediante citometría de flujo y clasificación de células activada por fluorescencia. Dichas tecnologías son bien conocidas per se por los especialistas en la técnica y han sido aplicadas anteriormente a microesporas (véase, p.ej., Deslauriers C et al. (1991) *Biochem. Biophys. Acta* 1091, 165-172) pero estas técnicas todavía no se han usado en un método de mapeado de la invención.

25 Las esporas no reducidas o polen son mayores que sus pares haploides. Sorprendentemente, el mero hecho de que las esporas $2n$ son físicamente diferentes de las esporas n hace posible que mediante citometría de flujo se puedan enriquecer específicamente para esporas $2n$. La **Figura 8** muestra el resultado de un experimento en el que se mezclaron microesporas de brócoli procedentes de una planta tetraploide (que producía esporas diploides ($2n$)) con microesporas procedentes de una planta diploide (que producía esporas haploides n). Las esporas más grandes son $2n$.

30 También se describe en la presente memoria un método para el enriquecimiento de una población de células, en particular esporas o gametos, para células SDR, en particular esporas o gametos SDR, que comprende la clasificación de la población de células, en particular esporas o gametos, en base al tamaño, la masa o el contenido de ADN, y seleccionar las células, en particular esporas o gametos, que tienen un tamaño, una masa o un contenido de ADN incrementados como células no reducidas, en particular esporas o gametos no reducidos. También se describe en la presente memoria un método para el enriquecimiento de una población de esporas o gametos para esporas o gametos SDR, método que comprende la clasificación de los miembros de la población de esporas o gametos por medio de un dispositivo de clasificación, en particular por medio de FACS.

35 Las plantas y sus progenies, regeneradas a partir de gametos no reducidos SDR o de tipo SDR, pueden usarse para el propósito de mapear rasgos o efectos poligénicos, para el mapeado de rasgos o efectos cuantitativos, para mapear localizaciones que son interdependientes, para mapear localizaciones que muestran interacciones epistáticas, para mapear efectos como la heterosis, que combinan respectivamente la capacidad y para mapear rasgos mono- o oligo-génicos.

40 Cuando se usa el término "gametos no reducidos" en la presente solicitud se pretende indicar "gametos reproductores no reducidos", tal como esporas.

45 La presente invención se ilustrará adicionalmente en los Ejemplos mostrados a continuación y que no pretenden limitar la invención en modo alguno.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Producción de plantas SDR-0 en maíz por medio de introducción de Elongatel

50 La incorporación de ácidos nucleicos en el genoma de maíz es un procedimiento rutinario y los métodos para lograrlo han sido descritos, p.ej., en los documentos EP-801134, US-5.489.520. La solicitud de patente EP-97114654.3 presenta la transformación de protoplastos de maíz DSM6009.

Elongatel (Barell, PJ y Grossniklaus, U. (2005) *Plant J.* 43, 309-320), una secuencia de ácido nucleico que altera la meiosis dando como resultado la omisión de la segunda división meiótica, se introdujo en maíz usando los métodos

de transformación descritos en las publicaciones de patente anteriores. De este modo, se obtuvieron esporas aberrantes de tipo SDR. La frecuencia de esporas SDR que se forman a veces difería entre transformantes independientes como consecuencia de diferentes sitios genómicos de integración de las secuencias de ácido nucleico transgénicas.

- 5 Las microesporas o megaesporas fueron producidas como consecuencia de un evento SDR que contiene un conjunto diploide de cromosomas. Estas microesporas o megaesporas diploides fueron el material de partida para producir regenerantes SDR-0. Se obtuvieron haploides en maíz de manera rutinaria a partir de microesporas: Pescitelli S y 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*. En: *In Vitro Haploid Production in Higher Plants*, vol. 4, 37-71. Kluwer Academic Publishers. Editores S. Jain, S. Sopory y R. Veilleux.

Alternativamente, las plantas de maíz haploides fueron obtenidas tras polinización natural y artificial con un inductor haploide. En este caso, se obtuvieron semillas que contenían embriones haploides según Rotarenco V (2002) *Maize Genetics Cooperation News Letter* 76: 16.

- 15 Los protocolos anteriores para producir plantas de maíz DH también se aplicaron para producir embriones de maíz SDR-0 a partir de gametos SDR-0, de los cuales se induce la formación por incorporación de Elongatel en el genoma.

A fin de alcanzar el equilibrio apropiado entre el genoma maternal y el paternal a nivel de endoesperma de las semillas SDR-0, preferiblemente se usa la línea inductora como polinizador tetraploide.

20 **EJEMPLO 2**

Producción de plantas SDR-0 en maíz mediante temperatura baja o tratamiento con gas óxido nitroso

La frecuencia de las esporas SDR se potenció mediante tratamiento de plantas de maíz con bajas temperaturas o aplicando gas óxido nitroso como se describe en Kato, A y Birchler, JA (2006) *J. Hered.* 1, 39-44.

- 25 Como consecuencia de la aplicación de bajas temperaturas o de tratamientos con óxido nitroso, se produjeron numerosas microesporas, respectivamente megaesporas, que son de tipo SDR. La población de esporas se enriqueció en relación a la presencia de microesporas SDR usando citometría de flujo o clasificación de células activada por fluorescencia en base al hecho de que las microesporas SDR tienen un mayor tamaño que las microesporas haploides normales. Las microesporas o las megaesporas que fueron producidas como consecuencia de un evento SDR contienen un conjunto diploide de cromosomas. Dichas microesporas o megaesporas diploides son el material de partida para producir regenerantes SDR-0. Los haploides de maíz fueron obtenidos de forma rutinaria a partir de microesporas, tal como se describe en el **Ejemplo 1**.

También se obtuvieron plantas de maíz haploides mediante polinización natural y artificial con un denominado inductor haploide. En este caso, se obtuvieron semillas que contenían embriones haploides según Rotarenco V (2002) (ver anterior).

- 35 Los anteriores protocolos para producir plantas de maíz DH fueron aplicados para producir plantas de maíz SDR-0 a partir de gametos SDR-0, de los cuales se induce la formación mediante los tratamientos especificados en este ejemplo.

Como se ha mencionado en el Ejemplo 1, preferiblemente se hace uso del denominado inductor haploide como polinizador tetraploide con el objetivo de equilibrar los genomas paternal y maternal a nivel de endoesperma.

