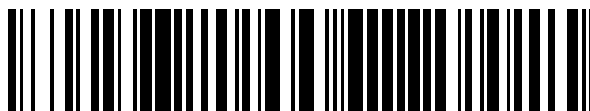


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 596 627**

51 Int. Cl.:

**A01H 1/00** (2006.01)

**C12N 15/82** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.08.2002 E 10184079 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.08.2016 EP 2363019**

54 Título: **Mejoramiento genético inverso**

30 Prioridad:

**23.08.2001 EP 01203193**

**12.02.2002 EP 02075582**

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

**11.01.2017**

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;**  
**VAN DUN, CORNELIS MARIA PETRUS;**  
**REININK, KORNELIS y**  
**DE WIT, JACOBUS PETRUS CORNELIS**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 596 627 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

Mejoramiento genético Inverso

**Campo de la invención**

5 Esta invención se refiere a un método para producir de manera eficaz plantas homocigotas a partir de una planta de partida heterocigota. La invención se refiere en particular a la utilización de este método en fitomejoramiento para producir líneas parentales para la producción de descendencia híbrida. Adicionalmente se describen constructos de ADN para su uso en este método, pares de cebadores para seleccionar genes para su uso en este método, organismos híbridos F1 obtenibles cruzando plantas que son el resultado del método y las semillas resultantes del método.

**10 Antecedentes de la invención**

15 El fitomejoramiento es uno de los logros más antiguos del hombre. Comenzó cuando domesticó plantas haciéndolas crecer en condiciones controladas y seleccionando aquellos tipos que proporcionaban una fuente fiable de alimentos. La característica más importante que contribuye al alto rendimiento de muchas nuevas variedades es su naturaleza híbrida. El ejemplo más espectacular es el maíz híbrido, que se introdujo por primera vez en cantidades significativas en 1932 y representa en la actualidad aproximadamente 95% de la superficie cultivada de maíz en los Estados Unidos. Actualmente están disponibles variedades híbridas en cultivos tales como sorgo, remolacha azucarera, girasol, cebolla, semillas de ricino, colza, puerro, pepino, tomate, espinaca, melón, pimiento, zanahoria, repollo, coliflor, brécol, rábano, berenjena, etc., en hongos, tales como setas, y en animales, tales como aves de corral y peces.

20 J. Sneep y A. Hendriksen (1979, Pudoc, Centre for Agricultural Publishing and Documentation Wageningen), ilustra varios métodos para el fitomejoramiento que se han aplicado con éxito durante las últimas décadas y que dan como resultado variedades que se cultivan hoy en día. En el Capítulo "Current breeding methods", J. Sneep y A. Hendriksen (1979) (más arriba, páginas 104-233), describen técnicas generales de mejoramiento genético, pero también las tecnologías de mejoramiento genético específicas para numerosos cultivos, tales como patata, remolacha azucarera, maíz, girasol, etc.

25 En general, las selecciones se realizan a partir de una colección de plantas que pueden derivar de semillas procedentes del mercado (variedades comerciales), accesos de bancos de genes, variedades locales, etc. A partir de esta colección, se seleccionan las "mejores" plantas y se cruzan acuerdo con la técnica. Así tradicionalmente, se obtienen mediante mejoramiento genético líneas puras o poblaciones homogéneas.

30 El fitomejoramiento tiene el objetivo de producir variedades mejoradas de cultivos basándose en la explotación de la variación genética, que existe en el germoplasma de una especie vegetal. La variación genética se obtiene tradicionalmente al cruzar dos plantas genéticamente diferentes para crear una progenie híbrida. El genotipo de una planta de la progenie es el resultado de la combinación de los genotipos de los gametos masculino y femenino, que a través de la fusión dan como resultado un cigoto, a partir del cual se desarrolla en última instancia la planta de la progenie. Los gametos se forman por generación gametofítica durante el ciclo de vida de una planta y por lo tanto la variación genética de los gametos se refleja en los genotipos de los gametofitos. Los gametofitos se diferencian a partir de esporas, que son producidas por la generación esporofítica durante el ciclo de vida de la planta. Las esporas se producen a partir de células diferenciadas en los órganos reproductores de una planta a través de un proceso de división celular especializado denominado meiosis.

40 Durante la meiosis la segregación cromosómica y la recombinación son los procesos que causan una reclasificación independiente y la generación de nuevas combinaciones de los factores genéticos de un genoma diploide en un genoma haploide de los gametofitos. El genotipo de una planta de la progenie es la combinación de los genotipos de un gameto masculino y uno femenino, que se fusionan para formar un nuevo esporofito. Por lo tanto, se puede considerar que la meiosis es un proceso fundamental durante el ciclo de vida de cualquier organismo vivo para crear variabilidad genética.

45 Esta variabilidad se utiliza para obtener plantas deseadas con nuevas propiedades. A menudo, la combinación de las diferentes propiedades de los dos progenitores en un híbrido es más ventajosa que una planta homocigota (parental). La producción de tales híbridos es sin embargo bastante complicada. En el caso de los híbridos F1, varias supuestas líneas parentales se vuelven primero homocigotas, p. ej., por medio de muchas generaciones de endogamia y selección y, posteriormente, se cruzan en varias combinaciones para estudiar su capacidad de combinación. Las mejores combinaciones y sus respectivas líneas parentales son posteriormente retenidas y dan lugar a una variedad comercial de la F1.

55 Sin embargo, la forma normal de obtención de híbridos deseables requiere mucho tiempo puesto que se tienen que producir en primer lugar las líneas parentales homocigotas y después se tiene que seleccionar la combinación deseada de dos de estas líneas parentales homocigotas. Este proceso requiere varias generaciones.

**Compendio de la invención**

Por lo tanto, un primer objeto de la presente invención es proporcionar un método alternativo para proporcionar líneas parentales homocigotas para la producción de híbridos.

5 Un segundo objeto de la invención es el uso de este método para proporcionar aún más flexibilidad en la combinación de rasgos parentales deseables en la descendencia heterocigota.

De acuerdo con la invención, se encontró sorprendentemente que es posible lo contrario del mejoramiento genético tradicional, es decir, partir de la planta heterocigota para producir líneas parentales homocigotas. Las líneas parentales homocigotas pueden reconstituir la planta o animal heterocigoto original mediante cruzamiento, si se desea, incluso en una gran cantidad. Una planta heterocigota individual se puede convertir sorprendentemente en una variedad heterocigota (híbrido F1) sin necesidad de propagación vegetativa, pero como resultado del cruzamiento de 2 líneas homocigotas derivadas de la planta seleccionada original.

10

La presente invención se refiere de ese modo a un método para producir eficazmente plantas homocigotas a partir de una planta de partida heterocigota, que comprende:

a) proporcionar una planta de partida heterocigota;

15 b) permitir que la planta de partida produzca células haploides, mientras se evita la recombinación al menos parcialmente o se suprime con el fin de obtener un número limitado de células haploides genéticamente diferentes;

c) crear plantas homocigotas a partir de las células haploides obtenidas de este modo; y

d) seleccionar las plantas que tienen el conjunto deseado de cromosomas.

En donde la prevención o supresión de la recombinación se logra mediante:

20 la interferencia con uno o más genes diana implicados en la recombinación, en donde la interferencia con el gen diana consiste en la introducción de una o más mutaciones en el gen diana que conducen a la alteración de su función biológica, en donde una o más mutaciones se introducen específicamente por medio de recombinación homóloga o inducción de la mutación basada en oligonucleótidos; o

25 un compuesto químico que previene la formación del huso o mediante un compuesto químico que induce aneuploidía.

Al prevenir o suprimir la recombinación se puede limitar o incluso evitar la variación normal que surge en cada cruce natural. Como resultado de lo mismo, se reduce considerablemente el número de células haploides que tienen diferentes conjuntos de cromosomas. Debido a esto, se pueden identificar con bastante facilidad la célula o planta regeneradas a partir de allí con el conjunto deseado de cromosomas.

30 Cuando se duplica el conjunto de cromosomas de tal célula o planta regeneradas a partir de allí surge una célula u organismo homocigoto. Tal planta se puede utilizar después en cruces con otra planta homocigota producida de la misma manera a partir de la misma planta donadora para producir una planta híbrida.

35 El "conjunto deseado de cromosomas" puede ser uno de diversas variantes. En caso de que se vaya a producir el híbrido de partida original las dos plantas homocigotas producidas de acuerdo con la invención deben tener juntas el conjunto exacto de cromosomas de la planta de partida. Esto se consigue cuando ambos progenitores tienen el mismo conjunto de cromosomas que los gametos que formaron el híbrido. Sin embargo, también es posible que la nueva línea materna tenga solamente algunos de los cromosomas del gameto materno original y los otros del gameto paterno original ("sustitución de cromosomas"). En ese caso, el otro progenitor debería volver a tener su complemento si se desea la producción del mismo híbrido.

40 Sin embargo, también es posible combinar la nueva línea que tiene uno o más, pero no todos los cromosomas del progenitor original con un progenitor diferente en el fitomejoramiento. Las nuevas líneas homocigotas como tales pueden ser de ese modo ser un nuevo producto final deseado. Esto se aplica a las líneas que tienen la composición de cromosomas parental original, así como a las líneas que tienen una nueva combinación de cromosomas.

45 La recombinación se puede evitar o suprimir mediante diversos métodos, en particular, a través de enfoques transgénicos dominantes, mutación dominante negativa o tratamiento con un agente químico.

En una primera realización, la prevención o supresión de la recombinación se consigue interfiriendo con uno o más genes diana implicados en la recombinación. Los genes diana pueden estar implicados en roturas de la doble hebra, emparejamiento de cromosomas, entrecruzamiento y separación de las cromátidas hermanas.

50 Los genes diana (Núms. de acceso GenBank) que participan en la formación de roturas de la doble hebra son SPO11 (J02987.1), MER1 (M31304.1), MER2 (M38340.1), MRE2 (D11461.1), Mei4 (M84765.1), REC102 (M74045.1), Rec104 (Z15007.1), REC114 (Z14315.1), MEK1/MRE4 (X63112.1), RED1 (X16183.1), HOP1

(J04877.1), RAD50 (X14814.1), MRE11 (U60829.1), XRS2 (L22856.1), identificados en levaduras, o sus homólogos funcionales de otras especies.

Los genes diana (Núms. de acceso GenBank) que participan en el emparejamiento de cromosomas y/o el intercambio de cadenas son RAD54/TID1 (M63232.1), DMC1 (M87549.1), MND1 (acceso proteína NP\_011332.1), SAE2 (U49447.1), SAE3 (U82546.1), RED1 (X16183.1), HOP1 (J04877.1), HOP2 (AF078740.1), REC8 (AJ223299.1), MER1 (M31304.1), MRE2 (D11461.1), ZIP1 (L06487.1), ZIP2 (acceso proteína: NP\_011265.1), MEI5 (L03182.1), RAD51 (X64270.1), RAD52 (M10249.1), RAD55 (U01144.1), RAD57 (M65061.1), RPA (M60262.1), SMC3 (Y14278.1), SCC1 (Y14280.1), MSH2 (M84170.1), MSH3 (M96250.1), MSH6 (AL031545), PMS1 (M29688.1), MER3 (P51979), DDC1 (acceso proteína NP\_015130.1), MMS4 (U14000.1), identificados en levaduras, SOLODANCERS (AJ457977.1), Ku70 (AF283759.1), KU80 (AF283758.1) identificados en *Arabidopsis thaliana*, HIM6 (AY095296.1), CDS1 (Y60A3A.12), CDS2 (T08D2.7), identificados en *Caenorhabditis elegans*, SCP3 (X75785.10), identificado en *Rattus norvegicus*, MEI218 (U35631.2), identificado en *Drosophila melanogaster*, o sus homólogos funcionales de otras especies.

Después de que se formen los complejos de recombinación (uniones Holliday dobles) éstos son procesados o a eventos de entrecruzamiento o a eventos de no entrecruzamiento (llamados conversión génica). La mayoría de los complejos de recombinación conducen a la conversión génica, mientras que solamente unos pocos eventos de entrecruzamiento conducen a recombinación. Interferir en esta última fase de la meiosis para tener más conversión génica conduce a una frecuencia de recombinación más baja, y se puede lograr a través de los genes diana (Núms. de acceso GenBank) seleccionados del grupo que consiste en SGS1 (U22341.1), MSH4 (U13999.1), MSH5 (L42517.1), ZIP1 (L06487.1), ZIP2 (acceso proteína: NP\_011265.1), MLH1 (U07187.1), MEC1 (U31109.1), MLH3 (acceso proteína NP\_015161.1) de levadura, o sus homólogos funcionales de otras especies.

En la presente invención se puede hacer uso de los genes anteriores que se originan en la planta en la que se identificaron primero o los genes correspondientes en otras plantas, que tienen el mismo nombre y/o la misma función (denominados en la presente memoria "sus homólogos funcionales de otras especies"). Los homólogos funcionales de los genes anteriores que están implicados en la recombinación meiótica constituyen dianas potenciales para la modificación en plantas en las que se va a suprimir la recombinación meiótica. El hecho de que los productos que codifican puedan realizar la misma función biológica o una similar no significa necesariamente que los genes tengan un nivel de identidad significativamente más alto que los genes que no son homólogos funcionales.

De acuerdo con la presente invención un gen diana (candidato) se define como un gen que reside dentro del genoma de una planta que, tras la modificación cuantitativa y/o cualitativa de su expresión da como resultado un proceso meiótico modificado en dicha planta que se caracteriza por la formación de esporas haploides funcionales que contienen un conjunto completo de cromosomas pero que no han sido sometidos a recombinación meiótica o que han sido sometidos a una reducción de la frecuencia de recombinación meiótica en comparación con la situación en la que dicho gen no está modificado.

Los diferentes genes y sus homólogos funcionales, que pueden, pero no necesariamente tienen que ser homólogos, se califican como genes diana (candidato). El único denominador común de los genes diana de la invención es el hecho de que tras su modificación se suprime la recombinación meiótica.

Una vez que se ha seleccionado un gen diana para la modificación, ésta se puede lograr de varias maneras.

