

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 567 290**

51 Int. Cl.:

A01H 5/00 (2006.01)

A01H 5/02 (2006.01)

C12N 15/01 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.08.2012 E 12750554 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.03.2016 EP 2739132**

54 Título: **Método para influir sistémicamente en procesos en el meiocito masculino**

30 Prioridad:

04.08.2011 EP 11176591

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

21.04.2016

73 Titular/es:

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

**Burgemeester Crezeelaan 40
2678 KX De Lier, NL**

72 Inventor/es:

**KRAGLER, FRIEDRICH;
KOLLWIG, GREGOR y
DIRKS, ROBERT, HÉLÈNE, GHISLAIN**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 567 290 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

Método para influir sistémicamente en procesos en el meiocito masculino

Campo de la invención

Esta invención se refiere a un método para interferir con procesos en los meiocitos masculinos de una planta.

5 Antecedentes de la invención

La reproducción sexual es dado argumentos el proceso más fundamental en el ciclo de vida de una planta en florecimiento. Esto proporciona una generación nueva de organismos, y por medio de recombinación (remodelación) de las características genéticas del organismo padre y madre permite la creación de diversidad genética. Esta diversidad en la siguiente generación permite que plantas se adapten, por ejemplo, mejor y más rápidamente a cambios de su medio ambiente biótico y abiótico.

Estudios geológicos han conducido a un entendimiento completo de los procesos y factores que desempeñan papeles importantes en la reproducción sexual de angiospermas. Las etapas esenciales son:

15 - la formación y maduración de gametos masculinos (microsporas, granos de polen) y gametos femeninos (células de huevo en el interior de un saco embrionario dentro de un óvulo) procedentes de meiocitos diploides. La formación de gametos haploides ocurre por medio de dos divisiones meioticas, durante las cuales se recombinan los dos genomas parentales del organismo que produce gametos;

- la polinización (el depósito de gametos masculinos en los órganos reproducidos femeninos (estigma), que puede, por ejemplo, venir mediada por el viento, insectos u otros agentes de polinización especializados, o sencillamente por gravedad, proximidad o mecanismos de polinización activa cuando concierne a especies de autofertilización;

20 - la germinación de granos de polen y la transferencia subsiguiente de núcleos masculinos (células de esperma) hacia células de huevos que se atraen respectiva y químicamente a través de un tubo de polen;

- la liberación de núcleos de esperma en el interior de un saco embrionario receptivo, que conduce a doble fertilización, en la que una célula de esperma se fusiona con la célula de huevo dando lugar a un embrión diploide, y la otra célula de esperma se fusiona con la célula central diploide dando lugar a endosperma triploide;

25 - divisiones mitóticas y patrón de desarrollo del cigoto, que conducen a la formación de un embrión.

Para la finalidad de esta invención la primera etapa es la más importante: la formación de gametos, en particular gametos masculinos, procedentes de meiocitos. En angiospermas los gametos masculinos o microsporas se forman en el interior de anteras. Estos se originan de células madre diploides de polen (un tipo de meiocito) que soportan meiosis, que acompaña a dos ciclos de división meiótica. El resultado final de la meiosis es un conjunto de cuatro microsporas haploides para cada célula madre de polen, y estas microsporas, cada una, se desarrolla más adelante soportando dos divisiones mitóticas. La primera de estas divisiones es asimétrica y da lugar a una célula vegetativa y una célula generativa, mientras que la segunda mitosis se refiere a la división de la célula generativa. El resultado es un grano de polen que contiene dos células de esperma en una constelación única, ya que las células de esperma están ambas localizadas en el interior del citoplasma de la célula vegetativa.

35 La medida del tiempo de la segunda división mitótica varía grandemente en el reino de la planta, y la segunda mitosis de polen puede tener lugar o bien antes de la antesis (como es el caso, por ejemplo, en *Arabidopsis* y el arroz), o después de la antesis durante el crecimiento del tubo de polen (p.ej., en el tomate y el tabaco). Dependiendo de las especies, las flores de angiospermas pueden entonces desprenderse o bien de granos de polen tricelulares (que contienen un núcleo vegetativo más dos núcleos vegetativos) o de granos de polen bicelulares (que contienen un núcleo vegetativo más un núcleo generativo).

45 La división celular meiótica tiene una importancia fundamental durante la formación de gametos, ya que proporciona medios de remodelación de la información genética parental de modo que surgen nuevas combinaciones genéticas, y un medio para "no duplicar" el genoma en gametos haploides. Los meiocitos han recibido una atención de investigación considerable, debido a que si uno pudiera ser capaz de influir en procesos moleculares, fisiológicos y/o de desarrollo que tienen lugar en el interior de un meiocito, podría tener potencialmente un impacto inmenso en la reproducción sexual, sobre la transmisión de material genético a la generación siguiente, e incluso sobre la evolución.

50 Se sabe que en señales de silenciamiento en plantas basadas en RNA se despliegan sistémicamente a distintos órganos, Para el transporte de larga distancia de tales señales basadas en RNA, las plantas que florecen utilizan un sistema vascular especializado denominado floema. El sistema floema facilita la transferencia direccional de moléculas pequeñas tales como iones, azúcares, nucleótidos, hormonas, aminoácidos, y proteínas procedentes de tejidos fuentes (que las producen) a tejidos de inmersión (que las consumen). En muchas especies de plantas se ha puesto de manifiesto que moléculas de polinucleótidos pequeñas (típicamente moléculas de RNA con un tamaño de

18 a 27 nucleótidos), que derivaban de productos génicos específicos, estaban presentes en la savia de floema y se sugería recolocarla siguiendo la corriente de inmersión de la fuente..

5 Se sabe, según la bibliografía, que un recorrido de transporte de larga distancia permite que las plantas induzcan silenciación sistémica de genes post-transcripcionales (PTGS) asociados con moléculas de RNA pequeñas que interfieren (siRNA).

PTGS - asociado con siRNA - se monta de nuevo por un mecanismo desconocido y se reestabiliza en la generación que sigue. Parece que la montura de nuevo de PTGS tiene lugar durante la meiosis y que puede establecerse de nuevo en gametos, como se expone en estudios sobre la actividad de transposón en gametofitos masculinos.

10 Los transcritos de elementos de transposición de diana en siRNAs se activan en el núcleo vegetativo y se transfieren a células de esperma que se fertilizan, donde regulan en descenso la actividad del transposón. De este modo, dentro de los granos de polen y de la fertilización de tubos de polen se activa una maquinaria de silenciación que media por siRNA. El mecanismo de PTGS es también funcional en tejidos esporofíticos, como en otros genes específicos que pudieran ser silenciados. Estudios llevados a cabo con líneas que expresan GFP transgénico, en las que despliegan silenciación asociadas con siRNA, habían sido inducidas por sobreexpresión de transcritos que
15 contienen secuencias de GFP, sugirieron el despliegue sistémico de señales de siRNA en tejidos sumergidos fuertemente tales como hojas que se forman nuevamente.