40 **EJEMPLO 3**

Identificación y caracterización de plantas SDR-0

- 45 Las plantas de maíz SDR-0 de los **Ejemplos 1 y 2** se pueden distinguir de plantas DH (o de plantas FDR (restitución de primera división)) que no sufrieron SDR debido a que son parcialmente heterocigotas pero tienen regiones centroméricas homocigotas. Usando el análisis AFLP como se describe en el Ejemplo 5 para pepino, las plantas de maíz DH-0 que no sufrieron SDR mostrarán un modelo de marcador AFLP sin áreas heterocigotas, mientras que las plantas de maíz DH que han sufrido SDR mostrarán áreas heterocigotas en el modelo de marcador AFLP. Por consiguiente, la construcción de mapa y el análisis estadístico fueron llevados a cabo como se describe en el Ejemplo 5 para el pepino.

EJEMPLO 4

- 50 Análisis de poblaciones SDR-1 y mapeado fino de rasgos en maíz

La progenie de cada una de las plantas SDR-0 que portan regiones heterocigotas en su genoma fue observada en condiciones uniformes y se clasificaron las progenies segregativas según el rasgo que segregaran. Las plantas

5 SDR-0 que conducían a las progenies SDR-1 que segregaban para un rasgo específico se compararon unas con otras y con líneas que no segregan para dicho rasgo. La segregación en la generación SDR-1 puede asociarse con los segmentos heterocigotos del genoma de plantas SDR-0. Esto se verificó por medio un análisis QTL clásico para determinar el intervalo de máxima probabilidad entre los marcadores más flanqueantes y la localización del rasgo. El mapeado fino de la localización responsable de la segregación en la generación SDR-1 se llevó a cabo según Peleman, J et al., (1995) Genetics 171: 1341-1352.

EJEMPLO 5

Producción e identificación de segmentos heterocigotos para mapeado en plantas SDR-0 de pepino

1. *Haploides dobles y plantas SDR-0*

10 Los haploides dobles y las plantas SDR-0 fueron regenerados a partir de una F1 derivada de un cruce entre 2 líneas de pepino homocigotas (puras). Todas las plantas individuales DH y SDR-0 fueron analizadas genotípicamente mediante AFLP.

La producción de haploides dobles y de plantas SDR-0 se llevó a cabo según el documento EP 0374 755.

2. *Análisis AFLP*

15 Los análisis AFLP de plantas DH-0 y SDR-0 se llevaron a cabo como se describe en Vos P et al., (1995) Nucleic Acids Research 23(21): 4407-4414.

Los datos fueron procesados y analizados con Quantar Pro (Keygene, Wageningen, Holanda) permitiendo la puntuación codominante de los marcadores AFLP.

3. *Construcción de mapa y análisis estadístico*

20 Los mapas genéticos fueron calculados usando el paquete de ordenador JoinMap® versión 2.0 (Stam, P., (1993) Plant J. 3: 739-744).

4. *Características de segregación*

Se espera que los siguientes caracteres se segregaran.

- División Apex
- 25 Tamaño de hoja
- Tasa de crecimiento
- Número de frutos por nodo
- Longitud internodo
- Tamaño de flor
- 30 Tamaño de fruto
- Color de fruto

5. *Resultados*

35 La **Figura 10** muestra los resultados del análisis AFLP de plantas SDR-0 y DH-0. Cada línea individual representa una planta DH-0 individual, respectivamente una planta SDR-0. Cada columna representa un grupo de enlace. Se puede realizar una clasificación claramente distintiva entre líneas DH y líneas que portan un segmento heterocigoto (áreas en gris claro). La segregación en la generación SDR-1 de los rasgos mencionados anteriormente se asocia consecuentemente a segmentos heterocigotos.

6. *Mapeado fino*

40 El mapeado fino de la localización responsable de la segregación en la generación SDR-1 se lleva a cabo según Peleman J et al., (2005) Genetics 171: 1341-1352.

EJEMPLO 6

Potenciamiento de la formación de esporas/gametos no reducidos en la pimienta dulce (*Capsicum annuum* L.)

Con el objetivo de incrementar la frecuencia de formación de esporas/gametos no reducidos, se aplicó estrés frío como inductor, exactamente como se describe en Zhang X et al. (2002, ver más arriba).

5 Para este propósito, se expusieron plantas en flor de pimienta dulce, que contenían capullos florales pre-meióticos y cultivados a 23°C, durante 2 días a 11°C. Tras este choque de frío, los capullos fueron recolectados y se extrajo el polen abriendo las anteras con fórceps de disección y escalpelo. El polen se transfirió a continuación a un portaobjetos de vidrio de microscopio y se tiñó para determinar la viabilidad usando una gota de aceto-carmina. Se colocaron cubre-objetos en la parte superior de la suspensión, que fue investigada usando un microscopio óptico.

10 Como control, se recolectó polen de plantas de pimienta dulce que fueron cultivadas a 23°C. La **Figura 9** muestra ejemplos representativos de las morfologías del polen recolectado de las plantas tratadas con frío (**Figura 9A**) frente a las plantas de control (**Figura 9B**). Como puede observarse, el número de polen con un mayor tamaño indicativo de derivar de esporas no reducidas se ve incrementado fuertemente para la planta tratada con frío. En este ejemplo particular, se estimó que el % de esporas agrandadas subió hasta el 25% debido al tratamiento con frío. Por tanto, se demuestra que el potenciamiento de la formación de esporas no reducidas por estrés térmico es altamente posible.