En una primera realización interferir con el gen diana puede consistir en la introducción de una o más mutaciones en el gen diana que conduce a la alteración de su función biológica. Las una o más mutaciones pueden ser introducidas al azar por medio de uno o más compuestos químicos y/o métodos físicos y/o inserción de elementos genéticos. Los compuestos químicos adecuados son metanosulfonato de etilo, nitrosometilurea, hidroxilamina, proflavina, N-metil-N-nitrosoguanidina, N-etil-N-nitrosourea, N-metil-N-nitro-nitrosoguanidina, sulfato de dietilo, etilenimina, etilenimina, azida de sodio, formalina, uretano, fenol y óxido de etileno. Los métodos físicos que se pueden utilizar comprenden radiación con UV, exposición a neutrones rápidos, radiación con rayos X y ganma. El elemento genético es un transposón, T-ADN o elemento retroviral. Las mutaciones también se pueden introducir específicamente por medio de recombinación homóloga o inducción de mutación basada en oligonucleótidos. De acuerdo con una realización adicional de la invención, la prevención o supresión de la recombinación se logra por medio de un compuesto químico que evita la formación del uso o por medio de un compuesto químico que induce aneuploidía. En una de las realizaciones que no son parte de la invención reivindicada la interferencia con el gen diana puede consistir adicionalmente en la prevención de la transcripción del mismo. Esto se puede lograr por medio de oligonucleótidos de ARN, oligonucleótidos de ADN o moléculas de ARNi dirigidas contra el promotor del gen diana.

Alternativamente, la transcripción se puede evitar por medio de la expresión de un factor de transcripción que actúa negativamente que actúa sobre el promotor del gen diana. Tal factor de transcripción que actúa negativamente puede ser natural o artificial. Los factores de transcripción que actúan negativamente artificiales se pueden emplear por medio de la expresión en exceso de un factor de transcripción de dedo de zinc-polidáctilo diseñado mediante ingeniería genética acoplado a un represor de la transcripción general.

La interferencia con el gen diana también puede consistir en desestabilizar el ARNm del gen diana, en particular por

medio de moléculas de ácido nucleico que son complementarias al ARNm del gen diana seleccionado de entre el grupo que consiste de ARN antisentido, moléculas de ARNi, moléculas Silenciadoras de Genes Inducida por Virus (VIGS), moléculas co-supresoras, oligonucleótidos de ARN u oligonucleótidos de ADN.

5 La interferencia con el gen diana puede consistir además en la inhibición de la expresión del producto del gen diana. Esto se puede lograr por medio del producto o los productos de expresión de uno o más constructos de ácido nucleico negativos dominantes, la expresión en exceso de uno o más supresores de que interactúan con el producto del gen diana, o por medio de uno o más compuestos químicos.

10 Después de que la planta de partida ha sido tratada de tal manera que se impide o suprime la recombinación antes o mientras que se están formando las células haploides, estas células se aíslan y se utilizan para la regeneración de una planta completa. Tal planta es haploide y se vuelve diploide ya sea espontáneamente o a través de otros medios, tales como el tratamiento con colchicina.

Las células haploides pueden derivar de células de la línea germinal, tales como células madre de esporas o células somáticas que se han convertido en haploides por medio de un proceso natural o inducido.

15 Una vez que la planta haploide se diploidiza, ésta es homocigota para todos los cromosomas y se puede utilizar para diversos fines.

20 Es posible obtener la composición cromosómica de los progenitores originales (denominado "rescate de la línea parental original") del híbrido que es el sujeto del mejoramiento genético inverso mediante análisis molecular o bien de la cubierta de la semilla o bien del endospermo. El endospermo contiene una dosis genética materna doble. Se puede usar un análisis cuantitativo para determinar cuales cromosomas derivan de la madre (dos veces la dosis) y cuáles del padre (una vez la dosis). La cubierta de la semilla es materna y representa la composición cromosómica que se origina de la madre.

25 La producción de híbridos F1, se puede realizar ahora en un orden completamente inverso. En lugar de seleccionar las llamados líneas parentales originales, y someter a ensayo la combinaciones adecuadas, se selecciona una planta heterocigota con una combinación adecuada esperada de formas alélicas de genes, y las líneas parentales correspondientes que se podrían utilizar para la producción de semillas híbridas F1 de la misma planta se derivan de esta planta. Este proceso se denomina en la presente memoria "mejoramiento genético inverso".

30 Es importante destacar que la tecnología de mejoramiento genético inverso permite una flexibilidad significativa en el proceso de cultivo de plantas, porque además de la reproducción eficaz del genotipo de partida exacto, para cada cromosoma individual se puede realizar un elección para recuperarlo, ya sea en una forma materna homocigota, paterna heterocigota u homocigota como se explicará a continuación.

35 Efectivamente, el mejoramiento genético inverso se puede realizar mediante la prevención de la recombinación meiótica combinada con métodos de aumento de la eficacia para la generación de las líneas parentales, que en una realización preferida tiene que ver con la producción de plantas dobles haploides y/o tecnologías de genotipificación molecular. Otros métodos son la restitución de segunda generación y la autopolinización. En este último caso, las plantas en las que se ha evitado o suprimido la recombinación se autofecundan para producir semillas de autofecundación. Las técnicas de genotipificación molecular se utilizan después para identificar las plantas homocigotas en la S1.

#### **Descripción detallada de la invención**

40 La invención se refiere de este modo a la prevención o supresión de la recombinación en un proceso para la producción de células haploides y a la producción de líneas homocigotas a partir de estas células.

45 Las células haploides pueden ser el resultado de la meiosis o se derivan de las células somáticas. En este último caso se pueden compuestos químicos utilizar para volver haploides las células. Alternativamente, se induce el agrupamiento reduccional. En el agrupamiento reduccional los cromosomas se distribuyen sobre las células hijas sin la ayuda de las fibras del huso y sin replicación del ADN. Después de la división celular se forman células haploides. El agrupamiento reduccional se puede inducir tratando el meristemo (raíz) o los protoplastos con un agente químico, tales como cafeína o mediante la neutralización de la diana genética del agente químico con un constructo génico. La expresión del constructo ha de ser inducible debido a que la expresión constitutiva del constructo neutralizador sería letal.

50 De acuerdo con la invención las células haploides deriva sin embargo preferiblemente de un proceso meiótico. El proceso de meiosis forma el evento fundamental en el ciclo de vida de las plantas vivas en el cual se crea la variación genética. Por otra parte marca la transición entre la generación diploide, esporofítica y la haploide, gametofítica que se alternan durante el ciclo de vida de una planta. La célula especializada en el órgano reproductor femenino que entra en meiosis, que se denomina célula madre de la megaespora, está incluida en el óvulo diferenciado dentro del ovario. Durante la formación del óvulo, varios eventos mitóticos conducen a la diferenciación de una sola célula madre de la megaespora por óvulo fuera de unas pocas células arqueosporiales que se desarrollan a partir de células hipodérmicas.

Dentro de los tejidos reproductivos masculinos (las anteras), un proceso similar conduce a la formación de las células madre de las microsporas aunque las células arquesporales experimentan varias rondas de mitosis antes de diferenciarse en células madre de las microsporas. Como consecuencia cada antera contiene un gran número de células madre de las microsporas.

- 5 Se han identificado unos pocos mutantes de maíz y *Arabidopsis* que tienen alteradas las funciones tempranas de estos procesos de diferenciación. El mutante *mac1* (células arquesporales múltiples) de maíz tiene alterado un gen que juega un papel en la retirada de las células hipodérmicas de la ruta mitótica a la meiótica (Sheridan, W.F. et al. (1999) *Genetics* 153, 933-941). El mutante *SPL* (sin esporocitos) de *Arabidopsis* tiene alterada la diferenciación de las células madre de la mega- y la microspora de las células arquesporales (Yang, WC, et al. (1999) *Genes Dev.* 13, 2108-2117).

Las células madre de las macro- y microsporas, denominadas colectivamente meiocitos, experimentan meiosis, lo que da como resultado la formación de cuatro esporas haploides por meiocito. Tres de las cuatro esporas femeninas o megasporas degeneran por medio del depósito de callosa. La megaspora superviviente se diferencia después de 3 divisiones nucleares y la posterior celularización en el gametofito femenino o saco embrionario.

- 15 Las cuatro esporas masculinas o microsporas por lo general permanecen juntas y forman una estructura denominada tétrada. Después de la diferenciación de los gametofitos masculinos a partir de las microsporas, la estructura de la tétrada se disuelve y los gametofitos masculinos o polen se comportan como entidades sueltas.

Aunque existen diferencias significativas en los procesos celulares que conducen a la formación de meiocitos femeninos y masculinos, así como a la diferenciación de las macro- y microsporas en un saco embrionario y polen, respectivamente, los eventos citológicos que se producen durante la meiosis femenina y masculina son muy similares lo que sugiere la participación de productos génicos comunes.

Sin embargo, esto no significa necesariamente que cada uno de los eventos durante la meiosis femenina y masculina esté controlado por loci genéticos idénticos. Por ejemplo, en *Arabidopsis* el gen *ASK1* está implicado específicamente en la meiosis masculina (Yang, M. et al. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 11416-11421), mientras que *SW11* (Motamayor, J.C. (2000) *Sex. Plant Reprod.* 12, 209-218), *DYAD* (Siddiqi, I. et al. (2000) *Development* 127, 197-207) y *ANTIKEVORKIAN* (Yang, WC. y Sundaesan (2000) *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 53-57) son específicos para la meiosis femenina.

Durante la meiosis se distinguen varias fases citológicas y para cada fase se han descrito varios mutantes en plantas.

- 30 Durante la fase inicial denominada Profase meiótica se distinguen varias fases. Durante la fase inicial denominada Leptotena, los cromosomas individuales que se han replicado y que consisten en dos cromátidas hermanas empiezan a condensarse y hacerse más cortos y más gruesos. Al mismo tiempo, la envoltura nuclear comienza a desintegrarse y los cromosomas homólogos comienzan a asociarse. La siguiente fase es la denominada Zigotena en la cual los cromosomas están completamente condensados y en la cual los cromosomas homólogos se alinean y empiezan a formar el llamado complejo sinaptonémico (SC). El mutante de *dif1/syn1* de *Arabidopsis* se ve afectado en la formación del SC (Bhatt, A.M. et al. (1999) *Plant J.* 19, 463-472; Bai, X. et al. (1999) *Plant Cell* 11, 417-430). Los productos del gen *DIF1/SYN1* son homólogos a la cohesina de levadura *REC8/RAD21* que funciona en la sinapsis y la recombinación. En la Paquitena se completa la formación del SC para todos los cromosomas. En esta fase meiótica se produce la recombinación, que es iniciada por la formación de roturas en la doble cadena seguidas de intercambio de cromátidas entre cromosomas homólogos. Las conexiones físicas que se establecen entre las cromátidas no hermanas y que persisten incluso en ausencia del complejo sinaptonémico se denominan quiasmas. Durante la Diplotena y Diacinesis los cromosomas se condensan completamente, la envoltura nuclear ha desaparecido y se han formado las fibras del huso. Posteriormente durante la Metafase I, los pares de cromosomas homólogos se localizan en el plano ecuatorial de la célula. A continuación, durante la anafase I, los cromosomas homólogos, cada uno de los cuales consiste en dos cromátidas hermanas que pueden haber experimentado varios eventos de recombinación y se mantienen unidos por un centrómero, se mueven hacia los polos celulares opuestos. Durante la Telofase I, se completa el movimiento polar, el huso desaparece y la célula empieza a dividirse.

Posteriormente, estas células entran en la profase II que se caracteriza por el alineamiento de los cromosomas condensados sobre el plano ecuatorial. Se está formando un complejo del huso. Durante la metafase II, los cromosomas están completamente alineados en el plano ecuatorial y se completa el complejo del huso. Durante la siguiente fase, denominada Anafase II, los centrómeros se dividen y las cromátidas hermanas se mueven hacia los polos opuestos. En la Telofase II se completa este proceso de movimiento, el complejo del huso comienza a desaparecer y se inicia la división celular. Con posterioridad, los cromosomas reanudan su apariencia de interfase caracterizada por cromosomas desenrollados situados en el interior de la envoltura nuclear.

- 55 El producto final de la meiosis II es un conjunto de cuatro células haploides genéticamente distintas, que pueden sufrir una mitosis para convertirse en gametofitos. Los gametofitos producen los gametos, que tras la fusión conducen a la formación de un cigoto, que se desarrolla en un embrión que puede crecer hasta el esporofito de la siguiente generación.

La variación genética, que se produce en el esporofito, se determina por los genotipos de los gametos femeninos y masculinos que se fusionan tras la formación del cigoto. Por lo tanto esta variación genética se crea durante la formación de las esporas hembra y macho durante la meiosis, que conduce al reordenamiento genético de los cromosomas parentales originales, así como de las regiones cromosómicas debido a eventos de recombinación.

- 5 La meiosis y la recombinación meiótica son procesos complejos que se han estudiado en diferentes grados, a diferentes niveles en diferentes plantas. El mecanismo molecular mediante el cual se produce la recombinación meiótica aún no está del todo claro. Un modelo es el modelo de reparación de ruptura de la doble cadena (DSB) de acuerdo con el cual la recombinación meiótica se inicia mediante la formación de roturas en la doble cadena (DSB) en una de las dos cromátidas no hermanas que interactúan. La formación de las DSB se inicia por una proteína.
- 10 Esta proteína se ha identificado en levadura y se denomina en la misma proteína SPO11. Se encontraron homólogos de la proteína de levadura SPO11 en *Schizosaccharomyces pombe* denominada REC12, *Arabidopsis*, *Drosophila*, *Caenorhabditis*, ratón y hombre. *Arabidopsis* es el único eucariota conocido hasta ahora que contiene 3 genes SPO11 parálogos. La homología, que reside dentro de las proteínas SPO11, se limita a cinco motivos conservados.
- 15 Junto a la formación de DSB, una actividad exonucleasa evocada por un complejo de proteínas en el que participan MRE11, RAD50 y XRS2/NBS1 de levadura, reseca los extremos 5' de la rotura en la dirección 3', lo que da como resultado 2 colas de cadena sencilla 3'-OH. Una de estas colas invade el ADN de doble cadena de la cromátida emparejada a través de emparejamiento de bases con la hebra complementaria. La invasión de la hebra involucra proteínas de tipo RecA, de las cuales DMC1 es específica para la recombinación meiótica. A través de un
- 20 mecanismo de reparación del ADN se forma un intermedio bimolecular que contiene dos uniones de Holliday que involucra las proteínas MSH4, MSH5 y MLH1 en levadura. Un sistema de resolución de la unión de Holliday, que contienen resolvasas, puede dar como resultado la conversión génica o el entrecruzamiento.

Se ha identificado un gran número de proteínas que están implicadas en este proceso que pueden ser específicas para la recombinación meiótica o pueden estar implicadas también en la DSB mitótica y la reparación de apareamientos erróneos. Los homólogos de muchas de estas proteínas están siendo identificados en sistemas vegetales como *Arabidopsis thaliana* y se han clonado los correspondientes genes. Los homólogos vegetales de la proteína SPO11 se han identificado en *Arabidopsis thaliana* y se denominan Atspo11 y AtDMC1 (Couteau, F. et al. (1999) Plant Cell 11, 1623-1634). Estos están implicados en la estabilización bivalente y la segregación cromosómica.