Sin embargo, parece que no todos los tejidos sumergidos puedan recibir señales de PTGS. Se ha indicado que la silenciación sistémica de GFP por medio de siRNA era muy limitada en yemas de flores en crecimiento, y que la silenciación de GFP en los tejidos meióticos (esporogénica) de anteras o carpelos nunca había sido observada.

20 En la técnica anterior se ha supuesto así que los meiocitos son inaccesibles para señales móviles de larga distancia, y que existe una barrera que protege las microsporas futuras en sus etapas preliminares de desarrollo.

En la investigación que condujo a la presente invención se encontró, no obstante, cuantos meiocitos pueden ser seleccionados como blanco con señales de polinucleótidos sistémicos procedentes de un rizoma transgénico, sin hacer transgénico el retoño injertado sobre él (vástago), o los meiocitos o microsporas producidos por el vástago, o
25 plantas que derivan de esas microsporas.

Los presentes inventores han encontrado cómo interferir con procesos (moleculares) en los meiocitos masculinos, por medio de las señales de polinucleótidos citadas, que son transportadas a los meiocitos masculinos como una señal sistémica.

30 En la técnica anterior se sabe también que la sobreexpresión de construcciones de RNAi con promotores constitutivos puede conducir a la silenciación de expresión génica en los meiocitos masculinos (Dirks R. et al., 2009, *Plant Biotechnol J* 7: 837-845; Reverse Breeding: WO03/017753). Sin embargo, un inconveniente considerable des este enfoque es el hecho de que el organismo que produce los meiocitos masculinos, así como al menos el 50% de las microsporas producidas después de meiosis, son transgénicas. Por razones reguladoras, de eficacia y prácticas es muy deseable desarrollar un método para producir plantas sin transgeno a partir de esporas que se originaron de
35 meiocitos en los que han sido interferidos procesos de recombinación molecular. Tales microsporas pueden emplearse, p.ej., para la producción de plantas haploides con doblez (DHs) sin transgeno.

La técnica anterior describe varios métodos para la producción de plantas haploides a partir de microsporas, tales como el cultivo de microsporas *in vitro* (regeneración de plántulas haploides procedentes de microsporas, y doblez del genoma subsiguiente con p.ej., colchicina), y el método descrito en WO2011044132, que incluye la polinización de una línea inductora de haploides, que después de fertilización elimina los cromosomas maternos procedentes del cigoto, conduciendo a la formación de semillas viables que contienen un embrión haploide que es genéticamente idéntico a la microspora utilizada para la polinización y fertilización.

40 En la investigación que condujo a esta invención se encontró de este modo, sorprendentemente, que señales de siRNA, generadas en un rizoma maduro, pueden penetrar sistémicamente y ser activas en células esporogénicas apicales, en particular meiocitos. Esto se demostró injertando un vástago no transgénico en un rizoma transgénico que acoge una construcción de RNAi y produciendo moléculas de siRNA, y observando fenotipos de silenciación de genes en los meiocitos masculinos formados por el vástago no transgénico. Tales moléculas de siRNA sistémicas que hacen diana en tejido meiótico pueden afectar de este modo a la expresión génica de la progenie.

45 Las moléculas de siRNA, generadas a partir de la construcción de RNAi en el rizoma transgénico, pueden así ser transmitidas a lo largo de un transporte a larga distancia por medio de una unión de injerto, y por todas partes del vástago. La investigación actual ha demostrado que las moléculas de polinucleótidos (siRNA) generadas a partir de estas construcciones puede impulsarse subsiguientemente para entrar en los meiocitos masculinos y efectuar silenciación génica en ellos, o interferir de otro modo con transcritos o material genómico en estos meiocitos. Hasta ahora se había demostrado imposible importar moléculas a meiocitos o microsporas de desarrollo primitivo a través
50 de transporte de larga distancia. Sorprendentemente, dentro de una flor las moléculas de siRNA son preferentemente elegidas como diana hacia las anteras y los meiocitos en ellas, mientras que los meiocitos femeninos (células madre megasporas contenidas en el ovario) no reciben la señal de siRNA.

Esta invención puede aplicarse para interferir con todos los procesos moleculares que tienen lugar en meiocitos masculinos, tales como meiosis, recombinación de cromosomas, y recombinación homóloga, y también interferir con la fisiología de microsporas, tales como, p.ej., el grado de reacción a estímulos androgenéticos de microsporas derivadas de estos meiocitos. La "interferencia" puede aludir más bien a la supresión o al bloqueo de estos procesos, o a la intensificación de los mismos. También permite la alteración específica del material genético que se transfiere a la siguiente generación, p.ej., mediante mutagénesis dirigida al sitio (durante la etapa en la que tiene lugar recombinación homóloga espontáneamente en meiocitos) en genes y/o secuencias reguladoras (cis-actuación).

Importantemente, la aplicación de esta invención no hace que los meiocitos masculinos, las microsporas que se desarrollan de ellos o el vástago transgénico, sean solamente el rizoma que acoge un transgeno. Las microsporas y el vástago solamente contienen moléculas derivadas de transgeno expresadas transitoriamente, que no se pasan a la próxima generación. Solamente los efectos moleculares ocasionados por las moléculas derivadas de transgeno se transmiten a la siguiente generación. El uso de transgenos que expresan factores negativos dominantes que pueden moverse sistémicamente por medio de uniones de injerto a un material de planta sin transgeno, permite a los investigadores obtener una ventaja total de la tecnología transgénica para imponer nuevos rasgos en plantas de cosecha, sin hacerlas transgénicas establemente.

Mutaciones específicas pueden introducirse en un genoma de una planta a través de recombinación homóloga (Paszkowski J et al, 1988, *EMBO J* 7: 4021-4026; Mengiste T y Paszkowski J, 1999, *Biol Chem* 380: 749-758; Vergunst AC y Hooykaas PJJ, 1999, *Crit Rev Plant Sci* 18: 1-31) o por medio de inducción de mutación basada en oligonucleótidos (Oh TH y May GD, 2001, *Curr Opin Biotechnol* 12: 169-172; tecnología KeyBase : WO2010074562, patente europea EP2167660, WO2007073149).

El método de esta invención puede utilizarse con fines de reproducción de plantas. Los métodos de reproducción actuales son lentos y tardan >5-10 años para el desarrollo de los cultivos.. Una de las desventajas es la ineficacia de selección de rasgos en generaciones primitivas. Este problema puede superarse induciendo la producción de haploides duplicados en vástagos no transgénicos injertándoles en rizomas transgénicos compatibles, como se ilustra por el ejemplo 3 más adelante.