15

REIVINDICACIONES

1. Un método para mapear rasgos en plantas, que comprende las etapas de:
- 5 a) proporcionar una población de plantas SDR-0, que surgen todas de un miembro de una población de gametos no reducidos resultantes de restitución de segunda división, en particular una población de esporas no reducidas;
- b) producir poblaciones de progenie SDR-1 de cada una de dichas plantas SDR-0;
- 10 c) fenotipar las poblaciones de progenie SDR-1 para identificar rasgos segregativos en cada población de progenie SDR-1;
- d) si la progenie segregativa está presente en una población de progenie SDR-1, genotipar la correspondiente planta SDR-0 y comparar el genotipo de la misma con el genotipo de las otras plantas SDR-0 para identificar regiones cromosomales heterocigotas asociadas a la presencia del rasgo segregativo identificado en dicha población de progenie SDR-1.
- 15 2. El método reivindicado en la reivindicación 1, en el que la población de gametos no reducidos que dan lugar a una planta de la población SDR-0 se obtiene clasificando una población de gametos, en particular esporas, en base al tamaño, masa o contenido de ADN, y seleccionando los gametos, en particular esporas, que presenten un aumento de tamaño, masa o contenido de ADN como miembros de la población de gametos no reducidos, en particular de esporas no reducidas.
- 20 3. El método reivindicado en la reivindicación 2, en el que los gametos, en particular esporas, se clasifican mediante un citómetro de flujo, una centrífuga, o manualmente con un micromanipulador.
4. El método reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el fenotipado de poblaciones de progenie SDR-1 se lleva a cabo mediante observación visual o mediante análisis del contenido y/o composición de iones, transcritos, proteínas, metabolitos o combinaciones de los mismos en cada planta SDR-1.
- 25 5. El método reivindicado en la reivindicación 4, en el que el fenotipado se lleva a cabo mediante fenómica, ionómica, transcriptómica, proteómica, metabolómica, o combinaciones de las mismas.
6. El método reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el genotipado de las plantas SDR-0 se lleva a cabo por medio de un método que revela polimorfismos de ácido nucleico.
- 30 7. El método reivindicado en la reivindicación 6, donde el método que revela polimorfismos de ácido nucleico se selecciona entre AFLP, RFLP, SNP, SFP, SSR, RAPD.
8. El método reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la producción de la población de progenie SDR-1 se lleva a cabo en condiciones variables, en particular en condiciones ambientales variables.
- 35 9. El método reivindicado en la reivindicación 8, en el que las condiciones ambientales variables se seleccionan entre condiciones de laboratorio y condiciones de campo, y donde ambos tipos de condiciones varían con respecto a las condiciones meteorológicas.
10. El método reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que la población de gametos SDR-0 no reducidos es producida con una planta seleccionada para mostrar una restitución de segunda división por encima de la media.
- 40 11. El método reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que la población de gametos SDR-0 no reducidos es producida por una planta que es sometida a estrés ambiental para mostrar una restitución de segunda división por encima de la media.
12. El método reivindicado en la reivindicación 11, en el que el estrés ambiental se selecciona entre estrés por temperatura, NO₂, óxido nitroso N₂O, o combinaciones de los mismos.

45

Fig. 1A

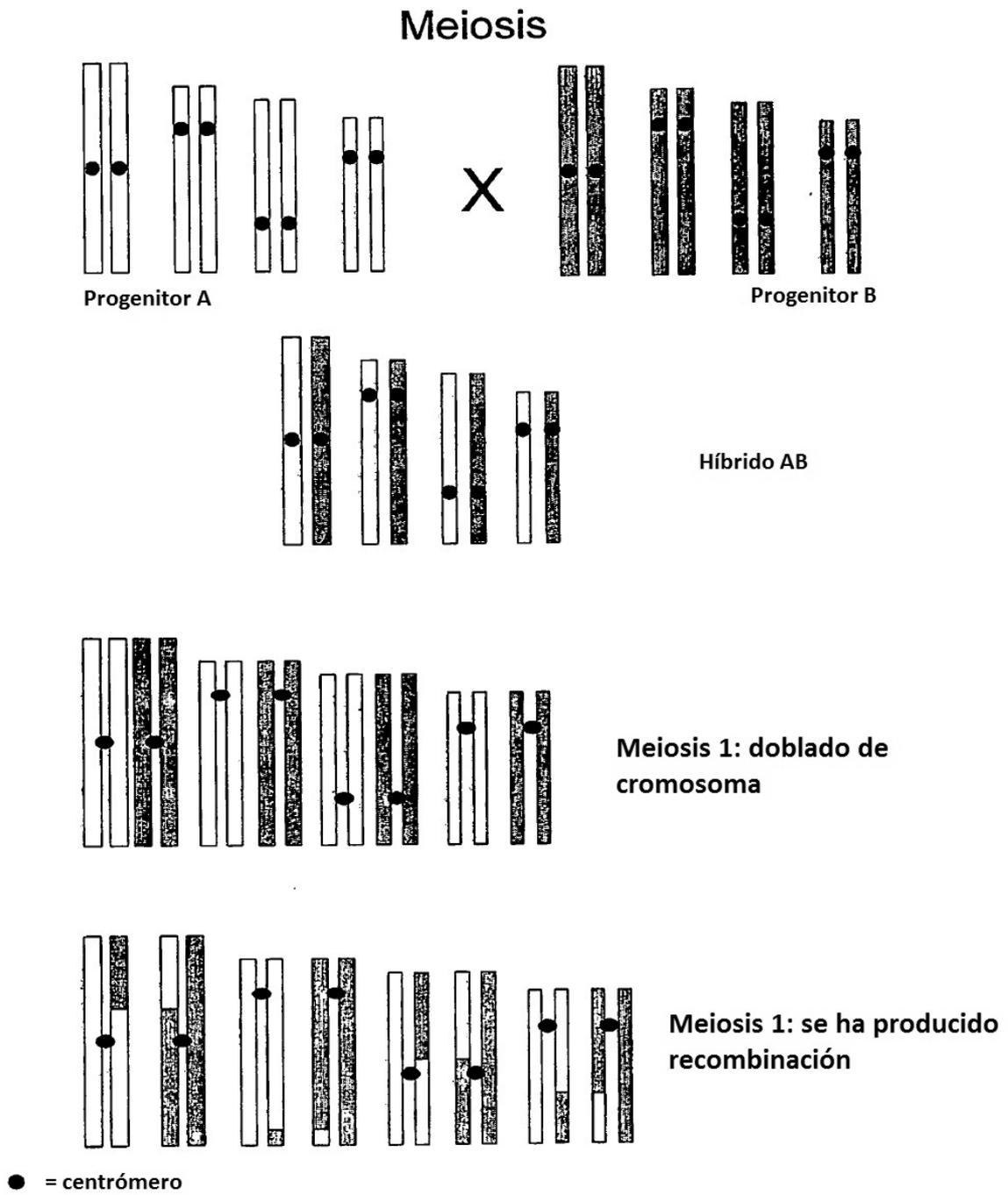
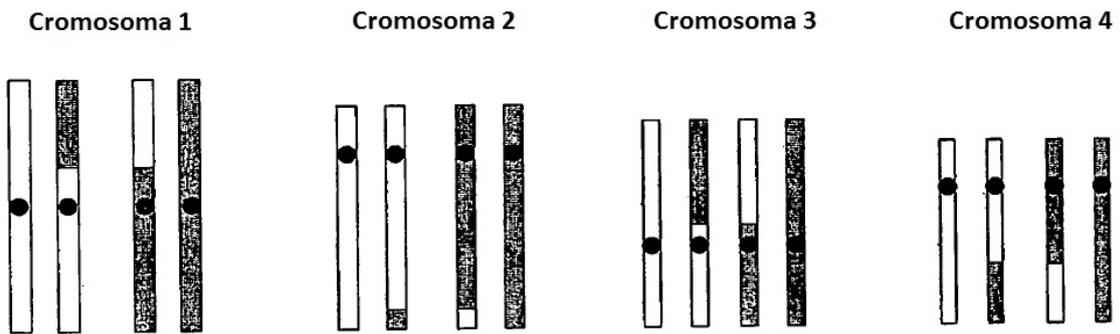