- 25 De acuerdo con la invención se ha de evitar o suprimir la recombinación en la planta de partida. Esta prevención o supresión se pueden conseguir en varios niveles del evento de recombinación. No se puede producir recombinación cuando no se producen roturas de la doble cadena, cuando el entrecruzamiento se deteriora y cuando los cromosomas no se pueden emparejar. En todos estos eventos están involucrados varios genes. El deterioro de la función de uno o más de estos genes conduce a la prevención (activación/desactivación) o supresión (nivel inferior)
- 30 de la recombinación. Para el propósito de esta solicitud, dichos genes se denominan "genes diana (candidato)".

La interferencia en la función de estos genes se puede lograr a través de varios enfoques que se basan o en mecanismos de silenciamiento génico dependientes de la homología tales como la co-supresión, la regulación a la baja con antisentido o interferencia por ARN o que se basan en la expresión de proteínas que interfieren en la funcionalidad de la proteína diana. El último método es, por ejemplo, la regulación a la baja por medio de un enfoque negativo dominante.

En caso de que se haga uso de un enfoque de silenciamiento génico dependiente de la homología, el constructo génico que se utilice para lograr el efecto de silenciamiento debe contener un fragmento de ADN que tenga un porcentaje de identidad a nivel de nucleótidos con una región del gen diana que sea suficiente para regular a la baja este gen diana en la medida en que de como resultado la formación de esporas haploides viables, que contengan un conjunto completo de cromosomas que no haya sido sometido a recombinación meiótica o que haya sido sometido a una reducción de la frecuencia de recombinación meiótica en comparación con la situación en la que los genes diana no están regulados a la baja. Este resultado se puede lograr ya sea después de seleccionar un fragmento al azar del gen o mediante la selección de aquellos segmentos del gen como fragmento de silenciamiento que codifican los dominios conservados de la proteína codificada.

En caso de que no haya un porcentaje suficiente de identidad entre el fragmento de ADN de silenciamiento y una región específica del homólogo funcional del gen que reside en el genoma de una especie de cultivo dada para alcanzar un nivel suficiente de regulación a la baja, se puede utilizar un fragmento del homólogo funcional del propio gen para lograr la regulación a la baja de este homólogo funcional en la especie de cultivo de la que ha sido obtenido.

Los homólogos funcionales, que residen en otras especies de cultivo, pueden ser regulados a la baja utilizando el fragmento de ADN de silenciamiento si hay suficiente homología.

En una realización preferida de la invención, la modificación de los genes diana se logra mediante ingeniería genética de las especies de cultivo. La naturaleza de la modificación del gen diana puede ser o bien la regulación a

la baja, lo que significa que la expresión del gen diana es una expresión (al alza) reducida o ectópica, lo que significa que la expresión del gen diana se incrementa, y, opcionalmente que tiene lugar en un momento diferente al de la expresión natural. En el caso de la expresión (al alza) ectópica el gen diana implicado en la recombinación tiene una función represora.

- 5 Con el fin de regular a la baja un gen diana, se pueden utilizar varios métodos que se basan en la homología con el gen diana.

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, la prevención o supresión de la recombinación se pueden lograr induciendo cambios al azar en el genoma de la planta y seleccionando aquellos mutantes que han incorporado un cambio en el gen diana que conduce a la supresión o prevención deseadas de la recombinación.

- 10 En una realización preferida de este aspecto de la invención, la modificación de los genes diana se logra mediante mutagénesis de la especie de cultivo. Las mutaciones al azar se pueden introducir en el genoma de una planta mediante métodos químicos como el tratamiento con metanosulfonato de etilo o nitrosometilurea,+++ (BioWorld Today (2000), 11 (108), 1-2) o métodos físicos, como la irradiación UV, la exposición de neutrones rápidos o la mutagénesis por inserción usando transposones o ADN-T. Se pueden introducir mutaciones específicas en un  
15 genoma vegetal por medio 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, A.C. y Hooykaas, P.J.J. (1999) Crit. Rev. Plant Sci. 18, 1-31) o inducción de mutaciones basada en oligonucleótidos (Oh, T.J. y May, G.D. (2001) Curr. Opin. Biotechnol. 12, 169-172).

- 20 Las plantas en las que se muta el gen diana se pueden identificar fácilmente mediante métodos de escrutinio como TILLING (Colbert, T. (2001) Plant Physiol. 126, 480-484) o DELETAGENE (Li, X. et al. (2001), 12ª Conferencia internacional sobre investigación de Arabidopsis (Resumen Núm. 2)), que permiten detectar aberraciones que residen dentro del gen diana.

- 25 Preferiblemente se selecciona un mutante en el que la modificación del gen diana es condicional, lo que significa que el fenotipo mutante solamente se pone de manifiesto tras la exposición de la planta a una condición medioambiental específica como una temperatura específica. Esto permite inducir la modificación solamente mediante la exposición de la planta al entorno específico. En las condiciones en las que la modificación no es manifiesta, se puede utilizar el mutante para cruzamiento normal y la producción de semillas.

- 30 En otra realización preferida más de la invención, la modificación de los genes diana también se puede lograr mediante el tratamiento de la especie de cultivo con compuestos químicos específicos que a través de la interferencia con los productos de los genes diana da como resultado la inhibición o reducción de la recombinación meiótica. Un ejemplo de tal compuesto químico es el etopósido que por medio de la inhibición la topoisomerasa II da como resultado la inhibición de la recombinación meiótica (Russell, L.B. et al. (2000) Mutat. Res. 464, 201-212).

- 35 En otra realización preferida más de la invención, la aneuploidía puede ser inducida químicamente mediante tratamiento de las células pre-meióticas con ciertos compuestos químicos. Esto se puede realizar mediante tratamiento químico de yemas florales que contienen estas células pre-meióticas mediante inmersión o pulverización. Tal método se puede aplicar eficazmente para modificar la recombinación meiótica como se ha mostrado en la solicitud de patente WO0054574. El mecanismo por medio del cual un compuesto químico induce aneuploidía no siempre está claro, pero existe evidencia experimental de que se puede producir la aneuploidía por  
40 medio de la interferencia con el mecanismo del huso durante la mitosis y la meiosis, la función del fragmoplasto y la formación de quiasmas. El compuesto químico que se puede aplicar para inducir aneuploidía se selecciona entre, pero no está limitado a, compuestos químicos tales como etopósido, podofilina, benomilo, hidrazida maleica, atrazina, butaclor, APM, griseofulvina, vinblastina-sulfato, diazepam, colchicina, cloruro de cadmio, econazol, pirimetamina, tiabendazol, timerozal o nocodazol. Los detalles adicionales sobre los compuestos químicos que inducen aneuploidía y su modo de acción así como su concentración eficaz se pueden encontrar en CBSR Sharma  
45 (1990) Mutagenesis 5, 105-125 y las referencias de la misma, así como en Sandhu et al. (1991) Mutagenesis 6, 369-373.

- La regulación a la baja del gen diana también se puede lograr a través de un método conocido como tecnología antisentido. En este método, que no es parte de la presente invención reivindicada en la presente memoria, un gen se expresa en su orientación inversa con respecto a un promotor de la transcripción. Esto se puede lograr mediante  
50 la introducción de un constructo génico en el genoma de una planta en la que el segmento de un gen, que normalmente se expresa como ARN, se invierte en su orientación relativa con respecto a un promotor transcripcional. Por lo general, tal constructo se denomina constructo antisentido. Tras la expresión del constructo antisentido en una planta, la planta produce moléculas de ARN que son sintetizadas usando la hebra codificante del constructo génico como molde y por lo tanto son complementarias a la cadena codificante. Por lo general, este tipo de ARN se denomina ARN antisentido. El resultado de la expresión de un constructo antisentido es que el gen o los genes que residen en la misma planta y que después de la expresión conducen a la síntesis de ARN complementario al ARN antisentido son silenciados eficazmente.  
55

La regulación a la baja del gen diana también se puede lograr a través de un método conocido como tecnología de



co-supresión. En este método un gen se expresa en la orientación efectora con respecto a un promotor de la transcripción. Esto se puede lograr mediante la introducción de un constructo génico en el genoma de una planta en la que el segmento de un gen que normalmente se expresa como ARN tiene la misma orientación relativa con respecto a un promotor de la transcripción que en un gen nativo. Por lo general, tal constructo se denomina constructo de co-supresión o de co-supresión efectora.

Tras la expresión del constructo de co-supresión en una planta, la planta produce moléculas de ARN que se sintetizan usando la cadena no codificante del constructo génico como molde y por lo tanto son complementarias a la cadena no codificante. Por lo general, este tipo de ARN se denomina ARN de co-supresión. El resultado de la expresión de un constructo de co-supresión es que el gen o los genes que residen en la misma planta y que después de la expresión conducen a la síntesis de ARN homólogo son silenciados eficazmente.

Otro modo de lograr la regulación a la baja del gen diana que no es parte de la invención actualmente reivindicada es a través de un método conocido como interferencia por ARN (ARNi). La ARNi es un término general que se refiere a un fenómeno en el que las moléculas de ARN de doble cadena (ARNdh) median de manera muy eficaz el silenciamiento génico de genes con homología con el ARNdh. El silenciamiento de un gen endógeno provocado por ARNdh es el resultado del silenciamiento génico post-transcripcional que es un fenómeno en el cual se sintetiza un transcrito de ARN y se degrada rápidamente y específicamente. Se ha demostrado inicialmente que la ARNi opera en *Caenorhabditis elegans* (Fire, A. et al. (1998) Nature 391, 806-811). También se ha demostrado que la ARNi es eficaz en otros organismos, incluyendo plantas (Chuang, C-F. y Meyerowitz, E.M. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 4985-4.990). Se demostró que los transgenes diseñados para expresar ARN que es auto-complementario y de ese modo capaz de formar ARN dúplex o en horquilla eran altamente eficaces en el desencadenamiento de resistencia a virus y el silenciamiento génico (Smith, N.A. et al. (2000) Nature 407, 319-320).

La supresión del gen diana se puede lograr por medio del silenciamiento transcripcional específico del gen diana a través del promotor. Esto se puede lograr por medio de la expresión de un constructo de ARNi que da como resultado la síntesis de moléculas de ARN de doble cadena cuya secuencia de nucleótidos es idéntica a una parte de la región promotora del gen diana. La región promotora de un gen se encuentra aguas arriba (con respecto a la dirección de la transcripción) de la posición en la que se inicia la transcripción del gen.

La supresión del gen diana también se puede lograr a través de una metodología generalmente conocida como silenciamiento génico inducido por virus o VIGS (Ratcliff et al. (2001) Plant J. 25, 237-245). En tal enfoque se logra un silenciamiento génico eficaz y específico mediante la infección de una planta con un virus vegetal que porta un inserto que es homólogo al gen que debe ser silenciado. La ventaja de los sistemas VIGS es que no hay necesidad de desarrollar un protocolo de transformación de plantas para la especie de planta para las que se persigue el silenciamiento de un gen diana.

El constructo de silenciamiento (ARN antisentido, co-supresión, ARNi o constructo en horquilla o vector VIGS) contiene por ejemplo un fragmento de ADN que es idéntico a la secuencia diana (gen o promotor) que debe ser silenciada. Sin embargo, el porcentaje de identidad también puede variar entre 50 y 100%, preferentemente entre 60 y 100%, más preferiblemente entre 70 y 100%, incluso más preferiblemente entre 80 y 100%, lo más preferiblemente entre 90 y 100%.

La longitud del fragmento de ADN en el constructo de silenciamiento debe ser de al menos 20 nucleótidos, pero también puede ser más largo hasta un máximo de la longitud de la secuencia diana completa que debe ser silenciada.

El promotor de la transcripción que se utiliza para sintetizar la molécula de silenciamiento puede ser un promotor constitutivo o un promotor que está regulado evolutivamente. El promotor también puede ser inducible, por ejemplo, por un compuesto químico.

Preferiblemente, pero no necesariamente, la expresión del constructo de silenciamiento y el gen diana que deben ser silenciados coincide. Esto no se aplica al silenciamiento mediante el promotor de un gen ya que este enfoque se dirige a evitar la transcripción de modo que no se forme transcrito. Las otras técnicas neutralizan el producto de transcripción después de su producción.

La supresión del gen diana se puede lograr además por medio del silenciamiento específico del gen diana mediante la introducción de oligonucleótidos de ARN (Tijsterman et al. (2002) Science 295, 694-697). Esto se puede lograr por medio de síntesis química de oligonucleótidos de ARN cuya secuencia de nucleótidos es idéntica a una parte de la región promotora o la región transcrita de un gen diana y la introducción de los oligonucleótidos de silenciamiento en la célula. En este método no hay necesidad de adoptar una ruta transgénica para lograr el mejoramiento genético inverso para un cultivo diana específico.

Como en otros métodos que utilizan mecanismos de silenciamiento génico dependientes de la homología, el oligonucleótido de ARN que se utiliza para silenciar un gen diana tiene preferiblemente una secuencia de nucleótidos que es idéntica a una parte del promotor o la región transcrita del gen diana que se necesita silenciar. No obstante el porcentaje de identidad también puede oscilar entre 50 y 100%, preferentemente entre 70 y 100%, incluso más preferiblemente entre 80 y 100%, lo más preferiblemente entre 90 y 100%. El oligonucleótido de ARN de

cadena sencilla puede ser idéntico a la hebra efectora o antisentido del ADN de la región promotora o transcrita de un gen diana. Alternativamente, en lugar de utilizar oligonucleótidos de ARN de cadena sencilla, se pueden utilizar oligonucleótidos de ADN de cadena sencilla cuya secuencia de nucleótidos está diseñada como si fuera un oligonucleótido de ARN. Por otra parte se pueden utilizar oligonucleótidos tanto de ARN como de ADN de doble cadena.

Los oligonucleótidos se pueden introducir en las plantas o células vegetales mediante métodos bien conocidos por el experto en la técnica. Estos pueden incluir, pero no se limitan a absorción mediada por polietileno en protoplastos o absorción mediada por pistola de partículas en las plantas o partes de plantas.

Cuando en otro método que no es parte de la invención reivindicada en la presente memoria se persigue la supresión de los genes diana a través de un método basado en homología como la interferencia por ARN, VIGS, oligonucleótidos u otros, se lleva a cabo una búsqueda de secuencias que sean homólogas a la secuencia diana y que residan dentro del genoma de la especie que se va a someter a la supresión o la prevención de la recombinación. Se pretende que "homólogo" represente aquí "que tiene un nivel de identidad con el fragmento de ácido nucleico que se utiliza para efectuar la supresión basada en la homología del gen diana que conduce a la supresión de las secuencias fuera del gen diana". En caso de que se encuentren tales secuencias, puede ser deseable utilizar otro fragmento del gen diana para el diseño de la secuencia de silenciamiento con el fin de evitar la interferencia con otras partes del genoma.