La presente invención puede aplicarse a todas las especies de plantas que puedan ser injertadas y transformadas.. Las especies de cosechas sobre las que esta invención puede practicarse incluyen p.ej., tabaco, álamo, maíz, trigo, cebada, arroz, sorgo, remolacha azucarera, colza, ballico, girasol, haba de soja, tomate, pepino, pepinillo, hierba de los canónigos, espinaca, pimiento, petunia, patata, berenjena, melón, zanahoria, rábano, lechuga, especies de *Brassica* vegetales (berza, coliflor, brócoli, colinabo, coles de Bruselas), puerro, judías, guisantes, escarola, achicoria, cebolla, fresa, hinojo, remolacha de mesa, apio, apio nabo, espárrago, girasol, y vid.

La presente invención se refiere también a un método para interferir con procesos en los meiocitos masculinos de una planta, combinando una primera planta que comprende un rizoma, que transgénicamente acoge una secuencia de ácido nucleico, con un vástago procedente de una segunda planta injertado en el rizoma de dicha primera planta, con lo que dicha secuencia de ácido nucleico transgénico genera moléculas de polinucleótido de RNA en el rizoma de la primera planta, cuyas moléculas de polinucleótido de RNA se transportan sistémicamente por medio de la unión de injerto entrando en los meiocitos masculinos producidos por el vástago de la segunda planta, y en donde dichas moléculas de polinucleótido de RNA son al menos parcialmente complementarias a un transcrito expresado en los meiocitos masculinos producidos por el vástago de la segunda planta.

La expresión de la secuencia de ácido nucleico transgénico en la primera planta se consigue ligando operablemente dicha secuencia de ácido nucleico a una secuencia de promotor que comunica un perfil de expresión de ubiquitina o sistémico, o un perfil de expresión específico de un tejido o de tipo celular a la citada secuencia de ácido nucleico transgénico. Para esta finalidad la secuencia de ácido nucleico transgénico se clona en una construcción transgénica, aguas abajo (en el extremo 3') de una secuencia de promotor que tiene la aptitud de inducir la expresión de dicha secuencia de ácido nucleico en plantas. Las secuencias de promotor se diferencian en sus tipos de expresión en tejidos de plantas, y algunas tienen la capacidad de inducir expresión génica en todos los tejidos (expresión de ubiquitina), mientras que otras tienen un esquema de expresión más estrecho (espacio temporal), o un tipo de expresión muy específico que se restringe a un tipo de tejido específico o un tipo de célula específico.

Ejemplos de secuencias de promotor que comunican un perfil de expresión de ubiquitina a una secuencia de ácido nucleico transgénico son, p.ej., el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV 35S), promotores de ubiquitina seleccionados, promotores de actina seleccionados, y muchos otros. Ejemplos de promotores específicos de tejido o de tipo de células se conocen también por los expertos en la técnica.

Para los fines de esta invención, la secuencia de promotor confiere a dicha secuencia de ácido nucleico transgénico un perfil de expresión que engloba el rizoma. Este hecho se desea debido a que solamente el rizoma se emplea desde dicha primera planta que acoge la secuencia de ácido nucleico transgénico, y por consiguiente dicha secuencia de ácido nucleico debería expresarse al menos en el rizoma de dicha primera planta. El rizoma abarca los tejidos fuente procedentes de los que savia de floema es transportada a los tejidos sumergidos, y más específicamente a los tejidos sumergidos del vástago. Un rizoma comprende las raíces y puede comprender además

una parte del tallo y algunas hojas (maduro). Según la invención, el producto de expresión de la secuencia de ácido nucleico transgénico puede producirse en el rizoma completo o en una parte del mismo, por ejemplo utilizando un promotor específico de la raíz, la hoja o el tallo.

5 En una realización la expresión de la secuencia de ácido nucleico transgénico en el rizoma de la primera planta es constitutiva, En otra realización, la expresión de la secuencia de ácido nucleico transgénico en el rizoma de la primera planta es transitoria. La expresión transitoria puede, p.ej., conseguirse por el uso de un promotor inducible, seleccionado del grupo que comprende promotores inducibles por el calor, promotores inducibles químicamente, promotores inducibles por esteroides, y promotores inducibles por alcohol. La expresión transitoria puede conseguirse utilizando un promotor inducible o introduciendo transitoriamente la construcción transgénica (con un promotor enérgico) en el rizoma en lugar de integrar establemente el transgenio en el genoma del rizoma. Tal transformación transitoria puede conseguirse, por ejemplo, por infiltración de *Agrobacterium* mediante el estomago de las hojas que quedan fijadas al rizoma después del injerto del vástago en el rizoma.

10 En una realización, la interferencia con procesos en los meiocitos masculinos consiste en la supresión o el bloqueo de procesos en los meiocitos masculinos. En otra realización, la interferencia con procesos en los meiocitos masculinos consiste en la intensificación de procesos en los meiocitos masculinos. Donde la interferencia consiste en la supresión o el bloqueo de procesos en los meiocitos masculinos, esto puede conseguirse desestabilizando el mRNA del gen diana por medio de moléculas de polinucleótido de RNA que son al menos parcialmente complementarias del mRNA del gen diana o transcrito y que han sido generadas desde la secuencia de ácido nucleico transgénico. Las moléculas de polinucleótido pueden seleccionarse del grupo que comprende miRNA, RNA antisentido, moléculas de RNAi, moléculas de siRNA, moléculas de Silenciación de Genes Inducidos por Virus (VIGS), moléculas cosupresoras u oligonucleótidos de RNA.

15 En una realización, dicha secuencia de ácido nucleico transgénico está integrada establemente en el genoma de la primera planta. En otra realización dicha secuencia de ácido nucleico transgénico está presente transitoriamente en el rizoma de la primera planta.

20 En una realización dichas moléculas de polinucleótido de RNA se generan y expresan constitutivamente en la primera planta, preferiblemente en un dominio de expresión que comprende las raíces. Esto implica que no se requiere tratamiento externo para la generación y expresión de las moléculas de polinucleótido de RNA. Las propiedades de la secuencia de promotor a las que la secuencia de ácido nucleico transgénico está ligada operablemente, determinan el tipo temporal y espacial de la generación y expresión de las moléculas de polinucleótido de RNA.

25 En otra realización dichas moléculas de polinucleótido de RNA se generan y expresan transitoriamente en la primera planta, preferiblemente en un dominio de expresión que comprenda las raíces. Esto implica que factores o tratamientos externos puedan utilizarse para inducir y/o modular el tipo temporal y/o espacial de la generación y expresión de las moléculas de polinucleótido de RNA, en virtud del efecto que estos factores o tratamientos externos tienen sobre la actividad de la secuencia de promotor a la que está ligada operablemente la secuencia de ácido nucleico transgénico.