Fig. 1B

Meiosis 2: formación de esporas/gametos



Grupos de cromosomas recombinados/progenitores

3 posibles ejemplos de esporas/gametos



Correspondientes "Haploides Dobles"

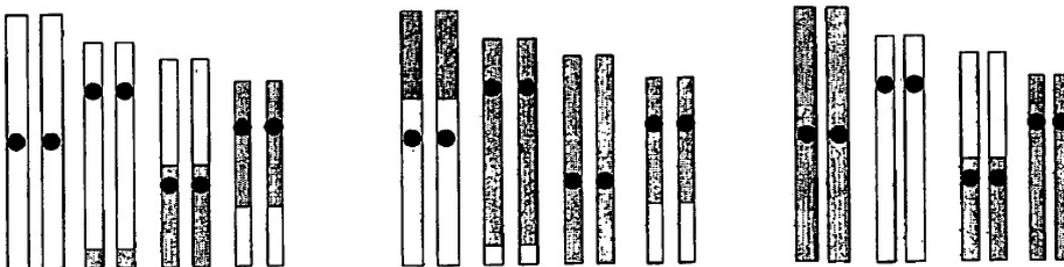
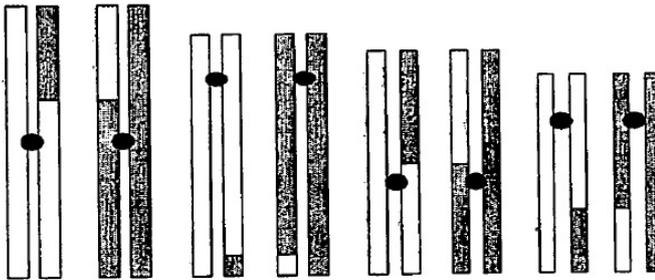


Fig. 2

No se produce segunda división = restitución de segunda división

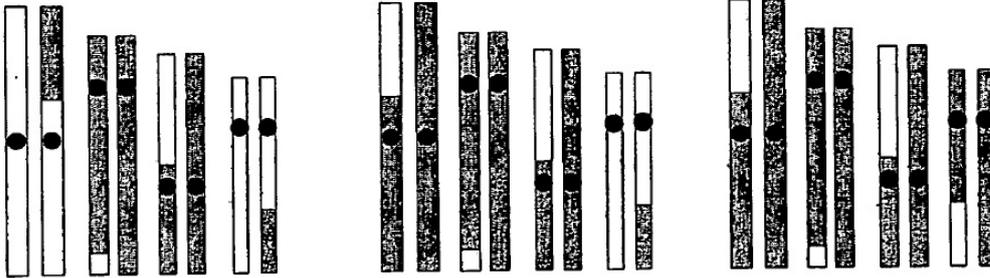


4 ejemplos de esporas/gametos (SDR-0):
nótese la heterociguidad parcial

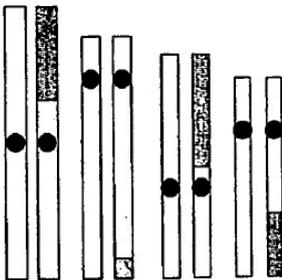
(1)

(2)

(3)



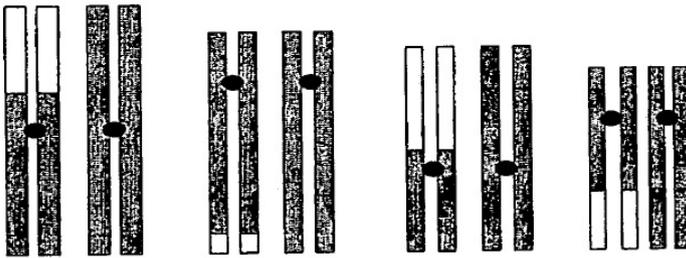
(4)



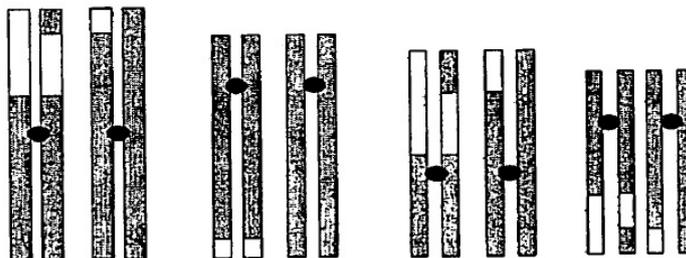
Nótese que en el 3er y 4º ejemplos la constitución básica de los conjuntos de cromosomas derivan de los respectivos progenitores; dichos conjuntos se asemejan a "BIL's" pero en estado heterocigoto. Los Ejemplos 1 y 2 se asemejan a "RIL's" en un estado heterocigoto.