La supresión de la actividad del gen diana también se puede conseguir a través de la expresión en exceso de un constructo dominante negativo, un proceso bien conocido por el experto en la técnica. En tal enfoque se expresa en exceso un gen que codifica una proteína o proteína modificada en la especie de cultivo en la que se necesita suprimir un gen diana de acuerdo con la presente invención. El gen que codifica tal proteína se denomina por lo general un gen dominante negativo ya que el efecto de la expresión (en exceso) se hereda como un factor genético dominante y está causando una pérdida específica de función. El promotor de la transcripción que se utiliza para sintetizar el constructo dominante negativo puede ser un promotor constitutivo o un promotor que está regulado evolutivamente. El promotor del constructo dominante negativo también puede ser inducible, por ejemplo, por un compuesto químico.

La expresión del constructo dominante negativo y el gen diana que necesita ser suprimido debe estar regulada espacialmente y temporalmente de manera que el gen diana sea suprimido con eficacia. Preferiblemente, pero no necesariamente, el promotor del constructo dominante negativo y el gen diana están regulados de manera que se expresen esencialmente en la misma parte de la planta esencialmente al mismo tiempo.

La supresión de los genes diana también se puede lograr a través de la expresión en exceso de un supresor natural del gen diana, que no es parte de la invención reivindicada en la presente memoria. Tal supresor puede ser un factor de transcripción que actúa negativamente que actúa sobre el promotor de los genes diana o una proteína que interactúa con el producto génico de los genes diana, de tal manera que este producto génico no puede cumplir su función natural. La expresión de un constructo supresor y del gen diana que necesita ser suprimido debe estar regulada espacialmente y temporalmente de manera que el gen diana sea suprimido eficazmente. Preferiblemente, pero no necesariamente, el promotor del constructo supresor y el gen diana están regulados de una manera muy similar en términos de su actividad espacial y temporal, esto es, se expresan esencialmente al mismo tiempo en la misma parte de la planta. El promotor del constructo supresor también puede ser inducible, por ejemplo, por un compuesto químico.

Se puede utilizar un constructo de silenciamiento que modifica un gen diana que da como resultado específicamente la supresión de la recombinación meiótica femenina o masculina. Esto se puede lograr al interferir con la actividad de un producto génico que es específicamente activo en la recombinación meiótica femenina o masculina. Alternativamente, esto se puede lograr mediante el uso de un constructo de silenciamiento que es específicamente activo durante la meiosis femenina o masculina. El último tipo de constructo puede interferir con un gen diana que está implicado específicamente en la recombinación meiótica femenina o masculina o un gen diana que está implicado en la recombinación meiótica tanto femenina como masculina.

Esta realización específica de la invención tiene utilidad práctica cuando la supresión de la recombinación meiótica conduce a una reducción de la calidad de las esporas, tal como un número reducido de esporas haploides funcionales. Se pueden utilizar plantas que tienen la recombinación meiótica femenina suprimida, pero no la recombinación meiótica masculina como polinizadores eficaces para producir nuevos híbridos y viceversa, se pueden utilizar plantas que tienen la recombinación meiótica masculina suprimida como líneas femeninas eficaces durante la producción de los nuevos híbridos.

En caso de utilizar enfoques transgénicos para la prevención o supresión de la recombinación, se pueden elaborar los denominados constructos génicos quiméricos usando mecanismos de clonación molecular convencionales bien conocidos por los expertos en la técnica y que se pueden encontrar por ejemplo en Sambrook, J y Russell, D.W.: Molecular Cloning, a laboratory manual (tercera edición), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York. Tales constructos son quimérico "en el sentido de que consisten en diversos fragmentos de ADN que se originan a partir de diversas fuentes.

- Los constructos quiméricos que se elaboran para modificar la actividad, en particular, la transcripción o la traducción, pero también para el procesamiento de los transcritos, la modificación de las proteínas, el redireccionamiento de proteínas, la formación y la actividad de complejos de los genes diana comprenden normalmente una secuencia promotora y una secuencia señal de poliadenilación que están conectadas operablemente al fragmento de ADN que está siendo utilizado para lograr la supresión de la recombinación meiótica de manera que se produzca un constructo génico quimérico funcional.
- Con el fin de transferir un constructo génico quimérico al genoma de una planta, se preparan vectores de transformación utilizando mecanismos de clonación molecular convencionales bien conocidos por el experto en la técnica y que se pueden encontrar, por ejemplo, en Sambrook, J. y Russell, D.W.: *Molecular Cloning, a laboratory manual* (tercera edición), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.
- Las secuencias promotoras que se pueden utilizar de acuerdo con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, promotores constitutivos como el promotor 35S de CaMV (Odell, J.T. et al. (1985), *Nature* 313, 810-812), el promotor de Actina 2 de *Arabidopsis* (An, Y.Q. (1996) *Plant J.* 10, 107-121), el promotor de Ubicuitina 1 del maíz (Drakakaki, G. et al. (2000) *Transgenic Res.* 9, 445-452), el promotor de actina 1 del arroz (McElroy, D. et al. (1990) *Plant Cell* 2, 163-171) y el promotor de Farnesil difosfato sintasa 1S de *Arabidopsis* (Cunillera, N. et al. (2000) *Plant Molec. Biol.* 44, 474-485) o promotores regulados evolutivamente como el promotor de Actina 11 de *Arabidopsis* (Huang, S. et al. (1997) *Plant Molec. Biol.* 33, 125-139), el promotor DMC1 de *Arabidopsis* (Klimyuk, V.I. y Jones, J.D. (1997) *Plant J.* 11, 1-14) o el promotor SPO11-1 de *Arabidopsis* (Grelon, M. (2001) *EMBO J.* 3, 589-600).
- Otros promotores regulados evolutivamente se pueden obtener del propio gen diana.
- Los sistemas promotores inducibles que se pueden utilizar son el sistema interruptor génico inducible por etanol (Caddick, M. X. et al. (1998) *Nat. Biotechnol.* 16, 177-180) y el sistema inducible por glucocorticoides (Schena, M. et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 10421-10425).
- Las secuencias de poliadenilación que se pueden utilizar en los constructos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a la señal de poliadenilación de la octopina sintasa de *Agrobacterium* (MacDonald et al. (1991) *Nucleic Acids. Res.* 19, 5575-5581), La señal de poliadenilación de la ribulosa bisfosfato carboxilasa de guisante (Hunt, A.G. y MacDonald M.H. (1989) *Plant Molec. Biol.*).
- Después del tratamiento de las yemas florales con el compuesto químico que induce aneuploidía, las esporas se pueden aislar a partir de las yemas tratadas que pueden ser inducidas a regenerarse. Las plantas homocigotas se pueden obtener a través de la duplicación del número de cromosomas p. ej., mediante tratamiento con colchicina en caso de que no haya tenido lugar ya la duplicación espontánea. La población de plantas dobles haploides obtenida a través de este método se puede analizar para determinar la presencia de una dotación completa de cromosomas mediante detección molecular de alelos marcadores que se sabe que residen en un cromosoma específico.
- La ginogénesis es particularmente adecuada para la aplicación del mejoramiento genético inverso efectuado mediante tratamiento químico. Utilizando tal método, el producto químico específico se puede aplicar a través del medio de cultivo tisular usado para aplicar la ginogénesis. También puede ser posible tratar los ovarios esterilizados directamente con el compuesto químico que evita la recombinación meiótica. La razón para que esta forma particular de ginogénesis sea adecuada para el mejoramiento genético inverso es que todavía está teniendo lugar en algunos, si no en todos los óvulos de los tejidos de ovario tomados como explante para el cultivo de tejidos para la ginogénesis.
- Otras técnicas de cultivo que permiten la manipulación *in vitro* antes de la fase en la que tiene lugar la recombinación meiótica también son adecuadas para uso en la invención.
- En lo anterior los haploides eran el resultado de la meiosis. Sin embargo, también es posible comenzar con células somáticas para la producción de células haploides.
- En consecuencia, en otra realización preferida más de la invención, se puede lograr la generación de plantas que contienen cromosomas parentales originales no recombinados mediante el tratamiento de las plantas, órganos de plantas o células vegetales con compuestos químicos como la cafeína que da como resultado la separación cromosómica dentro de una célula sin la ayuda de las fibras del huso. En la mayoría de los casos, los cromosomas se separan uniformemente en dos grupos que después de la citocinesis conduce a células haploides. Los cromosomas en estas células se pueden duplicar p. ej., por medio de colchicina en caso de que no se haya producido todavía la duplicación espontánea y regenerar plantas.
- A medida que los cromosomas se separan sin recombinación, su constitución es todavía la misma que en el progenitor original. Por otra parte, a medida que se forman las células haploides, la duplicación del número de cromosomas conduce a plantas completamente homocigotas. Sin embargo la distribución de los cromosomas es al azar y por lo tanto las plantas homocigotas resultantes pueden contener todas las posibles combinaciones de pares cromosómicos paternos y maternos.
- Este método es una realización específica del mejoramiento genético inverso en donde se utilizan células somáticas

para producir células progenitoras que contienen un número haploide de cromosomas que no están recombinados. Este método es por lo tanto una forma de mejoramiento genético inverso en la que no hay necesidad de suprimir la recombinación meiótica. Esto demuestra que el mejoramiento genético inverso es un concepto de mejoramiento genético novedoso que se puede efectuar mediante enfoques aparentemente diferentes.

- 5 Una vez que se ha preparado un constructo de silenciamiento, que tras la expresión en una especie de cultivo diana modifica la expresión de los genes de una manera cuantitativa y/o cualitativa que puede dar como resultado la formación de esporas haploides viables, que contienen un conjunto completo de cromosomas que no han sido sometidos a recombinación meiótica o que han sido sometidos a una reducción de la frecuencia de recombinación meiótica en comparación con la situación en la que estos genes no están modificados, tal constructo necesita ser transformado en la especie de cultivo que se va a tratar.

Actualmente existen muchas tecnologías diferentes que permiten la liberación, la integración estable y la expresión de moléculas de ADN en el genoma de las plantas. Estas tecnologías de transformación de plantas necesitan ser combinadas con las tecnologías de cultivo de tejidos apropiadas con el fin de regenerar una célula vegetal que ha sido transformada con un constructo genético específico en una planta transgénica.

- 15 Una tecnología bien conocida de transformación de plantas se basa en la capacidad natural de una especie bacteriana denominada *Agrobacterium tumefaciens* para liberar e integrar de forma estable un segmento de ADN en el genoma de una célula vegetal (Zambryski, P. et al. (1989) Cell 56, 193-201). Esta porción de ADN, denominada ADN-T, normalmente se encuentra en un plásmido que reside dentro de la célula bacteriana. El ADN-T natural no contiene funciones importantes para la liberación o la integración del ADN y puede ser en principio cualquier ADN.
- 20 El plásmido que contiene el ADN-T puede ser un vector binario (Bevan, M. (1984) Nucleic Acids Res. 12, 8711-8721) o un vector co-integrado (Fraley, RT et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 4803-4807).

Las células de *Agrobacterium* que contienen un vector de transformación vegetal se pueden co-cultivar con explantes derivados de hojas o plantas de semillero con el fin de liberar el ADN-T en las células presentes en el explante. (Horsch, R. et al. (1985) Science 227, 1229-1231).

- 25 La incubación de los explantes en medio de cultivo de tejidos da como resultado la regeneración de las células presentes en el explante a través de organogénesis o embriogénesis. En muchos sistemas esta etapa regenerativa está precedida por una fase de callo que tiene una longitud variable. Por lo general, el ADN-T contiene un gen marcador seleccionable que tras la expresión en la célula vegetal transformada puede conferir resistencia a un compuesto fitotóxico como los antibióticos kanamicina o higromicina o los herbicidas glifosato o glufosinato-amonio.
- 30 La adición de estos compuestos fitotóxicos al medio de cultivo de tejidos durante la regeneración de las células de los explantes impide un crecimiento excesivo de las células no transformadas o de las células transformadas que no expresan el gen marcador seleccionable en una medida insuficiente.

- Si siguiendo este principio se han desarrollado muchos protocolos de transformación para diferentes especies de cultivo como la patata (De Block, M. (1988) Theoretical and Applied Genetics 76, 767-774), lechuga (Michelmore, R. (1987) Plant Cell Reports 6, 439-442), tomate (McCormick, S. (1986) Plant Cell Reports 5, 81-84), pimiento, pepino (Trulson, A (1986) Theoretical and Applied Genetics 73, 11-15), zanahoria (Scott, R.J. y Draper, J. (1987) Plant Molecular Biology 8, 265-274), coliflor (De Block, M. (1988) Plant Physiol. 91, 694-701), brécol (Christy, M.C. y Earle, M.D. (1989) Austrian Society of Plant Physiologists, 29ª Reunión Anual, Resumen 40), berenjena (Guri, A. y Sink, K.C. (1988) J. of Plant Physiol. 133, 52-55), remolacha azucarera (Gasser, C.S. y Fraley, R.T. (1989) Science 244, 1293-1299), espárrago (Conner, A. J. et al. (1988) Ninth Australian Plant Breeding Conference, Proceedings. Agricultural Research Institute, Wagga Wagga, páginas 131-132), girasol (Bidney, D. (1992) Plant Mol. Biol. 18, 301-313), Colza (Thomzik J.E. (1995) Methods Mol. Biol. 44, 77-89), maíz (Ishida, Y (1996) Nat. Biotechnol. 14, 745-750), trigo (Cheng, M. et al. (1997) Plant Physiol. 115, 971-980), arroz (Chan, MT (1993), Plant Molec. Biol. 22, 491-506).

- Los métodos alternativos para llevar a cabo la transformación vegetal incluyen la transformación de protoplastos en los que la liberación de ADN está mediada por calcio, polietilenglicol, o electroporación (Pazkowski et al. (1984) EMBO J. 3, 2717-2722; Potrykus et al. (1985) Molec. Gen. Genet. 199, 169-177; Fromm et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 5824-5828; Shimamoto (1989), Nature 338, 274-276). Otros métodos incluyen la transformación mediada por filamentos de carburo de silicio (Dunwell, J.M. (1999) Métodos Mol. Biol. 111, 375-382), Microinyección (Holm, P.B. et al. (2000) Transgenic Res. 9, 21-32) o biolística (Klein et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 4305-4309; Becker, D (1994) Plant J. 5, 299-307). Todos estos métodos son útiles en la presente invención.

- Los transformantes de los cultivos que adquirieron un constructo de silenciamiento se identifican inicialmente por su fenotipo de resistencia al agente selectivo que se ha utilizado para obtener la regeneración selectiva de las células transgénicas que expresan el gen marcador seleccionable. Posteriormente, los transformantes resistentes se caracterizan adicionalmente molecularmente para investigar el patrón de integración del ADN transformado. Muchas de las técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o la transferencia Southern se encuentran disponibles para llevar a cabo tal análisis y son bien conocidas por los expertos en la técnica (véanse, por ejemplo, las técnicas descritas por Sambrook, J. y Russell, D.W.: Molecular Cloning, a laboratory manual (tercera edición, 2001), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York). Aquellos transformantes que contienen una sola copia intacta del ADN transformado se seleccionan preferiblemente para su posterior análisis.