30 En esta realización la expresión transitoria de las moléculas de polinucleótido de RNA en la primera planta se consigue mediante el empleo de un promotor inducible, seleccionado del grupo que comprende promotores inducibles por calor, promotores inducibles químicamente, promotores inducibles por esteroides, y promotores inducibles por alcohol. El tratamiento del rizoma con el agente o agentes y/o condición o condiciones que inducen la actividad del promotor inducible (tal como un choque de calor o un tratamiento térmico, compuestos químicos específicos, esteroides específicos tales como dexametasona, o alcohol) activa el promotor inducible, lo que da por resultado la expresión transitoria de las moléculas de polinucleótido de RNA en la primera planta, preferiblemente en un dominio de expresión que comprende las raíces.

35 Las moléculas de polinucleótido de RNA que derivan de la secuencia de ácido nucleico transgénico son al menos parcialmente complementarias a un transcrito expresado en los meiocitos masculinos producidos por el vástago de la segunda planta. En una realización, las moléculas de polinucleótido de RNA son al menos parcialmente complementarias al transcrito (secuencia de ácido nucleico o mRNA transcritos) de un gen que está implicado en recombinación de cromosomas. En esta realización, el gen se selecciona adecuadamente del grupo que comprende

40 *SPO11, MER1, MER2, MRE2, ME14, REC102, REC104, MEK1/MRE4, RED1, HOP1, RAD50, MRE11, XRS2, PRD1, PRD2, PRD3, PHS1, NBS1, COM1, RHD54/TID1, DMC1, SAE3, RED1, HOP1, HOP2, MND1, REC8, MEI5, RAD51, RAD52, RAD54, RAD55, RAD57, RPA1, SMC3, SCC1, MSH2, MSH3, MSH6, PMS1, SOLODANCERS, HIM6, CHK2, SGS1, MSH4, MSH5, MER3/RCK, ZIP1, ZIP2, ZIP3, ZIP4, PTD, SHOC1, ZYP1, MLH1, MLH3*, o sus homólogos funcionales.,

45 Esta invención se refiere además a un método para alterar específicamente la secuencia genómica de meiocitos masculinos de una planta, combinando una primera planta que comprende un rizoma. que acoge transgénicamente una secuencia de ácido nucleico, con un vástago procedente de una segunda planta injertado en el rizoma de dicha primera planta, con lo que dicha secuencia de ácido nucleico transgénico genera moléculas de polinucleótido de RNA en el rizoma de la primera planta, cuyas moléculas de polinucleótido de RNA son transportadas

sistémicamente por medio de la unión de injerto para entrar en los meiocitos masculinos producidos por el vástago de la segunda planta, y en donde dichas moléculas de polinucleótido de RNA son al menos parcialmente homólogas a un fragmento de DNA contenido en el genoma de la segunda planta.

5 En esta realización se obtiene ventaja de recombinación homóloga en el meiocito masculino, efectuando intercambio del nucleótido considerado diana en la secuencia genómica del meiocito masculino. Esto puede conseguirse p.ej., mediante la presencia de polinucleótidos de DNA pequeños en los meiocitos masculinos durante la etapa en la que tiene lugar la recombinación de cromosomas, y en la que los cromosomas son accesibles más fácilmente. Mutaciones específicas pueden introducirse en un genoma de una planta mediante recombinación homóloga (Paszkowski J et al., 1988, *EMBO J* 7:4021-4026; Mengiste T y Paszkowski J, 1999, *Biol Chem* 380: 749-758; 10 Vergunst AC y Hooykaas PJJ, 1999, *Crit Rew Plant Sci* 18: 1-31) o por medio de inducción de mutación basada en un oligonucleótido (Oh TJ y May GD, 2001, *Curr Opin Biotechnol* 12: 169-172; tecnología KeyBase: WO2010074562, patente europea EP2167660, WO2007073149). Los polinucleótidos utilizados para esta finalidad son esencialmente homólogos a una secuencia genómica, excepto para una o más emparejamientos malos situados esencialmente en la mitad de la secuencia diana en el genoma destinado a crear un intercambio de nucleótido 15 considerado diana, o una mutación puntual en el genoma.

La invención será ilustrada además en los Ejemplos que siguen y que no están destinados a limitar la invención en modo alguno. En los Ejemplos, se hace referencia a las figuras que siguen.

Figura 1: (a) Fotografía representativa de una planta de tabaco injertada. Un vástago no transgénico se injerto en un rizoma transgénico, y todas las hojas fueron separadas del vástago, para forzar la señal de silenciación móvil de floema procedente de tejidos fuente (el rizoma) a la región apical del vástago (tejidos de sumergencia). (b) Un dibujo esquemático de las combinaciones de injerto utilizadas en el análisis citométrico (FACS) de polen recogido de plantas injertadas. Los histogramas indican el tamaño (luz esparcida) e intensidad de fluorescencia de capa y núcleos de polen teñidos con Yoduro de Propidio. Los números obtenidos por injertos de control (tipo silvestre/ tipo silvestre) son altamente reproducibles. Por el contrario, el tamaño y contenido de DNA de polen procedente de 20 vástagos transgénicos de siRNA de *DMC1* (injerto reverso) o de vástagos de tipo silvestre injertados en líneas de siRNA de *DMC1* (tejido verdadero) está alterado significativamente. Los números se refieren a imágenes representativas de anteras de vástagos que forman: flores estériles masculinas que no producen o que producen cantidades bajas de polen anómalo (números 1 y 2), y anteras con producción de polen regular (número 3).

Figura 2: (Grupo superior) Imágenes microscópicas de núcleos teñidos con DAPI (azul) en tétradas de microsporas aisladas de flores de vástago. Apréciase el aspecto de tétradas sin equilibrar (punta de flecha) de vástagos que producen siRNA de *DMC1* (imagen media) y en plantas de tipo silvestre (agriotipos) injertadas en líneas de silenciación de *DMC1* (imagen derecha). (Grupo inferior) Imágenes de microscopía electrónica de barrido de polen cosechado de flores de vástago. Los granos de polen de injertos control (tipo silvestre/tipo silvestre) eran normales en cuanto a forma y tamaño. Por el contrario, los vástagos de tipo silvestre injertados en líneas de silenciación de 30 *DMC1* transgénicas produjeron granos de polen deformados que variaban en cuanto a tamaño. Apréciase que dentro de un retoño el número de polen deformado era mayor en flores primarias que en flores tardías. Esta observación está correlacionada con el fenotipo de anteras estériles que aparece en la primera flor formada en vástagos de tipo silvestre injertados en líneas de siRNA de *DMC1*.

Figura 3: Dibujo esquemático del alargamiento observado de la señal de silenciación de *DMC1* en yemas de flores de 35S::YFP- Δ N-*DMC1* tanto en color (izquierda) como en blanco y negro (derecha). Las partes verdes o discontinuas indican partes de la planta donde no se observó silenciación de la construcción informadora de YFP. Las partes azules o listadas indican la presencia de silenciación de *DMC1* (=desaparición de señales de YFP). Se observó silenciación de *DMC1* (azul/ discontinua) en la epidermis de sépales y carpelos, y en el tejido esporogénico de anteras. No se observó silenciación de la construcción informadora de YFP en órganos femeninos tales como pistilos, carpelos u óvulos (verde/listados), o en yemas de flotes que se forman más tarde en una inflorescencia. Puede apreciarse que el alargamiento observado de silenciación de *DMC1* reiterado dentro de yemas de flores primarias apareció en inflorescencias que emergen de retoños secundarios.