Fig. 3A

(3)



Meiosis 1: doblado de cromosoma



Meiosis 1: se ha producido recombinación

Fig. 3B-1

Gametos posibles procedentes de 1 evento de recombinación de 1 evento SDR

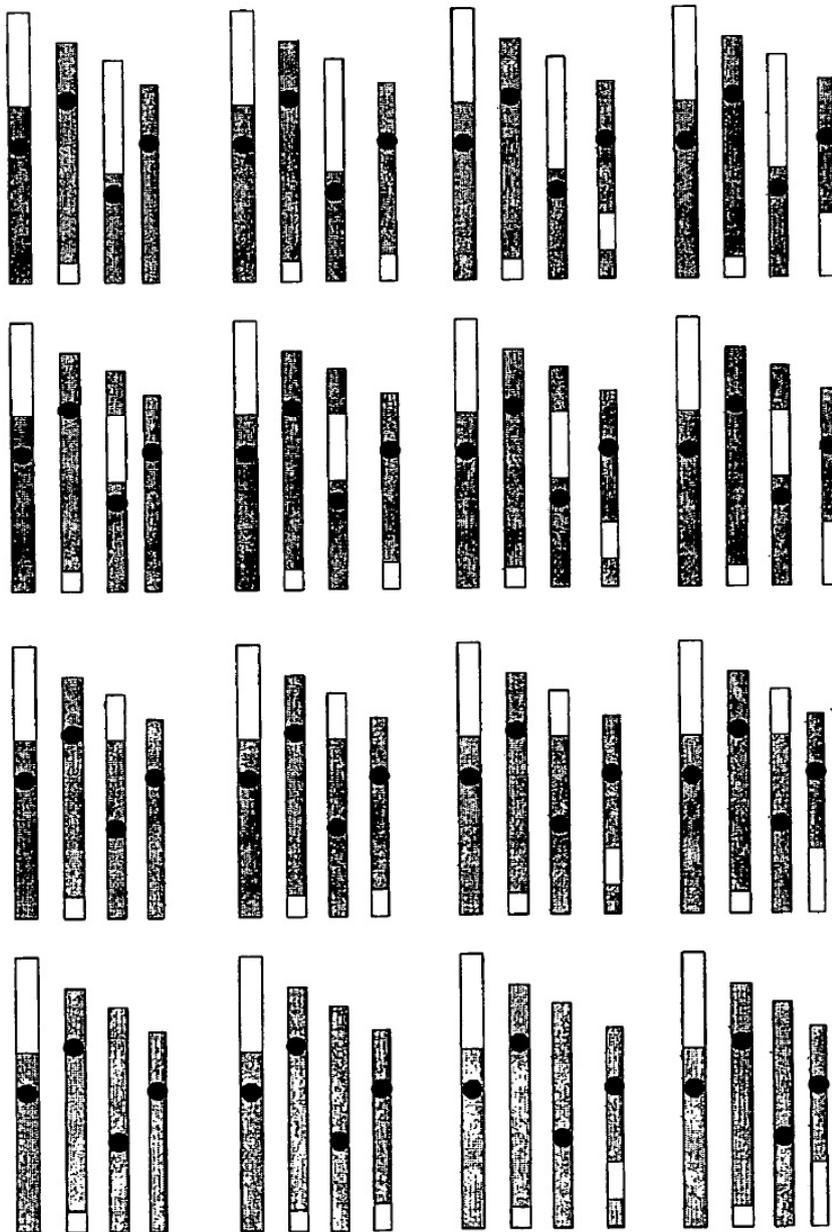


Fig. 3B-2

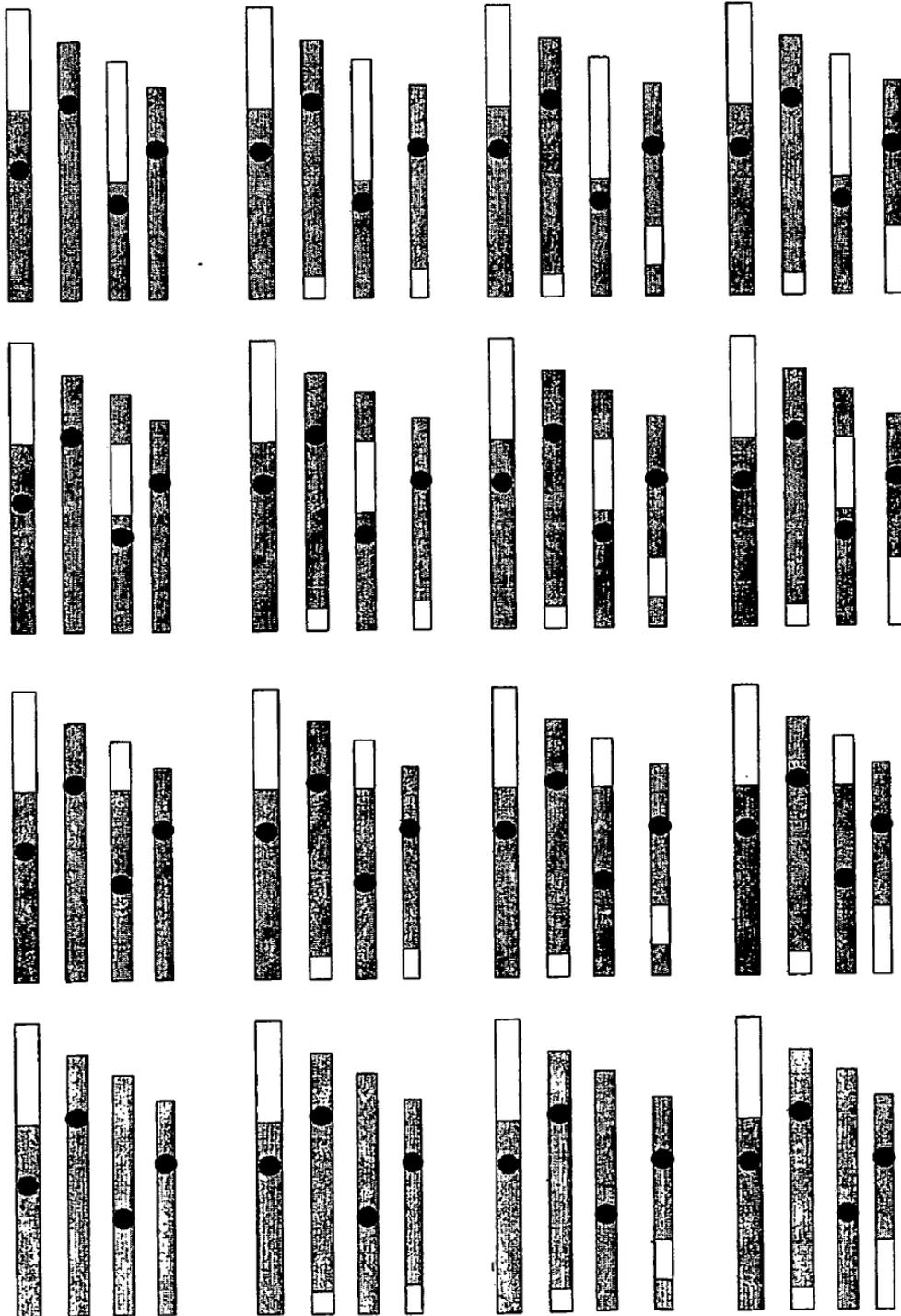


Fig. 3B-3

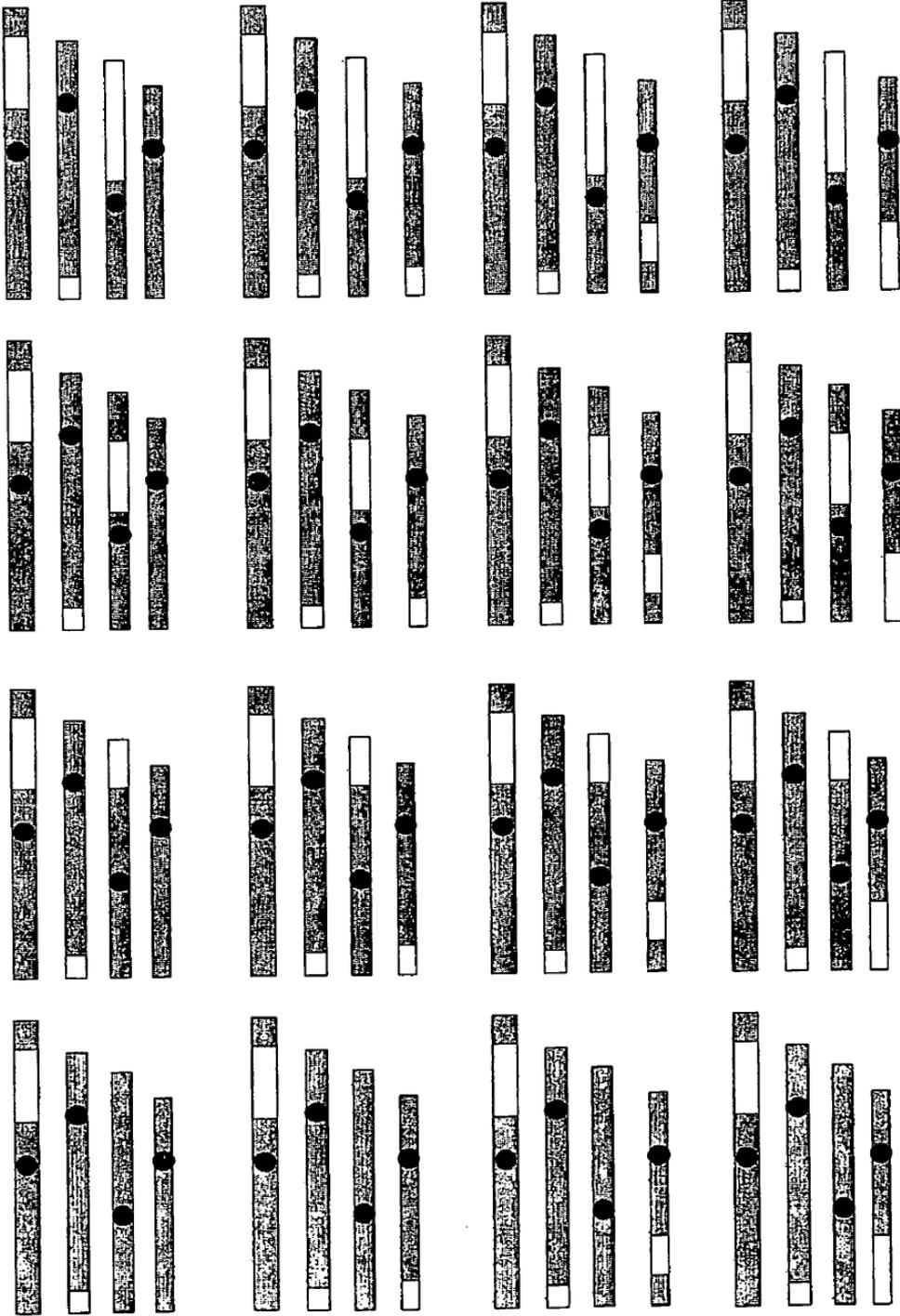


Fig. 3B-4