Sin embargo, los transformantes que contienen múltiples copias del ADN transformado también pueden ser útiles. Con el fin de analizar si el ADN transformado en el genoma de un transformante es expresado, se pueden analizar el transformante para determinar el ARN o la especie de proteína que se espera que estén modificados como consecuencia de la presencia del ADN transformado.

- 5 Los mecanismos bien conocidos por los expertos en la técnica permiten analizar la planta transgénica para determinar la expresión del gen introducido o el efecto que la expresión del gen introducido tiene sobre la expresión de un gen diana por medio de transferencia Northern, RT-PCR, hibridación in situ, micromatrices, transferencia Western, análisis de actividad enzimática.

También se pueden producir cambios fenotípicos que se ocasionan como consecuencia de la modificación de la expresión de un gen diana, pero éste no es necesariamente el caso. El hecho de que la supresión de la recombinación meiótica a través de regulación a la baja de un gen diana pueda dar lugar a cambios fenotípicos se ilustra mediante el ejemplo de una mutación por desactivación en el gen *Atspo11-1* de *Arabidopsis* (Grelon, M. et al. (2001) EMBO J. 20, 589-600). Como consecuencia de la expresión reducida o nula del gen *Atspo11-1* en *Arabidopsis*, disminuye gravemente la formación de bivalentes al final de la profase I meiótica. Esto puede explicarse por el supuesto de que la estabilización de los bivalentes se reduce como consecuencia de la ausencia de eventos de entrecruzamiento meióticos y de ese modo de quiasmas. A pesar de esta anomalía, los cromosomas de este mutante de *Arabidopsis* segregan durante la meiosis, aunque en dirección aleatoria que da como resultado muchos gametos no funcionales desequilibrados. Esto se puede observar macroscópicamente por el hecho de que tales plantas mutantes son semi-estériles, es decir se produce una fuerte reducción de polen funcional en los sacos embrionarios y por lo tanto la muestra de semillas se reduce drásticamente. Como este fenotipo de fertilidad reducida puede ser fácilmente observado a nivel de toda la planta, este fenómeno permite identificar plantas en las que se ha modificado un gen diana a través de ingeniería genética, mutagénesis o tratamiento químico. Aunque este efecto fenotípico se encontró en este ejemplo concreto, no necesita producirse siempre necesariamente en la misma medida tras la modificación de éste u otros genes diana en otros sistemas. En caso de que se produzca semi-esterilidad como consecuencia de la modificación de los genes diana en la forma que se ha descrito para *Atspo11-1* en *Arabidopsis*, el número de gametos funcionales es relativamente inferior como una función del número de cromosomas haploides.

El porcentaje de gametos funcionales se puede estimar mediante la fórmula  $(1/2)^n \times 100\%$  en la que n es el número cromosómico haploide. En caso de que la limitación en la producción de semilla se determine por los gametos femeninos, el porcentaje de semillas que se forman se puede calcular mediante la misma fórmula. En el caso de cultivos como el pimiento dulce (*Capsicum annuum* L.) con 12 cromosomas haploides que muestran el mismo fenotipo tras la regulación a la baja del homólogo funcional de *Atspo11-1*, tal planta produce solamente  $1/4096 \times 100\% = 0,024\%$  de semillas viables. Esta baja cantidad de semillas viables pone en peligro la aplicabilidad industrial de la supresión de la recombinación meiótica en el fitomejoramiento. Este problema puede ser aliviado mediante la regeneración de las esporas de las plantas en las que se suprime la recombinación meiótica en plantas dobles haploides.

Por lo tanto, de acuerdo con otro aspecto de la invención la producción de DH se utiliza para mejorar la eficacia del presente método. La producción de plantas diploides a partir de esporas haploides es una técnica de cultivo de tejidos que se utiliza ampliamente en el mejoramiento genético de plantas para acelerar la producción de plantas que son completamente homocigotas. Normalmente, esta tecnología se conoce como tecnología doble haploide o DH. En una planta haploide o monoploide, solamente un genoma está presente una vez. Esto significa que todos los genes están presentes en un estado hemizigoto. En las plantas inferiores, la haploidía puede ser el estado predominante, tal es el caso en el gametofito de los musgos. En las plantas de cultivo sin embargo, la haploidía no es el estado predominante, excepto para los gametofitos inconspicuos y parásitos, el grano de polen, el tubo de polen, y el saco embrionario.

Plantas haploides son generalmente estériles debido a los cromosomas univalentes. Sin embargo, los dobles haploides que se obtiene mediante duplicación espontánea del contenido cromosómico haploide o que se logran por otros medios tales como agentes de duplicación de cromosomas se encuentran entre las herramientas más valiosas en el fitomejoramiento. Las plantas dobles haploides son genéticamente homocigotas y por lo tanto las líneas de mejoramiento genético puras finales que teóricamente solo se pueden alcanzar mediante muchas generaciones de endogamia.

Una planta haploide se desarrolla a partir de células haploides procedentes de un óvulo no fertilizado (ginogénesis), o células haploides procedentes de anteras (androgénesis). La frecuencia de haploides naturales es bastante baja, aproximadamente 1 por 1.000 en el caso de la partenogénesis y aproximadamente 0,1 por 1.000 en el caso de la androgénesis. Debido a la baja eficacia de los haploides de origen natural, se han trabajado en los últimos años métodos de cultivo de tejido *in vitro* para proporcionar a los criadores de plantas un número suficiente de dobles haploides con el fin de sustituir parcial o totalmente la endogamia. Los cultivos de anteras y microsporas son técnicas bien establecidas que se utilizan para la producción de líneas homocigotas en muchas especies de cultivo, tales como el maíz (*Zea mays* L.): Gaillard et al. Plant Cell Reports: 10: 55-58 (1991), el arroz (*Oryza sativa* L.): Raina et al. Plant Cell Reports: 6: 43-45, (1987), la colza (*Brassica napus*): Keller W. Armstrong y K.Z. Pflanzenzüchtung 80, 100-108 (1978), la cebada (*Hordeum vulgare* L.): Ziauddin et al. Plant Cell Reports 9: 69-72

(1990), la berenjena (*Solanum melongena* L.): Tuberosa R. et al. *Genet. Agr.* 41; 267-274 (1987), el brécol (*Brassica oleracea* var. *Itálica*): Takahata Y. y Keller W. *Plant Science*, 74, 235-242 (1991), el cártamo (*Carthamus tinctorius* L.): *Plant Cell Reports* 10: 48-51 (1991), el espárrago (*Asparagus officinalis*) Pelletier G. et al. *CR Ac. Sci. Paris. Ser. D* 274, 848-851 (1972).

5 Los haploides y dobles haploides también se pueden obtener a partir de células gametofíticas del ovario en la cebada (*Hordeum vulgare* L.) (San Noeum L. (*Ann. Amelior. Plantes* 26, 751-754 (1976)). La producción de dobles haploides por medio de células de ovario es adecuada para especies de cultivo que son en muchos casos no son susceptibles de cultivo de anteras o microsporas. Los ejemplos son el girasol (*Helianthus annuus* L.) Gélébart P. y San L. *Agronomie*, 7, 81-86 (1987), la remolacha azucarera (*Beta vulgaris* L.) Hosemans D y Bossoutrot D. *Z. Pflanzenzucht* 91: 74-77 (1983), el melón (*Cucumis melo* L.) Cuny et al. *Agronomie*, 12, 623-630 (1992), la sandía (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Sari N et al. *Scientia Horticulturae* 82, 265-277 (1999), el pepino (*Cucumis sativus* L.) Dirks R. Patente de los Estados Unidos Núm. 5.492.827 (1995).

15 Las plantas dobles haploides derivadas de plantas donadoras diploides normales son normalmente autopolinización y la progenie resultante es genéticamente idéntica y homogénea, es decir, no debe haber más segregación genética de los alelos.

20 La combinación de las técnicas de dobles haploides con la supresión del entrecruzamiento de acuerdo con la invención proporciona nuevas posibilidades muy potentes para el fitomejoramiento. Todas las plantas derivadas de técnicas de dobles haploides aplicadas a plantas (con cualquier grado de heterocigosidad) donde el entrecruzamiento (recombinación de cromosomas) se elimina son completamente homocigotas. Esto significa que una población de DH derivada de una planta en la que se ha suprimido la recombinación, proporciona plantas DH homocigotas que cuando se cruzan con otra planta DH de la misma población da como resultado la generación de un híbrido F1 que es genéticamente idéntico a la planta individual que se utilizó para generar la población DH.

25 Por ejemplo, el pepino tiene 7 cromosomas como conjunto haploide. En el caso teórico en el que una planta donadora sea heterocigota para los genes de todos los cromosomas, y no tenga lugar entrecruzamiento, existen 128 genotipos dobles haploides diferentes que se pueden producir posiblemente, siendo dos de ellos idénticos a las plantas progenitoras originales que constituyeron la planta donadora, en caso de que la planta donadora derivara de un cruce entre dos plantas progenitoras originales homocigotas.

30 En comparación: después de la autopolinización de la misma planta (heterocigota en todos los cromosomas y sin que tenga lugar entrecruzamiento) existen 2.187 genotipos (diploide) diferentes que se pueden producir posiblemente y la frecuencia de cada uno de los genotipos de progenitores originales, en caso de que la planta donadora derivara un cruce entre dos plantas progenitoras originales homocigotas, es solamente de 1 cada 16.384 (=  $(0,25)^7$ ) de plantas de la progenie diploide.

35 Para alcanzar una probabilidad suficiente de encontrar el genotipo que se está buscando, el número de plantas DH o endogámicas producidas tiene que ser multiplicado por un factor. Un factor razonable es 3-4, dando 95-98% de probabilidades de encontrar el genotipo deseado. Incluso con tal multiplicador, la cantidad de DH que se debe producir es todavía susceptible de aplicación industrial, mientras en una auto-polinización tradicional, el número de descendientes que se va a producir asciende a cantidades muy elevadas, que normalmente no se ajustará dentro del alcance de un programa de mejoramiento genético comercial.

40 La reconstrucción de los híbridos F1 deduciendo los antepasados parentales originales y creando nuevas líneas parentales puede ser útil en caso de que se quieran desarrollar progenitores alternativos, que tengan mejores propiedades de calidad de la semilla o del endospermo, para producción comercial de semillas F1.

Para la reconstrucción de un genotipo individual, que se utiliza para la regulación a la baja de la recombinación con la subsiguiente producción de dobles haploides, la constitución genética no es relevante, y con independencia del hecho de si la planta es un híbrido o una planta con composición genética desconocida.

45 Por ejemplo, en el caso de pepino hay teóricamente 64 diferentes combinaciones de dos líneas dobles haploides (DH) que cuando se cruzan proporcionan una progenie con un genotipo idéntico al de la planta original. Por lo tanto, en un conjunto de solamente 48 DH de pepino se puede encontrar con casi 100% de certeza que un par de DH después del cruzamiento reconstruye el genotipo donador original. Incluso para un cultivo económicamente importante como el maíz con 10 cromosomas, solamente se han sometido a ensayo 98 combinaciones de dobles haploides (véase el Ejemplo 2) para obtener líneas parentales que reconstruyen su progenitor, con una probabilidad del 99%.

55 La recuperación exacta de líneas parentales específicas se desea en el caso especial de la "transferencia de citoplasma" mencionada de una línea a otra que se describe adicionalmente como ejemplo 12. La mejor combinación entre la supresión de la recombinación y la producción de dobles haploides seguida de autopolinización permite no solamente la selección de líneas sino que también proporciona nuevas líneas que se asemejan a las líneas parentales originales en todas las combinaciones posibles de combinaciones cromosómicas. Como se explica en el ejemplo con el pepino (Ejemplo 2) es posible producir nuevas plantas parentales que cuando se cruzan reconstruyen el material donador que se utilizó para la obtención de los dobles haploides, ya fueran los progenitores

originales del material donador homocigotos o heterocigotos.

Además de tales líneas, se generan otras líneas, que tienen 6 cromosomas de una línea de partida y 1 cromosoma de la otra línea de partida que normalmente generarían el material donador (como un conjunto haploide). Cuando el material donador utilizado para la supresión de la recombinación y los dobles haploides, es un híbrido F1 que fue creado mediante el cruce de 2 líneas homocigotas (por ejemplo derivadas de dobles haploides) y se aplica la invención mencionada aquí descrita, se pueden recuperar líneas parentales que son idénticas a las dos líneas de partida.

Además, se generan combinaciones para cada único par de cromosomas a partir de un progenitor original con el otro conjunto de otros pares de cromosomas del otro progenitor original. Se pueden obtener combinaciones como éstas para cada par de cromosomas individuales pero también se pueden obtener con pares dobles, pares triples etcétera, donde el conjunto completo de cromosomas se completa finalmente. En la práctica, esto significa que se generan líneas parentales que están cerca de las líneas parentales originales donde solamente 1, o un número limitado de los pares de cromosomas parentales originales es sustituido por un par de cromosomas del otro progenitor original. Esto permite la generación de muchas más combinaciones de líneas parentales originales de lo que es posible en un entorno tradicional. Debido a la ausencia de recombinación y al hecho de que en las especies diploides los descendientes de la técnica DH también son completamente homocigotos, es posible detectar vínculos genéticos.

En genética tradicional, la frecuencia de recombinación entre 2 loci genéticos distintos se utiliza como una medida de la distancia genética entre estos loci en un cromosoma particular. La máxima frecuencia de recombinación entre dos genes cualesquiera es 50%, el mismo valor que se observaría si los genes estuvieran en cromosomas no homólogos y ordenados de forma independiente. Se produce 50% de recombinación cuando los genes están tan lejos en el cromosoma que casi siempre se produce entre ellos al menos un entrecruzamiento. De acuerdo con la invención, debido a la falta de entrecruzamiento, inducido por mutación, tratamiento o tratamientos químicos o medios transgénicos ya sean estables o transitorios, todos los genes que residen en un cromosoma concreto se fijan en sus respectivas formas alélicas. En particular, en combinación con dobles haploides, los genes o loci situados en los extremos exteriores de los cromosomas co-segregan. La co-segregación se controla fácilmente si los genes codifican marcadores visuales, pero los estudios asociados con la tecnología de caracterización de ADN disponibles en la actualidad entre marcadores de ADN y genes importantes y los marcadores de ADN per se mejoran el poder de resolución del análisis de ligamiento. Los ejemplos de tales tecnologías para la huella genética de ADN son RFLP (Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (Beckmann, J.S. y Soller, M. (1983) Theor. y Appl. Genet. 67, 35-43)), RAPD (ADN Polimórfico Amplificado al Azar (Welsh, J. y McClelland, M. (1990) Nucleic Acids Res. 19, 861-866)), SSR (Repeticiones de Secuencias Simples (Wu, K-S. y Tanksley, S.D. (1993) Mol. Gen. Genet. 241, 225-235)) y AFLP (Polimorfismo de Longitud de Fragmentos Amplificados, Vos, P et al. (1995) Nucleic Acids Res. 23, 4407-4414)).