Ejemplos

Ejemplo 1

50 Transformación estable de plantas de tabaco

Se obtuvieron plantas transgénicas de *Nicotiana tabacum* var. SR1 por transformación de disco de hojas con la cepa LB4004 de *Agrobacterium tumefaciens*, que acogen un vector binario, con el método descrito por Horsch RB et al., 1985, *Science* 227: 1229-1231.

Ejemplo 2

55 Supresión de recombinación cromosómica, in vivo, mediante el transporte de larga distancia de siRNA por medio de una unión de injerto en el tabaco.

Un ejemplo importante de un proceso que tiene lugar típicamente en los meiocitos masculinos de una planta es una recombinación cromosómica meiotica. Esta invención permite la interferencia con recombinación cromosómica meiotica por medio de un transgeno en un rizoma que genera moléculas de RNA (siRNA) de interferencia corta, que se liberan en los meiocitos masculinos que se producen por un vástago injertado sobre la parte superior del rizoma transgénico.

Para proporcionar evidencia de este hecho, plantas de tabaco transgénico (*Nicotiana tabacum* var. SR1) que acogían una construcción de horquilla de RNAi expresada ectópicamente para el gen *DMC1* (*cDNA1 MEIOTICO ROTO*) procedente de *Arabidopsis thaliana* (TAIR: AT3G22880; expresión influida por un promotor constitutivo) se produjeron siguiendo el método del ejemplo 1. *DMC1* es un factor meiótico específico de ciclo celular y un miembro de la familia de recombinasas de tipo RecA conservada altamente (ATP-asas dependientes de DNA) presente en meiocitos, tal como células madre de polen en anteras y células madre de megasporas en óvulos (Doutriaux MP et al., 1998, *Mol Gen Genet* 257: 283-291). Se mostró que el *DMC1* era crucial para recombinación interhomóloga y formación bivalente, y, por consiguiente, para el desarrollo apropiado de polen y óvulo. La falta de un producto funcional del gen *DMC1* induce meiosis aciasmática, dando por resultado la formación de granos de polen anómalos, que contienen un número equivocado de cromosomas. El número de cromosomas en esporas depende de una separación meiotica ordenada de cromatidas hermanas que ocurren en la segunda fase meiótica.

Las plantas se hicieron crecer en tierra vegetal en condiciones de invernadero (16 horas de luz, 25°C temperatura de día y 20°C temperatura de noche), y se seleccionaron tres líneas transgénicas que ponen de manifiesto claramente el fenotipo de silenciamiento de *DMC1* para experimentos posteriores. Este fenotipo de silenciamiento comprende consistentemente niveles bajos de mRNA de *DMC1* endógeno, la formación de tétradas de microsporas sin equilibrar después de meiosis, al menos esterilidad masculina parcial y la producción de polen formado irregularmente (aneuploide), que son indicativos de una meiosis disfuncional, causados por la presencia de moléculas de siRNA que hacen diana en el transcrito de *DMC1* en los meiocitos masculinos.

Vástagos procedentes de plantas de tipo silvestre (agriotipo) fueron injertados en plantas de 3 a 4 semanas de edad procedentes de esas líneas transgénicas seleccionadas (teniendo la primera hoja 10 cm de longitud aproximadamente). Dos plantas fueron combinadas de este modo, en las que la parte del fondo (rizoma transgénico) de una de las plantas soporta la parte superior (vástago de tipo silvestre) de la otra planta. Las incisiones de injerto se hicieron en un ángulo de 45° con una hoja de afeitar, habitualmente entre la tercera y cuarta hoja- Durante la transferencia el tallo del vástago fue sumergido en agua brevemente., hasta que la unión del injerto se alineó. Un mondachante sirvió como alojador de espacio entre el parafilm y el tallo arrollado para ayudar a alguna evaporación desde la unión del injerto.

Después del injerto, hojas que brotaban nuevamente en el vástago y retoños secundarios que aparecían en el rizoma se cortaron, forzando la liberación de moléculas mediadas por floema hacia la región apical del vástago. Un injerto satisfactorio conduce, especialmente, a la formación de una conexión vascular entre el rizoma y el vástago, y el transporte de floema va dirigido hacia tejidos sumergidos (tales como regiones meristemáticas y hojas que brotan de nuevo). Asegurando que la región apical del vástago es el único tejido sumergido del terreno de encima remanente de la planta, el transporte de floema puede ser eficazmente dirigido hacia tal región apical, donde se formarán flores. Injertos de control fueron incluidos en el experimento, especialmente vástagos de tipo silvestre injertados en rizomas de tipo silvestre. y vástagos transgénicos injertados en rizomas transgénicos o de tipo silvestre.

El alzado de los vástagos tuvo lugar aproximadamente 3 semanas después de realizar el injerto. Un examen preliminar de las anteras reveló una deficiencia en la producción de polen en todos los injertos en los que o bien el vástago o el rizoma eran transgénicos.

(Figura 1B). Este fenotipo era consistente con el fenotipo de silenciamiento de *DMC1*. En el primer caso esto no era sorprendente ya que el vástago entero era transgénico, y en el interior se producían las moléculas de siRNA de meiocitos dirigidas contra *DMC1*. En el último caso, sin embargo, este hecho implicó que - como enseña la invención actual - las moléculas de siRNA generadas por la construcción de horquillas de RNAi dirigidas frente a *DMC1* se habían movilizadas desde el rizoma transgénico y se habían transportado sistémicamente al vástago con la savia de floema, y se habían liberado a los meiocitos masculinos que se habían producido en el interior de tejidos esporogénicos de las yemas de flores del vástago.

En injertos testigo en los que el propio vástago era transgénico se observó esta esterilidad masculina en todas las flores, mientras que en injertos en que el vástago era de tipo silvestre (injertado sobre un rizoma transgénico) el efecto se limitaba a las primeras flores. Las primeras flores eran casi estériles, mientras que las flores tardías eran totalmente fértiles. La señal de siRNA mediada por floema entró preferentemente de este modo en las flores producidas inicialmente, siendo el primer tejido sumergido que la savia de floema encontró en su camino hacia el ápex del vástago. También se observó el fenotipo de esterilidad masculina en las primeras flores que se desarrollaron en retoños secundarios.