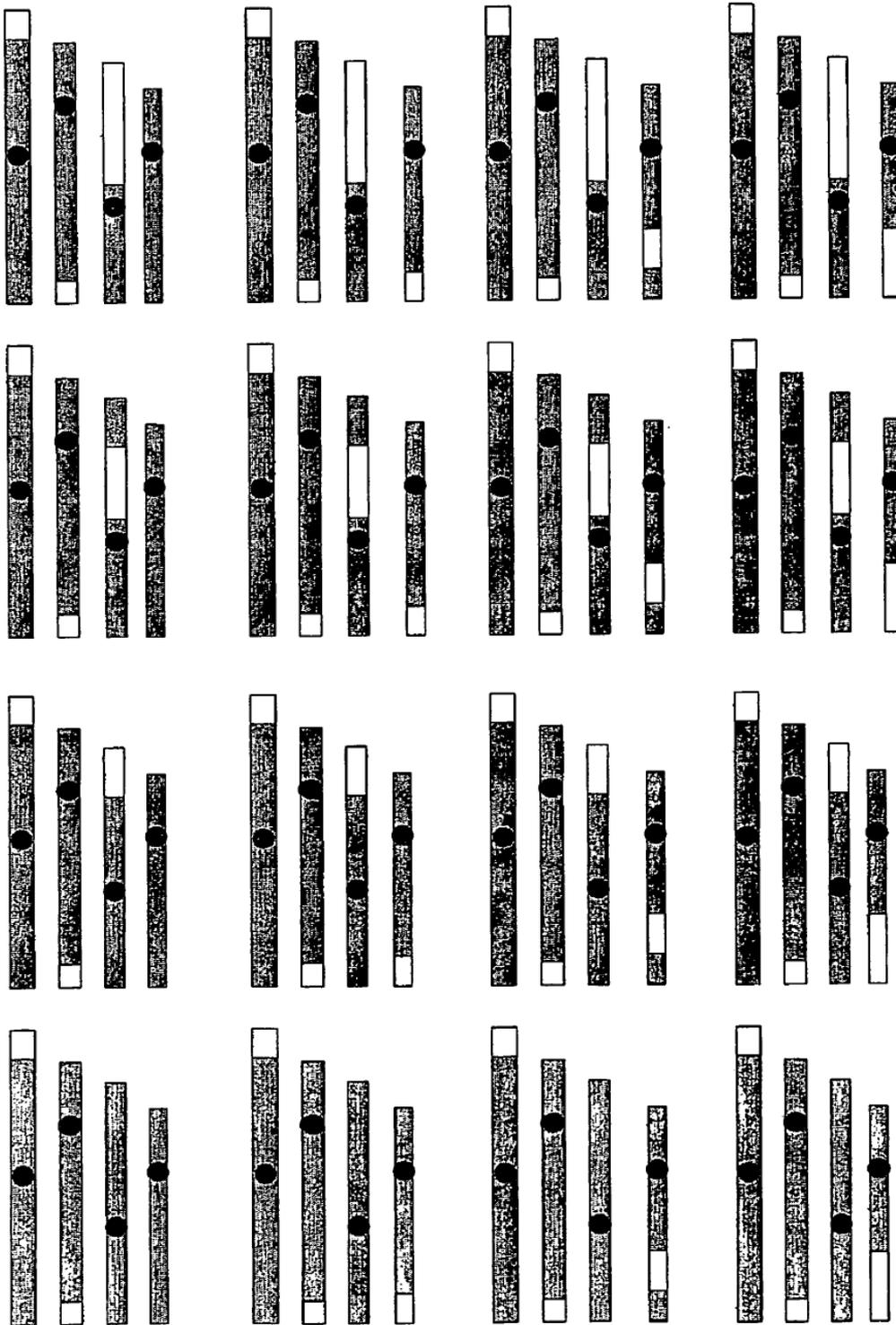


Fig. 3B-5

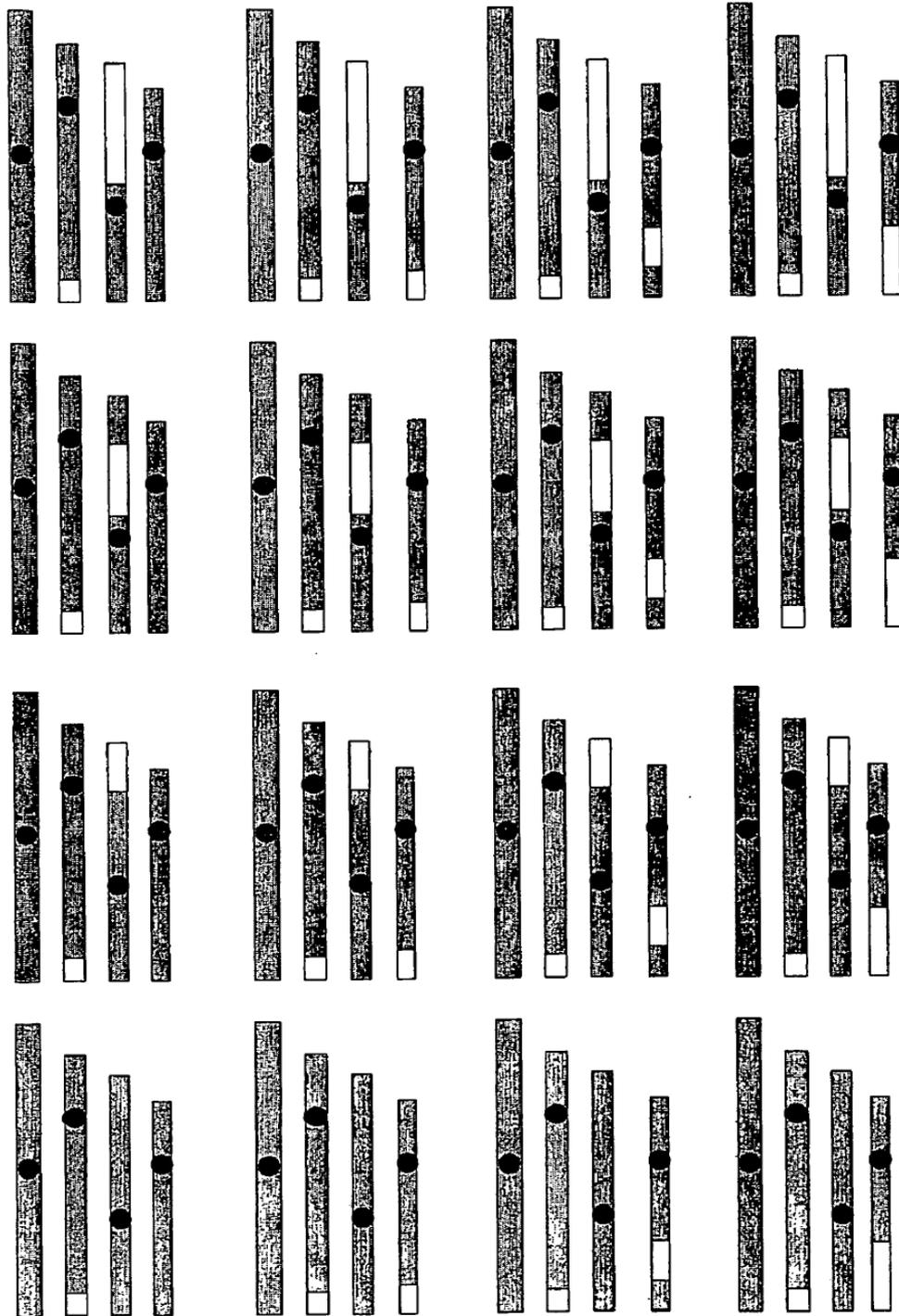


Fig. 4

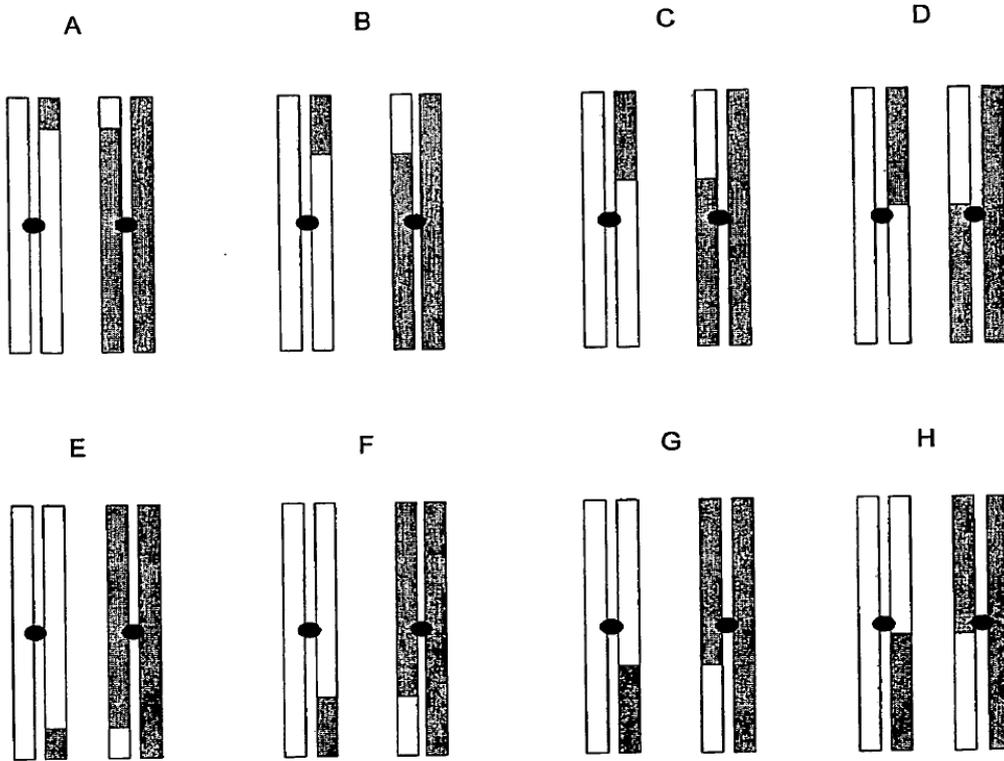


Fig. 5

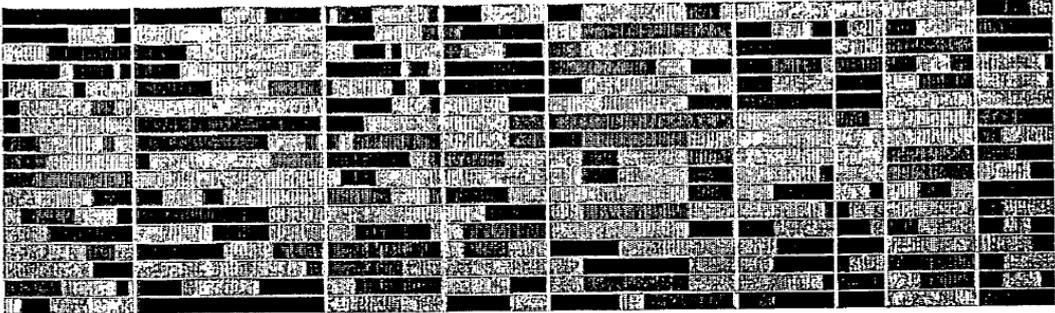