Resulta evidente que la tecnología de mejoramiento genético inverso tiene el potencial de crear nuevas variedades en marcos temporales que nunca han sido posibles y utilizar la variación máxima que se produce dentro de un acervo genético existente.

De acuerdo con un aspecto adicional de la misma, la invención se puede utilizar para la mejora de la eficacia para la transferencia de esterilidad masculina citoplasmática en plantas mediante el uso de la supresión de "entrecruzamiento" o recombinación. La esterilidad masculina citoplasmática o CMS es un rasgo que se utiliza ampliamente en el fitomejoramiento. La CMS se utiliza para la elaboración de variedades híbridas F1 en especies vegetales tales como la zanahoria, la col, la coliflor, el brécol, las coles de Bruselas, la achicoria y la endibia, pero también en especies agronómicas como la remolacha azucarera y el girasol. La CMS que se utiliza en el fitomejoramiento comercial es heredada por el progenitor femenino, sin embargo la apariencia fenotípica de la CMS (carencia de polen, anteras de color pardo, anteras petaloides), también puede depender de factores nucleares que pueden restablecer la esterilidad masculina o no afectar a la esterilidad (denominados mantenedores de CMS). Con el fin de añadir el rasgo CMS a una línea de reproducción fértil específica, el experto en la técnica sabe que son necesarios varios retrocruzamientos con el fin de reemplazar la mayor parte del genoma nuclear de una línea que alberga CMS por el genoma que tiene que ser convertido a esterilidad masculina. La línea donadora de CMS se mantiene mediante retrocruzamiento con una o varias líneas fértiles masculinas isogénicas.

El donador de CMS se hace homocigoto para una mutación recesiva o un transgén que confiere supresión de la recombinación. La línea donadora es preferiblemente genéticamente diferente de la línea que tiene que ser convertida a la esterilidad masculina para un gran número de marcadores genéticos nucleares de manera que la diferencia entre los cromosomas de la CMS y el donador fértil se pueda determinar más fácilmente. Con el fin de convertir una línea endogámica deseada o una línea pura (homocigota o casi homocigota) en una línea similar, pero con un fondo de CMS, se realiza un primer cruce mediante polinización de dicha línea de recombinación suprimida homocigota con CMS con polen de la línea deseada. La progenie F1 resultante contiene CMS y 50% de los cromosomas de la línea deseada. En la meiosis de las plantas F1 resultantes, no se produce recombinación como resultado de la invención. Esto significa que en los óvulos, tiene lugar el ordenamiento cromosómico independiente. En el caso de la col (*Brassica oleracea* L.), que tiene 9 cromosomas en forma de conjunto haploide esto significa que 1 de cada 512 óvulos  $((1/2)^9)$  tienen la misma composición genética (pero haploide) que la línea deseada

mencionada que se utilizó para la polinización de la línea con CMS de recombinación suprimida. Este óvulo es fecundado de nuevo por el polen de la línea deseada y la semilla resultante es genéticamente idéntica para los genes nucleares a la línea deseada original, pero ahora ha adquirido el plasma de CMS. Así, en el segundo cruce con la línea deseada, 1 de cada 512 semillas es isogénica a la línea deseada, pero habiendo adquirido la mencionada plasma de CMS de la línea donadora. En la composición CMS/nuclear recién alcanzada, no se deben conservar genes/plantas transgénicos debido a la segregación del locus transgénico que es responsable de la supresión de la recombinación meiótica y debido a que las plantas transgénicas no se conservan.

La identificación de la nueva combinación de CMS/línea nuclear deseada es muy fácil cuando se utiliza la tecnología de la huella genética de ADN. En una realización preferida, se utilizan marcadores genéticos que tienen la capacidad para identificar cada cromosoma individual. En una realización preferida, se puede utilizar una sola línea donadora de CMS con recombinación suprimida homocigota para realizar varios cruces (flores independientes) con muchas de dichas líneas deseadas.

Sorprendentemente, con la presente invención, también es posible convertir una línea de CMS en una línea mantenedora para aquellas especies de plantas en las que los genes restauradores residen dentro del germoplasma como en *Brassica* sp., zanahoria y rábano. Para este objetivo, una planta fértil que contiene genes restauradores nucleares y normales, sin citoplasma CMS, se transforma con un constructo que confiere la supresión de la recombinación meiótica. Los transformantes que albergan tal constructo preferiblemente en una forma homocigota se utilizan como polinizador en un cruce con una planta de una línea de CMS para lo que se necesita producir una línea mantenedora. Las plantas híbridas resultantes serán fértiles masculinas como consecuencia de la presencia de los genes restauradores y contendrán el constructo en una forma heterocigota. Puesto que el constructo es genéticamente dominante, los cromosomas de las plantas híbridas que derivan en 50% de la línea con CMS original y 50% de la planta fértil que contiene los genes restauradores, no se recombinarán durante la meiosis. Posteriormente, dicha planta híbrida se utilizará como un polinizador en un cruce con la planta original que alberga los genes restauradores y los normales, sin citoplasma CMS. Utilizando los marcadores moleculares que permiten la detección específica de los cromosomas procedentes de la línea de CMS original, se seleccionan las plantas de la progenie que contienen una dotación completa de cromosomas procedentes de la línea de CMS original. Estas plantas se utilizan a continuación para producir plantas dobles haploides que se seleccionan para una dotación completa de cromosomas de la línea de CMS original utilizando los mismos marcadores moleculares. Las plantas resultantes se pueden utilizar como mantenedores de la línea de CMS original.

Preferiblemente, la caracterización de ADN se utiliza para mejorar la eficacia de la presente invención. En una realización preferida de la presente invención, la tecnología de DH se utiliza combinada con la supresión de la recombinación para obtener, de una manera eficaz, plantas diploides completamente homocigotas, que tienen una dotación completa de cromosomas que comprende una combinación aleatoria de los cromosomas de las plantas a partir de las cuales se obtuvieron las plantas dobles haploides.

Aunque esta realización es la más eficaz, se pueden identificar las plantas que son completamente homocigotas y que tienen una dotación completa de cromosomas que comprende una combinación aleatoria de los cromosomas de las plantas en las que se suprimió la recombinación meiótica utilizando enfoques alternativos. Estos planteamientos alternativos comprenden tecnologías de caracterización de ADN, que permiten al experto en la técnica determinar el nivel de polimorfismos que existe entre los genomas de cualquier origen o la complejidad de una manera aleatoria. Con el fin de seleccionar las plantas homocigotas, las semillas son producidas mediante autofecundación de una planta en la que se suprime la recombinación meiótica. La recolección de estas semillas autofecundadas se utiliza para desarrollar la primera generación endogámica (S1). Dentro de tal S1, el número total de genotipos diferentes que existe es de  $0,5(2^{2n} - 2^n) + 2^n$ , donde n es el número haploide de cromosomas. Dentro de esta población  $2^n$  es el número de genotipos diferentes pero completamente homocigotos mientras que todas las otras plantas son heterocigotas para un número variable de cromosomas. Con el fin de identificar las plantas homocigotas, el ADN que se extrae de estas plantas se analiza mediante una tecnología de caracterización de ADN. El nivel relativo del polimorfismo que se mide para cada planta de la S1 refleja el nivel de heterocigosidad. Esto permite el enriquecimiento de la población S1 en las plantas con un nivel relativamente alto de homocigosidad.

Con el fin de identificar las plantas que son completamente homocigotas, se pueden someter a ensayo alelos marcadores que tienen una posición conocida en el mapa genético de una especie de cultivo dada para determinar los polimorfismos dentro de la planta en la que se suprime la recombinación meiótica. En principio, cuando la recombinación está completamente suprimida, la identificación de un único alelo marcador polimórfico por cromosoma que se puede medir de una manera co-dominante es suficiente para identificar las plantas homocigotas en la S1. Puesto que la frecuencia de plantas homocigotas en una S1 disminuye cuando el número haploide de cromosomas aumenta, este enfoque requiere más entrada de recursos cuando la especie de cultivo contiene un número haploide de cromosomas superior. Cuando una especie de cultivo tiene un número de n cromosomas haploides, la frecuencia de plantas homocigotas en una S1 es  $2^{-n}$ . Una vez que estos marcadores están disponibles para cada cromosoma, se puede determinar para cada planta de las S1 si estos alelos marcadores está presentes de manera homo- o heterocigota.

Debido a que durante la meiosis la recombinación está completamente suprimida, la homocigosidad de un solo alelo del marcador es diagnóstica para todos los loci en el mismo cromosoma en términos de su homocigosidad. Este



análisis permite la identificación de las plantas homocigotas en la S1 y además permite la clasificación de las líneas homocigotas en grupos de complementación. Dos plantas se consideran complementarias cuando al cruzar estas plantas, el genotipo de la planta en la que se suprimió la recombinación se recupera totalmente.

5 Este análisis permite además la producción de híbridos F1 en los que está presente cualquier conjunto predeterminado de cromosomas de manera homocigota mientras que todos los demás están presentes de manera heterocigota.

10 Se pueden utilizar el análisis del endospermo o de la cubierta de la semilla de los híbridos F1 para determinar el genotipo materno. Como ha descrito anteriormente, la disponibilidad de un análisis para determinar la presencia de un mínimo de un alelo marcador codominante por cromosoma permite la determinación de la cigosidad de cada cromosoma de una planta de la población S1 producida en una planta en la que se ha suprimido la recombinación meiótica. Dentro del grupo de plantas homocigotas aquellas plantas que tienen el mismo genotipo que la planta madre de la planta en la que se suprime la recombinación meiótica se pueden identificar mediante el análisis del ADN de la cubierta de la semilla de la semilla a partir de la cual se desarrolló la planta en la que se había suprimido la recombinación meiótica. El ADN en la cubierta de la semilla es de origen materno y por lo tanto, se pueden utilizar los análisis disponibles para el alelo marcador para analizar el ADN de la cubierta de la semilla que revela la identidad de los alelos maternos. Los datos resultantes de tales análisis se pueden utilizar para identificar las plantas homocigotas en la S1 que tienen un genotipo idéntico al de la planta madre de la planta en la cual se había suprimido la recombinación meiótica. Las plantas que tienen el mismo genotipo que la planta madre son aquellas plantas que son totalmente complementarias a la planta madre.

20 Como enfoque alternativo, las plantas que tienen un genotipo idéntico a las plantas madre y padre se pueden identificar mediante el análisis del endospermo de la semilla a partir de la cual se desarrolló la planta en la que se había suprimido la recombinación meiótica. Al igual que en los tejidos de endospermo, se encuentra presente el doble de genoma materno que de genoma paterno, una medición cuantitativa de la presencia de los alelos marcadores en un extracto de ADN nuclear total del endospermo revela la identidad de los alelos maternos y paternos. Los datos resultantes de tales análisis se pueden utilizar para identificar las plantas homocigotas de la S1 que tienen un genotipo idéntico al de la planta madre o padre de la planta en la cual se ha suprimido la recombinación meiótica.

30 En algunas especies, surgen gametos  $2n$  a partir de los progenitores  $2n$  (= gametos no reducidos) por anomalías durante la meiosis. En el caso especial de la "restitución de la segunda división" surgen gametos no reducidos por una segunda división incompleta. El resultado es una díada donde ambas células  $2n$  están separadas por una pared celular de reducción. Los gametos que se producen de tal manera son homocigotos en caso de ausencia de entrecruzamiento y recombinación. En la presente invención los autores de la presente invención muestran cómo manipular la fase de la meiosis con el fin de prevenir que tenga lugar la recombinación. Las plantas regeneradas a partir de gametos  $2n$  producidos por dicha restitución de la segunda división en ausencia de recombinación son el equivalente funcional de las plantas doble haploides. Para la SDR véanse fi. Hermsen J. En: The potencies of meiotic polyploidization in breeding allogamous crops. Iowa State J. Res., Vol 58, Núm. 4, páginas 421-435 (1984). Mok D y Peloquin S. Heredity 35, 295-302 (1975).

40 La invención es adecuada para su uso en todas las plantas, especialmente en la agricultura (patatas, hortalizas) y horticultura (hortalizas, frutas, flores), pero también en plantas en maceta, plantas de lechos de flores, arbustos, árboles y hongos (setas). Las plantas de cultivo que se pueden someter al método de la invención comprenden maíz, trigo, arroz, remolacha azucarera, colza, raigrás, girasol, soja, tomate, pepino, espinaca, pimiento, petunia, patata, tabaco, berenjena, melón, zanahoria, rábano, lechuga, hortalizas de la especie *Brassica* (col, coliflor, brécol, colinabo, coles de Bruselas), puerro, judía, endibia, achicoria, cebolla, patata, fresa, rábano, hinojo, remolacha de mesa, apio.

45 En muchas especies de plantas comerciales, tales como muchas plantas ornamentales y leñosas, la propagación vegetativa o clonal es la forma exclusiva o dominante de propagación comercial. En programas de mejoramiento genético de estas especies, se identifican genotipos superiores en poblaciones segregantes, p. ej., en una F2, y éstas se mantienen después y se multiplican mediante técnicas de multiplicación vegetativa.

50 En muchas de estas especies, el método de propagación vegetativa las plantas (heterocigotas) se ha convertido en dominante, debido a que la producción de variedades híbridas a través de semillas (como se hace en muchos cultivos anuales y bianuales) requiere en primer lugar varias generaciones de mejoramiento genético de las líneas parentales, que en muchas especies leñosas y arbóreas tomaría demasiado tiempo para cualquier programa comercial. Por medio de la propagación vegetativa se multiplican genotipos superiores en una población de partida de plantas genéticamente idénticas, y no se "pierde" tiempo para producir líneas parentales como es el caso de los cultivos híbridos propagados por semillas. Sin embargo, también existen claras desventajas en la propagación vegetativa. En primer lugar, la logística de producción de plantas a través de la propagación vegetativa es mucho más difícil que a través de semillas. Las semillas se pueden almacenar fácilmente, y con frecuencia sin problemas durante mucho tiempo. Las semillas se pueden sembrar cuando se requieren cantidades comerciales de la población de partida para la plantación.