Se llevó a cabo Un examen más completo de las primeras flores procedentes de vástagos de tipo silvestre injertados en un rizoma transgénico, y - basado en una relación altamente reproducible entre distribución de tamaño

y emisión de fluorescencia procedente de polen de tipo silvestre - un análisis de clasificador de células activado por fluorescencia (FACS) reveló una variabilidad mucho mayor en el tamaño del polen (distribución irregular), en comparación con polen procedente de flores de tipo silvestre (Figura 1B).

- 5 Esta observación se confirmó con microscopía electrónica de barrido y el polen producido por las primeras flores de vástagos de tipo silvestre soportadas por un rizoma transgénico que producía siRNA de *DMC1* aparecía deformado y más pequeño. El polen procedente de flores tardías era normal (Figura 2)

Tabla 1. Estadísticas de fenotipos de siRNA de *DMC1* observados después de injertar

	Rizoma / Vástago	Fenotipo de <i>DMC1</i> / Injertos ensayados ^a
	Tipo silvestre / Tipo silvestre	0 / 13 (0%)
	Tipo silvestre / siRNA de <i>DMC1</i>	15/15 (100%)
10	siRNA de <i>DMC1</i> / Tipo silvestre	6/13 (46%)
	Tipo silvestre / <i>YFP-ΔN-DMC1</i>	0/ 8 (0%)
	<i>YFP-ΔN -DMC1</i> / si RNA de <i>DMC1</i>	5/5 (100 %)
	siRNA de <i>DMC1</i> / <i>YFP-ΔN -DMC1</i>	3/5 (60%) ^b

- 15 ^a evaluado por esterilidad, producción de polen aberrante, aspecto de tétradas sin equilibrar, FACS, inspección citológica de meiosis, qPCR, y presencia de moléculas de siRNA específicas de *DMC1*

^b verificado por falta de fluorescencia de *YFP-ΔN- DMC1* en hojas de vástago y yemas primarios.

- 20 Para dirigir además este fenotipo, se investigó un estado primario en el desarrollo de polen. En injertos de control (vástago de tipo silvestre en rizoma de tipo silvestre) las tétradas de microsporas tenían todas un aspecto normal y equilibrado (n = 100). En vástagos de tipo silvestre injertados en rizomas transgénicos, sin embargo, el número global de tétradas era inferior en las primeras flores (primarias), y un número importante de estas tétradas (hasta 10%, con n > 100) estaba desequilibrado, como venía indicado por el aspecto de un núcleo pequeño de una célula tetrádica (figura 2). La formación de tétradas sin equilibrar es uno de los fenotipos asociados con la pérdida de actividad de *DMC1* durante la meiosis.

- 25 Aun cuando *DMC1* es también activo en los órganos reproductores femeninos, no hubo evidencia de silenciamiento de *DMC1* en los órganos reproductores femeninos de vástagos de tipo silvestre injertados en rizomas transgénicos. Cuando se llevó a cabo la polinización con polen de tipo silvestre se produjo un número normal de semillas viables, lo que indica una fertilidad femenina normal.

- 30 Para investigar adicionalmente la silenciamiento de *DMC1* en meiocitos masculinos por medio de un transporte sistémico de señales de RNAi, se generó otro conjunto de plantas de tabaco transgénicas, empleando el método descrito en el Ejemplo 1. Estas plantas acogían una construcción informadora transgénica de 35S: *:YFP::ΔN-DMC1* que contenía un cDNA de *DMC1* truncado, disfuncional, de *Arabidopsis thaliana* que carecía de las primeras 276 bp (es decir, que conducía a la supresión de 92 aminoácidos en el extremo N terminal), fusionado a la Proteína Fluorescente Amarilla (YFP) que sirve como informador virtual, e inducida por el promotor 35S del mosaico de la coliflor constitutivo (CaMV 35S).

- 40 Retoños procedentes de estas plantas transgénicas - que ponen de manifiesto normalmente una señal fluorescente de ubiquitina debida a la sobreexpresión de la proteína de fusión - fueron injertados subsiguientemente en rizomas transgénicos que acogían la construcción de silenciamiento de *DMC1*. Se examinaron las yemas de flores que emergían del vástago, y en las primeras yemas de flores (primarias) la señal de fluorescencia YFP era fuerte en carpelos y estigmas, pero estaba ausente en el interior de las anteras. Este hecho demostró que en yemas de flores primarias la señal de silenciamiento sistémico se libera preferiblemente en anteras (Figura 3).

- 45 Así pues, este ejemplo enseña cuanta recombinación de cromosomas puede suprimirse eficazmente en meiocitos masculinos de tabaco., sin hacer transgénicos estos meiocitos o los gametos masculinos que resultan de los mismos. Esta invención permite la aplicación de Reproducción Inversa (Reverse Breeding) (WO03017753) en una realización preferida, a saber con una progenie no transgénica. Este concepto se explica además en el Ejemplo 3.

Si bien en este ejemplo el gen *DMC1* era considerado diana, podría considerarse como objetivo cualquier otro gen que esté implicado funcionalmente en cualquiera de las etapas de recombinación meiótica de cromosomas, con resultados comparables.

Ejemplo 3

Reproducción Inversa no transgénica en *Brassica* mediada por señales de silenciación sistémicas