Fig. 6



Fig. 7

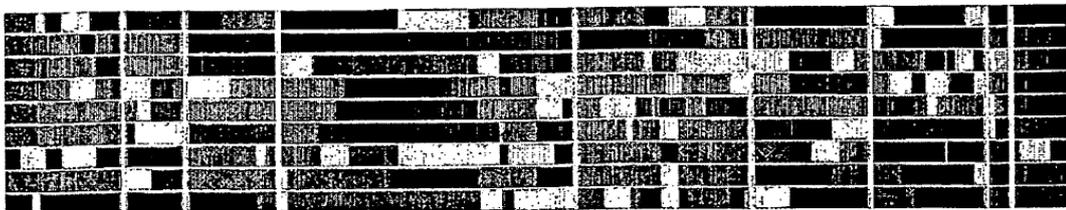


Fig. 8

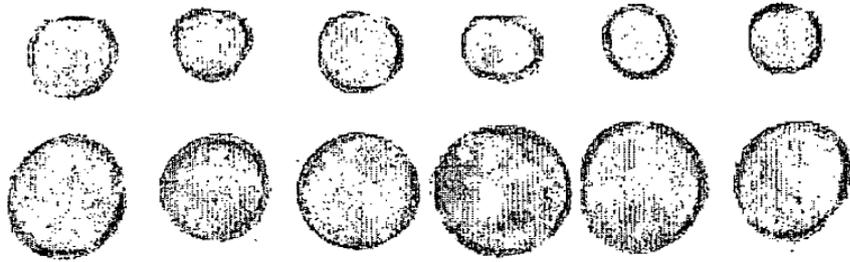


Fig. 9A

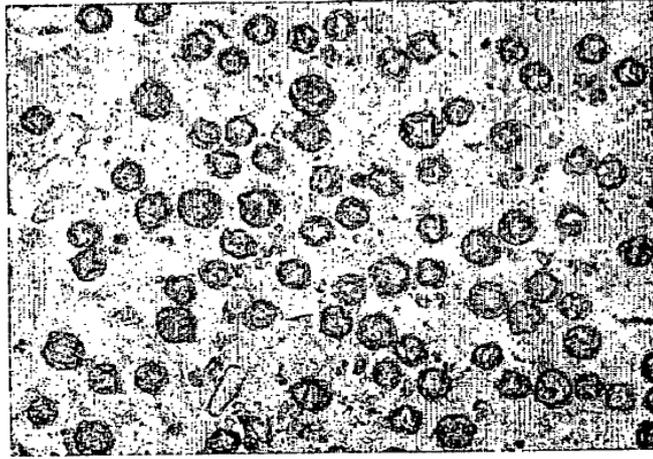


Fig. 9B