En el caso del material propagado vegetativamente, es mucho más difícil responder a las diversas necesidades comerciales para una nueva población de partida de plantación. La producción vegetativa es laboriosa y de tecnología intensiva, y por lo tanto relativamente costosa. Las enfermedades, especialmente los virus, son una amenaza constante para la multiplicación vegetativa. Muchos virus no se transmiten por las semillas, pero se transmiten fácilmente a la descendencia clonal obtenida por técnicas de reproducción vegetativa. Por esta razón, algunos países cuentan con estrictas normas de cuarentena que rigen la importación de plantas producidas vegetativamente.

No todos los genotipos funcionan igualmente bien en la propagación vegetativa. Algunos son difíciles de propagar de esta manera. Por ejemplo, el enraizamiento de esquejes de árboles varía entre especies y clones.

A través del mejoramiento genético inverso de acuerdo con la invención el genotipo de la planta propagada clonalmente heterocigota se puede resintetizar ahora y proporcionar semillas híbridas con el genotipo mencionado.

En el contexto de la presente invención se aplican las siguientes definiciones:

Planta de partida: planta heterocigota que se utiliza como material de partida en el método de la invención. La planta de partida no es necesariamente el resultado directo de un cruce entre dos progenitores, pero si lo fuera estos progenitores se denominan "progenitores originales" y la línea de tales progenitores originales se denomina "línea progenitora original".

(Nuevo) progenitor: una planta homocigota resultante del método de la invención que se puede utilizar en un cruce con un (nuevo) progenitor complementaria para reconstruir la planta de partida original. Una línea de cada (nuevo) progenitor se denomina "(nueva) línea progenitora".

Se debe observar que el uso de la palabra "progenitor" o "línea progenitora" en pasajes que no describen directamente la invención no es necesario que sean referencias a un nuevo progenitor o línea progenitora.

Genotipo: La constitución genética de una planta individual.

Gen diana: un gen que residen en el genoma de una planta que tras la modificación de su expresión da como resultado un proceso meiótico dentro de dicha planta que se caracteriza por la formación de esporas que contienen un conjunto de cromosomas que no han sido sometidos a recombinación meiótica o que han sido sometidos a una frecuencia reducida de recombinación meiótica en comparación con la situación en la que no se modifica la expresión de dicho gen.

Homólogos funcionales: Genes con las mismas o similares funciones que pueden residir en una planta o pueden residir en plantas que pertenecen a diferentes especies biológicas.

Supresión de la recombinación meiótica: Un evento que conduce a la reducción, preferiblemente ausencia de intercambio de fragmentos de cromosomas entre dos cromosomas emparejados durante la meiosis.

La presente invención se explica adicionalmente en los Ejemplos que siguen y que tienen solamente fines ilustrativos y no se pretende de ninguna manera que limiten la invención. En los ejemplos se hace referencia a las siguientes figuras:

**Figura 1:** Secuencia de nucleótidos parcial de BoDMC1 (**SEC ID NO: 1**).

**Figura 2:** Secuencia de nucleótidos parcial de BcDMC1 (**SEC ID NO: 2**).

**Figura 3:** Secuencia de nucleótidos parcial de LeDMC1 (**SEC ID NO: 3**).

**Figura 4:** Secuencia de nucleótidos parcial de SmDMC1 (**SEC ID NO: 4**).

**Figura 5:** Secuencia de nucleótidos parcial de NtDMC1 (**SEC ID NO: 5**).

**Figura 6:** Secuencia de nucleótidos parcial de BoSPO11 (**SEC ID NO: 6**).

**Figura 7:** Secuencia de nucleótidos parcial de BcSPO11 (**SEC ID NO: 7**).

**Figura 8:** Secuencia de nucleótidos parcial de AtMSH5 (**SEC ID NO: 8**).

**Figura 9:** Resultado de un análisis BLAST X de la secuencia de nucleótidos parcial AtMSH5 (problema) que muestra el nivel de la identidad de la secuencia AtMSH5 traducida con ortólogos de MSH5 conocidos (Sujeto) de *Saccharomyces cerevisiae*, *Homo sapiens*, *Mus musculus* y *Caenorhabditis elegans*.

**Figura 10:** Mapa de pRZ51. RB = borde derecho, LB = borde izquierdo, espec = resistencia a espectinomomicina/estreptomomicina, pr 35S = promotor 35S de CaMV, Bc-DMC = BcDMC1, OCS-ter = promotor de octopina sintasa, Pnos = promotor de nopalina sintasa, NPTII = neomicina fosfotransferasa II, Tnos = señal de poliadenilación de nopalina sintasa.

**Figura 11:** Mapa de pRZ52. RB = borde derecho, LB = borde izquierdo, espec = resistencia a espectinomina/estreptomicina, pr 35S = promotor 35S de CaMV, Bc-SPO11 = BcSPO11, OCS-ter = promotor de octopina sintasa, Pnos = promotor de nopalina sintasa, NPTII = neomicina fosfotransferasa II, Tnos = señal de poliadenilación de nopalina sintasa.

5 **Figura 12:** Mapa de pRZ54. RB = borde derecho, LB = borde izquierdo, espec = resistencia a espectinomina/estreptomicina, pr 35S = promotor 35S de CaMV, AtMSH5 = AtMSH5, OCS-ter = promotor de octopina sintasa, Pnos = promotor de nopalina sintasa, NPTII = neomicina fosfotransferasa II, Tnos = señal de poliadenilación de nopalina sintasa.

**Figura 13:** Secuencia de nucleótidos parcial de BoMSH5 (SEC ID NO: 17).

10 **Figura 14:** Secuencia de nucleótidos parcial de LeMSH5 (SEC ID NO: 18).

**Figura 15:** Secuencia de nucleótidos parcial de SmMSH5 (SEC ID NO: 19).

**Figura 16:** Secuencia de nucleótidos parcial de NtMSH5 (SEC ID NO: 20).

### Ejemplos

#### Ejemplo 1

15 Efecto de la utilización de la regeneración de plantas dobles haploides combinada con la supresión de la recombinación

20 Para que el mejoramiento genético inverso sea comercialmente viable es importante la eficiencia de la identificación de las plantas completamente homocigotas que están presentes en la progenie de los transformantes en los que se ha suprimido la recombinación meiótica. Este ejemplo muestra el efecto, en términos del grado de aumento de la frecuencia de las plantas homocigotas en la población de la descendencia de las plantas en las que se ha suprimido la recombinación meiótica, de la utilización de la tecnología de DH combinada con la supresión de la recombinación analizada para diferentes especies de cultivo.

25 Cuando se suprime la recombinación, una planta totalmente heterocigota, que contiene un número haploide de cromosomas  $n$ , es capaz de producir un número máximo de gametos genéticamente distintos  $2n$ . Cuando tal planta es autofecundada, la plantas de la progenie tienen una variabilidad genética máxima de  $0,5(2^{2n} - 2^n) + 2^n$  genotipos diferentes. Dentro de esta población existen  $2n$  plantas genotípicamente diferentes pero completamente diploides homocigotas, mientras que todas las demás plantas diploides son heterocigotos para un número variable de cromosomas.

30 La aplicación de la tecnología de DH combinada con la supresión de la recombinación meiótica da como resultado exclusivamente plantas de la progenie que son completamente homocigotas. Debido a que estas plantas están derivadas de microsporas por medio de p. ej. androgénesis o megasporas por medio de p. ej. ginogénesis, el número máximo de plantas diploides genéticamente distintas es idéntico al número máximo de gametos haploides genéticamente distintos que puede ser producidos por una planta en la que se ha suprimido la recombinación meiótica, que es  $2n$ .

35 La Tabla 1 muestra el resultado de este análisis.

Tabla 1. Efecto de la tecnología de DH sobre la eficacia de recuperación de una línea pura en una planta totalmente heterocigota (es decir, una planta que es heterocigota en cada uno de sus cromosomas) en la que se ha suprimido la recombinación meiótica, como una función del número cromosómico haploide

Número cromosómico haploide $n$	Ejemplo de una especie de planta	Núm. máximo de gametos genéticamente diferentes	Núm. máximo de plantas de la progenie genéticamente distintas después de la autofecundación (a)	Núm. máximo de plantas de la progenie totalmente homocigotas, genéticamente distintas, después de la producción de DH (b)	Mejora de la eficacia expresada como $a/b$ , debida a la tecnología de DH
1		2	3	2	1,5
2		4	10	4	2,5
3		8	36	8	4,5

ES 2 596 627 T3

Número cromosómico haploide n	Ejemplo de una especie de planta	Núm. máximo de gametos genéticamente diferentes	Núm. máximo de plantas de la progenie genéticamente distintas después de la autofecundación (a)	Núm. máximo de plantas de la progenie totalmente homocigotas, genéticamente distintas, después de la producción de DH (b)	Mejora de la eficacia expresada como a/b, debida a la tecnología de DH
4		16	136	16	8,5
5	<i>Arabidopsis</i>	32	528	32	16,5
6	espinacas, hierba de los canónigos	64	2080	64	32,5
7	pepino, cebada, escorzonera	128	8256	128	64,5
8	alfalfa, cebolla	256	32896	256	128,5
9	coliflor, lechuga, remolacha azucarera, zanahoria, brécol, col, rábano, endibia	512	131328		256,5
10	maíz, espárragos, sorgo, col china, cacao	1024	524800		512,5
11	plátano, sandía, apio, perejil, hinojo, judía común	2048	2098176		1024,5
12	tomate, pimiento, melón, patata, tabaco, arroz, berenjena	4096	8390656		2048,5
13	algodón	8192	33558528		4096,5
14	Trigo duro, guisantes, lentejas	16384	1,34E +08		8192,5

Este análisis demuestra que para la mayoría si no todos los cultivos el uso de la tecnología de DH tiene un profundo efecto sobre la eficacia de la recuperación de la planta homocigota, en comparación con la descendencia obtenida a través de autofecundación de los transformantes en los que se ha suprimido la recombinación meiótica.

- 5 Como se desprende de este análisis, la mejora de la eficacia depende del número cromosómico haploide de una especie vegetal dada y oscila de uno a tres órdenes de magnitud (es decir, 10x a 1000x). Se concluye que el uso combinado de supresión de la recombinación meiótica y la tecnología de DH mejora significativamente la viabilidad comercial y práctica del método de la invención.

Ejemplo 2

Análisis de la probabilidad de encontrar en un número k de plantas DH a partir de una planta de partida en la que se había suprimido completamente la recombinación una combinación complementaria de plantas DH, que después del cruce puede volver a sintetizar el genotipo de la planta de partida, como una función del número de cromosomas n

5 La presente invención ilustra la utilización combinada de la supresión de la recombinación meiótica combinada con una tecnología para la mejora de la eficacia como la tecnología de DH para permitir la conversión de una planta heterocigota en una variedad híbrida F1 por medio del cruce de líneas parentales obtenidas por la presente invención como tal.

10 En este ejemplo se muestra el análisis de la probabilidad de encontrar al menos una combinación complementaria de dos plantas dobles haploides (una combinación que después del cruce puede 'volver a sintetizar' la planta de partida), como una función del número cromosómico haploide n de una especie de planta dada y el número k de plantas DH producidas a partir de una planta de partida heterocigota en la que se ha suprimido completamente la recombinación meiótica.

15 Cuando el número cromosómico haploide de una especie de cultivo dado se expresa como n, el número máximo de genotipos que se obtienen a partir de una planta de esa especie de cultivo en la que se ha suprimido completamente la recombinación meiótica y a partir de la cual se producen las plantas dobles haploides es 2n. La probabilidad de que un par elegido al azar de plantas dobles haploides de esta población, tras el cruce, de como resultado un híbrido F1 que tenga un genotipo idéntico al genotipo en el cual se ha suprimido la recombinación (genotipo original) es  $1/2^n$  (debido a que  $2^n/(2^n)^2$ ).

20 En caso de que se produzca un número total de plantas doble haploides k, existe un número de  $\frac{1}{2} k \cdot (k-1)$  combinaciones de 2 plantas dobles haploides genéticamente distintas que se pueden cruzar. La probabilidad para cualquier combinación elegida al azar, de que 2 DH sean complementarias (puedan volver a sintetizar el genotipo original después del cruce) es  $(\frac{1}{2})^n$ . De este modo la probabilidad para cualquier combinación elegida al azar de que 2 DH no sean complementarias es  $1 - (\frac{1}{2})^n = (2^n - 1)/2^n$ . En el caso de k dobles haploides, se pueden realizar  $\frac{1}{2} \cdot k \cdot (k-1)$  combinaciones y por lo tanto la probabilidad de que dentro de esta población de DH se puedan encontrar DH no complementarias es  $((2^n - 1)/2^n)^{(1/2k \cdot (k-1))}$  y por lo tanto la probabilidad de que se pueda encontrar al menos una combinación complementaria de dos DH es  $1 - ((2^n - 1)/2^n)^{(1/2k \cdot (k-1))}$ .

30 Utilizando esta fórmula se puede calcular el número de plantas doble haploides para cada especie de cultivo que necesita cruzar por pares con el fin de maximizar la probabilidad de encontrar el genotipo original. El resultado de este análisis se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2

Probabilidad de encontrar al menos una combinación de dos DH complementarias, utilizando la tecnología del 'mejoramiento genético inverso', como una función del número de cromosomas haploide n y el número de plantas doble haploides producidas al azar disponibles k

n/k	2	4	8	16	24	32	48	64	128	256
7	0,008	0,046	0,197	0,610	0,885	0,980	1,000	1,000	1,000	1,000
9	0,002	0,012	0,053	0,209	0,417	0,621	0,890	0,981	1,000	1,000
11	0,000	0,003	0,014	0,057	0,126	0,215	0,424	0,626	0,981	1,000
12	0,000	0,001	0,007	0,029	0,065	0,114	0,241	0,388	0,863	1,000

35 Este análisis demuestra que el genotipo original se vuelve a sintetizar como un híbrido F1 de acuerdo con la presente invención con alta probabilidad utilizando 48 plantas dobles haploides para el pepino, 128 para la coliflor y 256 para tomate, melón y pimiento dulce.

Ejemplo 3

40 Clonación molecular y caracterización de los genes diana DMC1, SPO11 y MSH5 de Arabidopsis thaliana, Brassica oleracea, Brassica carinata, Lycopersicon esculentum, Solanum melongena y Nicotiana tabacum

El ADN total se extrajo de los tejidos vegetales utilizando el GenElute Plant Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Países Bajos). La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando una cantidad total de 30 ng de ADN

después de lo cual los productos de reacción se analizaron en un gel de agarosa al 1%. El ARN total se extrae de los tejidos vegetales utilizando el RNeasy Plant Mini Kit asequible comercialmente de Qiagen (Valencia, CA, USA). El ARN purificado se trata posteriormente con 1 µl de ADNasa libre de ARNasa de 10 unidades/µl (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) con el fin de eliminar cualquier ADN residual. La reacción de RT-PCR se llevó a cabo utilizando Superscript™ One-Step RT-PCR con platino® Taq de Invitrogen (Breda, Países Bajos), después de lo cual los productos de reacción se analizan en un gel de agarosa al 1%. Los productos de la PCR se clonan usando el sistema TOPO TA Cloning® de Invitrogen (pCR® 2.1-TOPO®) que se basa en la clonación de TA y el escrutinio de colonias blanco azul.