- 5 El enfoque experimental descrito en el Ejemplo 2 se aplicó a *Brassica oleracea*, dando como resultado rizomas transgénicos que acogían una construcción de silenciación de RNA1 de horquilla expresada ectópicamente contra el gen *SDS* (*SOLO DANCERS*). En estos rizomas transgénicos se hicieron injertos de vástagos híbridos de tipo silvestre procedentes de un híbrido F1 interespecífico (*Raphanus sativus* x *Brassica oleracea*). y la señal de silenciación se forzó en meiocitos masculinos separando todas las hojas de vástago, según se ha descrito en el Ejemplo 2. Las primeras yemas de flores producidas por los vástagos contenían una proporción importante de tétradas de microsporas aberrantes, y estas flores eran en gran medida estériles masculinas.
- 10 Cuando las primeras yemas de flores producidas en el vástago tenían un tamaño de aproximadamente 3 mm, las microsporas que se habían desarrollado habían alcanzado la etapa óptima de regeneración de microsporas *in vitro* (androgénesis). Las microsporas se purificaron partiendo de esas yemas y se las dio un tratamiento de tensión de dos días a 32°C, que es óptimo para inducir un desarrollo esporofítico de las esporas haploides. Las microsporas equilibradas (euploides) se regeneraron en plántulas haploides utilizando métodos conocidos por los expertos en la
- 15 técnica (por ejemplo Swanson EB et al., *Plant Cell Rep* 6: 94-97; Takahata Y y Keller WA, *Plant Sci* 74: 235-242), y se empleó seguidamente tratamiento con colchicina para la duplicación genómica, lo que condujo a plántulas duplicadas haploides o haploides duplicadas (DH) con un complemento completo de cromosomas.
- Debido a la supresión de recombinación de cromosomas por silenciación de *DMC1* en los meiocitos masculinos, los
- 20 cromosomas de las plantas DH obtenidas por este método no habían sido recombinadas, y tenían la constitución genética exacta referente a los cromosomas de las líneas parentales de la planta híbrida que habían sido empleados como un vástago para el injerto. Este hecho se confirmó con marcadores moleculares (dos por cromosoma, es decir, uno por rama de cromosoma) que son polimórficos entre *Raphanus sativus* y *Brassica oleracea*, los padres del híbrido de F1 que se empleó como vástago en el injerto.
- Utilizando el mismo grupo de marcadores moleculares, plantas DH regeneradas de microsporas recogidas de
- 25 anteras del vástago fueron clasificadas para identificar individuos que eran genéricamente complementarios, es decir, que contenían grupos de cromosomas parentales que cuando se combinaban en un F1 correspondían al grupo exacto de cromosomas presentes en el híbrido empleado como vástago del injerto. El cruce de estos individuos complementarios dio por resultado la reconstrucción exacta del genotipo del híbrido (*Raphanus sativus* x *Brassica oleracea*).
- 30 Este ejemplo ilustra por tanto como la invención actual puede utilizarse para reconstruir exactamente un genotipo híbrido. De modo importante, este hecho se consiguió sin hacer transgénica la planta híbrida reconstruida, como se había conseguido la supresión de recombinación de cromosomas antes de la producción de DH por medio de una señal de siRNA transitoria en los meiocitos masculinos
- El enfoque descrito en los ejemplos anteriores puede aplicarse asimismo a otras especies de plantas. También es
- 35 particularmente útil para aplicarle en especies de cosecha con ciclos de vida largos, tales como árboles (por ejemplo álamos, y árboles frutales tales como manzanos, peras, cerezas, melocotones, ciruelos, plátanos, frutos cítricos, papaya, higos, etc.) y vides. Esta invención podría emplearse para tratos específicos de propagación de semillas en tales cosechas, y pueden producirse mucho más rápidamente líneas de élite libres de transgeno y pueden evitarse varios años de esfuerzos de crianza tradicionales..

REIVINDICACIONES

- 1.- Método para interferir con procesos en los meiocitos masculinos de una planta, combinando una primera planta que comprende un rizoma, que acoge transgénicamente una secuencia de ácido nucleico, con un vástago procedente de una segunda planta injertada en el rizoma de dicha primera planta, con lo que dicha secuencia de ácido nucleico transgénico genera moléculas de polinucleótido de RNA en el rizoma de la primera planta, cuyas moléculas de polinucleótido de RNA son transportadas sistémicamente por medio de la unión de injerto para introducirse en los meiocitos masculinos producidos por el vástago de la segunda planta, y en donde dichas moléculas de polinucleótido de RNA transportadas sistémicamente son al menos parcialmente complementarias a un transcrito expresado en los meiocitos masculinos producidos por el vástago de la segunda planta.
- 2.- Método según la reivindicación 1, en donde la expresión de la secuencia de ácido nucleico transgénico de la primera planta se consigue ligando operablemente dicha secuencia de ácido nucleico a una secuencia de promotor que confiere un perfil de expresión de ubiquitina. o un perfil de expresión específico de un tipo de tejido o de un tipo celular, en dicha secuencia de ácido nucleico transgénico.
- 3.- Método según la reivindicación 2, en donde la secuencia de promotor confiere a dicha secuencia de ácido nucleico transgénico un perfil de expresión que abarca raíces.
- 4.- Método según las reivindicaciones 1-3, en donde la interferencia con procesos en los meiocitos masculinos consiste en la supresión o el bloqueo de procesos en los meiocitos masculinos.
- 5.- Método según la reivindicación 4, en donde la supresión o el bloqueo de procesos en los meiocitos masculinos se consigue desestabilizando el mRNA génico diana por medio de moléculas de polinucleótido de RNA que son al menos parcialmente complementarias al mRNA del gen diana o transcrito y que han sido generados a partir de la secuencia de ácido nucleico transgénico.
- 6.- Método según la reivindicación 5, en donde las moléculas de polinucleótido de RNA se seleccionan entre el grupo que comprende miRNA, RNA antisentido, moléculas RNAi, moléculas siRNA, moléculas de Silenciación de Genes Inducida por Virus (VIGS), moléculas cosupresoras u oligonucleótidos de RNA.
- 7.- Método según las reivindicaciones 1-3, en donde la influencia de procesos en los meiocitos masculinos de plantas consiste en la intensificación de procesos en los meiocitos masculinos de plantas.
- 8.- Método según las reivindicaciones 1-7, en donde las moléculas de polinucleótido de RNA se expresan transitoriamente en la primera planta.
- 9.- Método según la reivindicación 8, en donde la expresión transitoria de las moléculas de polinucleótido de RNA de la primera planta se consigue por el empleo de un promotor inducible, seleccionado del grupo que comprende promotores inducibles por calor, promotores inducibles químicamente, promotores inducibles por esteroides y promotores inducibles por alcohol.
- 10.- Método según la reivindicación 8. en donde la expresión transitoria de las moléculas de polinucleótido de RNA se efectúa por expresión de una construcción que codifica las moléculas de polinucleótido de RNA que no está integrada en el genoma de las células de rizoma.
- 11.- Método según la reivindicación 10, en donde la construcción se reparte a las células de rizoma por infiltración de hojas en el rizoma con *Agrobacterium*.
- 12.- Método según la reivindicación 11, en donde las moléculas de polinucleótido de RNA son al menos parcialmente complementarias al transcrito de un gen que está implicado en recombinación de cromosomas.
- 13.- Método según la reivindicación 12, en donde el gen se selecciona del grupo que comprende *SPO11*, *MER1*, *MER2*, *MRE2*, *ME14*, *REC102*, *REC104*, *REC114*, *MEK1/MRE4*, *RED1*, *HOP1*, *RAD50*, *MRE11*, *XRS2*, *PRD1*, *PRD2*, *PRD3*, *PHS1*, *NBS1*, *COM1*, *RHD54/TID1*, *DMC1*, *SAE3*, *RED1*, *HOP1*, *HOP2*, *MND1*, *REC8*, *ME15*, *RAD51*, *RAD52*, *RAD54*, *RAD55*, *RAD57*, *RPA1*, *SMC3*, *SCC1*, *MSH2*, *MSH3*, *MSH6*, *PMS1*, *SOLODANCERS*, *HIM6*, *CHK2*, *SGS1*, *MSH4*, *MSH5*, *MER3/RCK*, *ZIP1*, *ZIP2*, *ZIP3*, *ZIP4*, *PTD*, *SHOC1*, *ZYP1*, *MLH1*, *MLH3*, o sus homólogos funcionales.
- 14.- Método para alterar específicamente la secuencia genómica de meiocitos masculinos de una planta, combinando una primera planta que comprende un rizoma, que acoge transgénicamente una secuencia de ácido nucleico, con un vástago procedente de una segunda planta injertado en el rizoma de dicha primera planta, con lo que dicha secuencia de ácido nucleico transgénico genera moléculas de polinucleótido de RNA en el rizoma de la primera planta, cuyas moléculas de polinucleótido de RNA son transportadas sistémicamente por medio de la unión de injerto para entrar en los meiocitos masculinos producidos por el vástago de la segunda planta, y en donde dichas moléculas de polinucleótido son al menos parcialmente homólogas a un fragmento de DNA contenido en el genoma de la segunda planta.

Fig. 1A

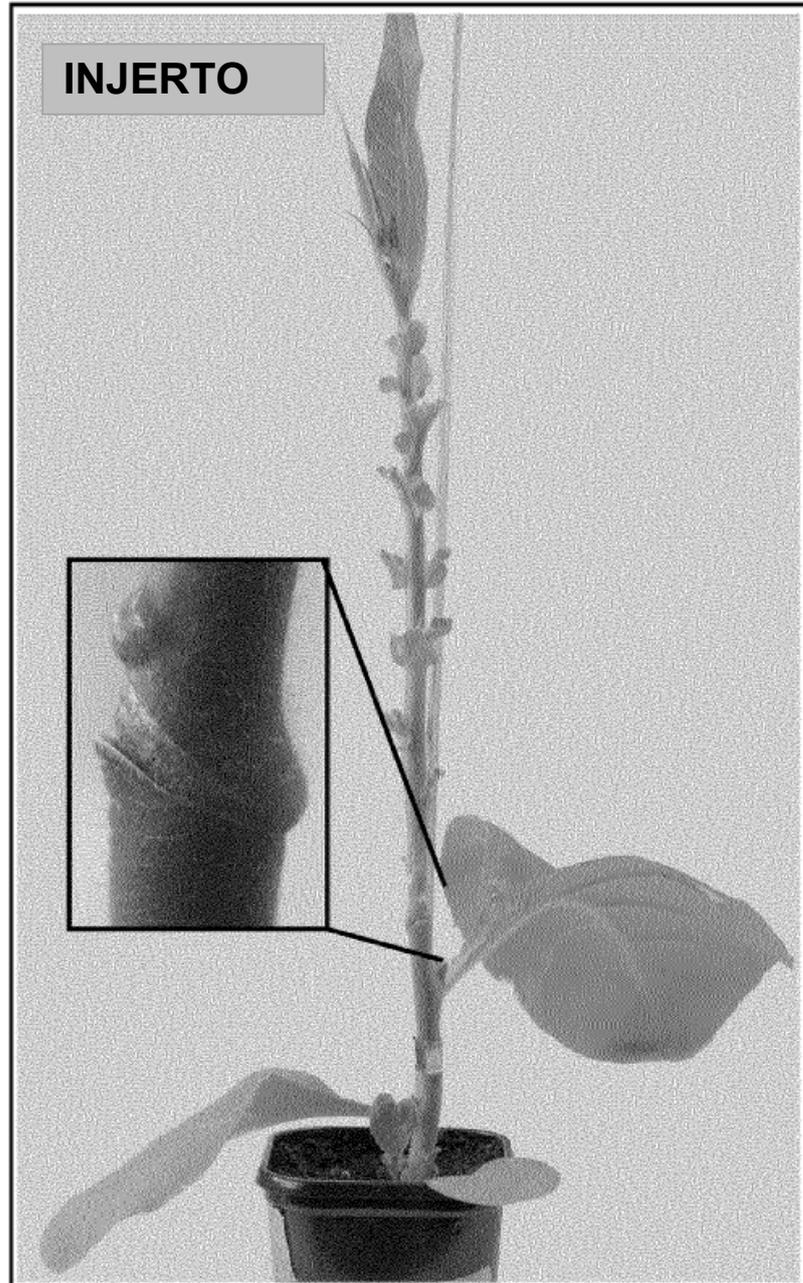


Fig. 2

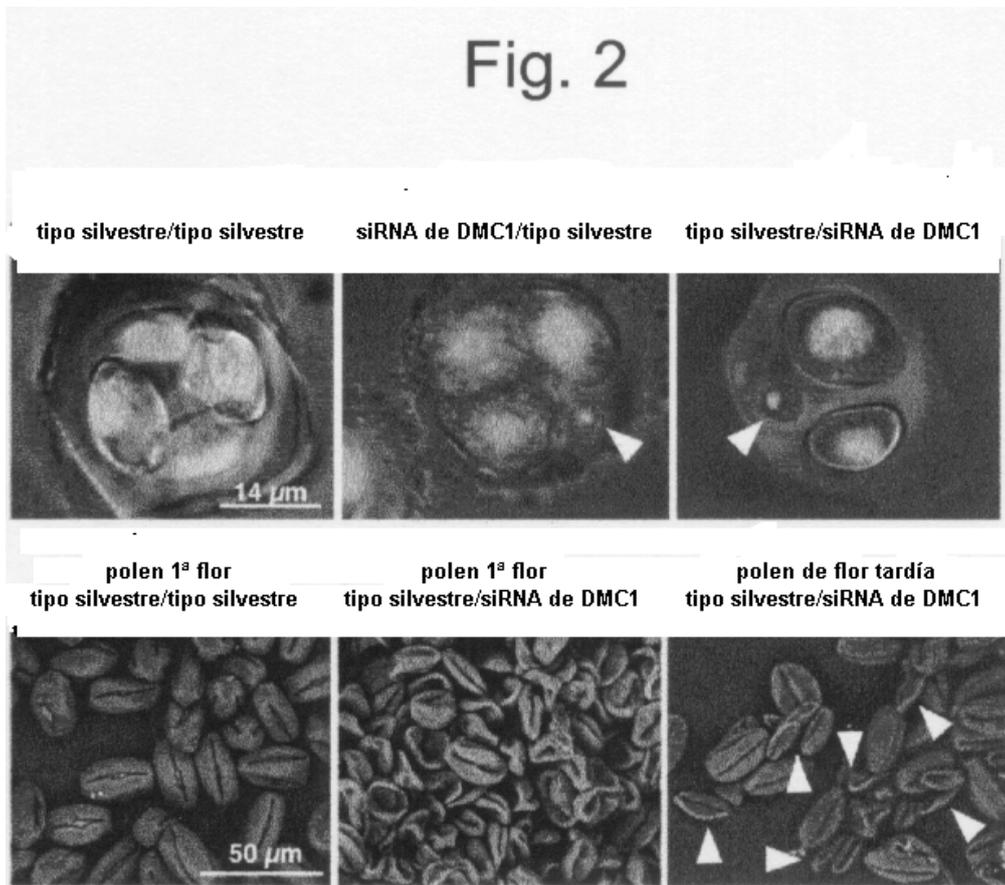


Fig. 3