#### 1. Clonación de DMC1

Basándose en la secuencia génica publicada de DMC1 de *Arabidopsis thaliana*, AtDMC1 (Núm. de Acceso GenBank U76670), se desarrolló una combinación de cebadores que consistía en las siguientes secuencias de nucleótidos: cebador directo 5'-ACAGAGGCTTTTGGGGAATT-3' (**SEQ ID NO: 9**) y cebador complementario inverso 5'-ACAGAGGCTTTTGGGGAATT-3' (**SEQ ID NO: 10**). El análisis de PCR reveló un fragmento de ADNc de 380 pb mediante RT-PCR a partir de yemas florales de *Arabidopsis thaliana* y un fragmento de 1100 pb de ADN genómico de *Arabidopsis thaliana*. Este resultado es esperado sobre la base de la secuencia genómica conocida del gen AtDMC1. El análisis de secuencias de los productos de la PCR clonados confirmaron la identidad del fragmento clonado como parte del gen AtDMC1 puesto que la secuencia de nucleótidos obtenida era idéntica a la secuencia publicada. Este resultado demuestra que la combinación de cebadores desarrollada se puede utilizar eficazmente para amplificar específicamente una región de AtDMC1.

La misma combinación de cebadores se utilizó en una reacción de amplificación por RT-PCR usando ARN extraído a partir de yemas florales de *Brassica oleracea* y *Brassica carinata*. Para ambas especies de plantas se obtuvo un fragmento de ADNc de 380 pb que se clonó y se secuenció. El gen DMC1 de *Brassica oleracea* se denomina BoDMC1 y su secuencia de nucleótidos del fragmento de ADNc de 380 pb se muestra en la Figura 1. El gen DMC1 de *Brassica carinata* se denomina BcDMC1 y su secuencia de nucleótidos del fragmento de ADNc de 380 pb se muestra en la Figura 2.

El alineamiento de secuencia de las secuencias obtenidas con el gen AtDMC1 mostró un grado de identidad muy elevado de BoDMC1, BcDMC1 y AtDMC1. Los porcentajes de identidad entre las diferentes secuencias son los siguientes: AtDMC1 y BoDMC1 95%, AtDMC1 y BcDMC1 93%, BcDMC1 y BoDMC1 96%.

La misma combinación de cebadores se utilizó en una reacción de amplificación por PCR usando ADN genómico extraído de tejidos de *Lycopersicon esculentum*, *Solanum melongena* y *Nicotiana tabacum* que dio como resultado productos de amplificación específicos de 1100 pb para las 3 especies de plantas. Estos fragmentos tienen una longitud que se corresponde bien con la longitud del fragmento genómico de *Arabidopsis thaliana* y se denominaron LeDMC1 para *Lycopersicon esculentum* SmDMC1 para *Solanum melongena* y NtDMC1 para *Nicotiana tabacum*. Los fragmentos se clonaron y se secuenciaron, cuyo resultado se muestra en la Figura 3 para LeDMC1, en la Figura 4 para SmDMC1 y en la Figura 5 para NtDMC1. Un análisis BLAST mostró que los fragmentos contienen regiones con un alto nivel de identidad con el ADNc de AtDMC1.

En conjunto, estos datos demuestran que los fragmentos clonados de las especies solanáceas son amplicones de los ortólogos de AtDMC1 que residen dentro del genoma de estas especies.

#### 2. Clonación de SPO11

Con el fin de aislar fragmentos de ADN de los genes ortólogos de SPO11, se desarrolló una combinación de cebadores cuyos cebadores corresponden a una posición del ADN genómico de SP011-1 de *Arabidopsis thaliana* (Atspo11-1, ACCESO AF-302928) que codifica un tramo de aminoácidos que está altamente conservado entre los ortólogos de SPO11 conocidos de especies diferentes. Los cebadores tienen las siguientes secuencias de nucleótidos: cebador directo 5'-AACGGTGGTGATGGG-3' (**SEC ID NO: 11**) y cebador complementario inverso 5'-CCATATGGATCACAGTCAAC-3' (**SEC ID NO: 12**). El análisis de PCR reveló un fragmento de ADNc de 350 pb mediante RT-PCR a partir de yema florales de *Arabidopsis thaliana*. Este resultado es esperado sobre la base de la secuencia de ADNc conocida del gen Atspo11-1. El análisis de la secuencia del producto de PCR clonado confirmó la identidad del fragmento de ADN clonado que se deriva del gen Atspo11-1, ya que la secuencia de nucleótidos obtenida era idéntica a la secuencia publicada de Atspo11-1. Este resultado demuestra que la combinación de cebadores desarrollada se puede utilizar eficazmente para amplificar específicamente una región de Atspo11-1.

La misma combinación de cebadores se utilizó en una reacción de amplificación por RT-PCR utilizando ARN extraído de yemas florales de *Brassica oleracea* y *Brassica carinata*. Para ambas especies de plantas se obtuvo un fragmento de ADNc de 350 pb que se clonó y se secuenció. El alineamiento de secuencia de las secuencias obtenidas con el gen Atspo11-1 mostró un grado de identidad muy alto para los dos fragmentos con el gen Atspo11-1. El gen SPO11 de *Brassica oleracea* se denomina BoSPO11 cuya secuencia de nucleótidos del fragmento de ADNc de 350 pb se muestra en la Figura 6. El gen SPO11 de *Brassica carinata* se denomina BcSPO11 cuya secuencia de nucleótidos del fragmento de ADNc de 350 pb se muestra en la Figura 7.

Los porcentajes de identidad entre los fragmentos de PCR son los siguientes: Atspo11-1 y BoSPO11 94%, Atspo11-

1 y BcSPO11 93%, BoSPO11 y BcSPO11 99%.

### 3. Clonación de MSH5

Con el fin de aislar parte del gen MSH5 de *Arabidopsis thaliana* se hizo uso del algoritmo CODEHOP (Rose et al. (1998) Nucleic Acids Research 26, 1628-1635). Basándose en los bloques de aminoácidos conservados generados a través del alineamiento de los ortólogos de MSH5 de *Caenorhabditis elegans*, *Mus musculus* y *Saccharomyces cerevisiae*, se genera una combinación de cebadores que consiste en una pinza específica y una región central degenerada. La siguiente combinación de cebadores se utilizó para amplificar una región del genoma de *Arabidopsis thaliana*: cebador directo 5'-GTTTTTATGGCTCATATTGGATGTTTTGTNCCNGC-3' (**SEC ID NO: 13**) y el cebador complementario inverso 5'-TCCACAGTATTAGTTCCTTCCAWAYTCRTCDAT-3' (**SEC ID NO: 14**), Donde Y representa C o T, N representa A, T, G o C, W representa A o T, R representa A, G o T. La amplificación mediante PCR utilizando esta combinación de cebadores de ADN genómico de *Arabidopsis thaliana* dio como resultado un fragmento de 220 pb que se clonó y se secuenció. Esta secuencia se proporciona en la Figura 8.

Un análisis BLAST-X reveló un alto nivel de identidad en el nivel de aminoácidos del producto de traducción del fragmento clonado con las secuencias de aminoácidos MSH5 conocidas que se muestra en la Figura 9. Esto demuestra que este método se puede utilizar con eficacia para aislar específicamente una porción del ortólogo de MSH5 de *Arabidopsis thaliana* que denominó AtMSH5.

Basándose en la secuencia de nucleótidos de AtMSH5, se realizó una combinación de cebadores específica para amplificar secuencias de MSH5 de plantas adicionales. Esta combinación de cebadores tiene la siguiente secuencia: cebador directo 5'-TgTCCCGGCTGCATCGGCCAAAATCGGC-3' (**SEC ID NO: 15**) y cebador complementario inverso 5'-GAATTCGTCAATCAAAATCAGTGACCG-3' (**SEC ID NO: 16**) y genera un fragmento de 170 pb sobre el ADN genómico de *Arabidopsis thaliana*.

Esta combinación de cebadores se utilizó a continuación en una reacción de PCR usando ADN genómico de *Brassica oleracea*, *Lycopersicon esculentum*, *Solanum melongena* y *Nicotiana tabacum* como molde. Para todas las especies de plantas se obtuvo un fragmento amplificado de 170 pb.

Estos fragmentos se secuenciaron y las secuencias se analizaron mediante BLAST-X. El resultado demostró que los fragmentos obtenidos representan los genes MSH5 de las especies de cultivo respectivas. Los genes se denominaron de la siguiente manera: MSH5 de *Lycopersicon esculentum*: LeMSH5 (Fig. 14); MSH5 de *Solanum melongena*: SmMSH5 (Fig. 15); MSH5 de *Nicotiana tabacum*: NtMSH5 (Fig. 16) y MSH5 *Brassica oleracea*: BoMSH5 (Fig. 13).

#### Ejemplo 4

Construcción de vectores de interferencia por ARN (ARNi) para regular a la baja los genes diana DMC1, SPO11 y MSH5

Con el fin de regular a la baja la actividad de un gen diana en una especie de planta concreta, se hace uso de la interferencia por ARN. Para este propósito, se insertan fragmentos de ADN de DMC1 y SPO11 de *Brassica carinata* y el gen MSH5 de *Arabidopsis thaliana* en pKANNIBAL (Wesley et al. (2001) The Plant Journal 27, 581-590) de tal manera que tras la expresión en plantas se forma una molécula de ARN que se pliega sobre sí misma formando de este modo una estructura en horquilla que desencadena la degradación específica del ARN homólogo. El vector pKANNIBAL contiene un intrón situado aguas abajo del promotor 35S de CaMV y aguas arriba formar una señal de poliadenilación de la octopina sintasa. A cualquier lado del intrón se sitúa un sitio de clonación múltiple que permite la inserción conveniente del brazo izquierdo y derecho del ADN correspondiente a la diana de interferencia del ARN en una orientación invertida respecto a la otra. Tras la transcripción el intrón se elimina mediante corte y empalme y el brazo izquierdo y derecho se pliegan sobre sí formando los ARN de doble cadena.

Con el fin de generar un brazo izquierdo para DMC1, SPO11 y MSH5, se vuelven a amplificar los fragmentos génicos a partir de los vectores en los que han sido clonados utilizando cebadores que se extienden con sitios de reconocimiento para XhoI que hibrida en el extremo 5' del fragmento del gen y KpnI que hibrida en el extremo 3' del fragmento del gen.

Los fragmentos que se generan mediante PCR usando estos cebadores se digieren con XhoI y KpnI y con posterioridad se insertan en pKANNIBAL digerido con XhoI y KpnI. Los plásmidos resultantes se denominan pRZ039 que contiene DMC1, pRZ040 que contiene SPO11 y pRZ041 que contiene MSH5.

Con posterioridad, se preparan los brazos derechos de una manera similar pero utilizando un conjunto diferente de cebadores que generan un sitio XbaI en el extremo 5' del fragmento del gen y un sitio HindIII en el extremo 3' del fragmento del gen. Tras la digestión de los brazos derechos, éstos se insertan en los vectores que contienen el brazo izquierdo correspondiente dando como resultado pRZ042 para DMC1, pRZ043 para SPO11 y pRZ044 para MSH5.

5 Como etapa final, se insertan por separado los casetes en horquilla completos que contienen las secuencias de DMC1, SPO11 y MSH5 en forma de una repetición invertida, en forma de un fragmento NotI en el sitio NotI de un ADN-T de un vector binario denominado pART27, que contiene el gen de la neomicina fosfotransferasa II como marcador seleccionable para la transformación de la planta. La integridad del ADN-T se confirmó mediante análisis de la secuencia. Los vectores binarios resultantes, denominados pRZ051 para DMC1 (Figura 10), pRZ052 para SPO11 (Figura 11) y pRZ054 para MSH5 (Figura 12) se transfieren a *Agrobacterium tumefaciens* utilizando un procedimiento de apareamiento triparental con el plásmido coayudante pRK2013 (Ditta et al. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 7347-7351).

10 Debido al alto nivel de identidad de secuencia de BcDMC1 y BcSPO11 y de la secuencia de AtMSH5 con los respectivos genes ortólogos, los constructos son eficaces en la regulación a la baja de los genes diana dentro de todas las especies de la familia Cruciferaeae. Por otra parte, puesto que las secuencias de LeDMC1, SmDMC1 y NtDMC1 muestran regiones de alta similitud con el ADNc de BcDMC1, pRZ051 también es eficaz en especies solanáceas. Además, dada la similitud de BcDMC1 con el gen DMC1 de arroz, las secuencias de BcDMC1 se pueden utilizar incluso más ampliamente es decir, también en especies de plantas monocotiledóneas como por ejemplo arroz, trigo, cebada y maíz.

15 En general, el método descrito anteriormente se puede utilizar para elaborar constructos que contienen fragmentos de ADN que son homólogos a otros genes diana que necesitan ser regulados a la baja.

Ejemplo de referencia 5

Transformación de *Arabidopsis thaliana* con pRZ051, pRZ052 y pRZ054

20 Se cultiva durante la noche la cepa C58 *Agrobacterium tumefaciens* (ATCC 33970) que contiene uno cualquiera de los vectores de transformación de plantas pRZ051, pRZ052 o pRZ054 en medio LB que contiene estreptomycin (100 mg/L) y espectinomycin (300 mg/L) para seleccionar para los vectores y rifampicina (40 mg/L) y gentamicina (25 mg/L) para seleccionar el fondo de C58 de *Agrobacterium tumefaciens* a 29°C.

25 Con el fin de producir plantas de *Arabidopsis* transgénicas, se utiliza el método de inmersión floral, como describen Desfeux et al. (2000) Plant Physiology 123, 895-904. Las células bacterianas se resuspenden en la solución de inmersión floral (50 g de sacarosa + 500 µl de tensioactivo Silwett L-77 (Helena Chemical Comp. Fresno, CA, USA) por litro de MilliQ™ (Millipore, Etten-Leur, Países Bajos). Las plantas en floración, que contienen varios botones florales, se sumergen en la solución de inmersión que contiene las células de *Agrobacterium* a una Densidad Óptica (DO) entre 1,0 y 1,5 durante 5-10 segundos con agitación suave.

30 Después de la inoculación, las plantas se incluyen en un recipiente de plástico para mantener la humedad alta en condiciones de baja iluminación durante un día y, posteriormente, las semillas se desarrollan a plantas.

35 Los transformantes se seleccionaron mediante la germinación de las semillas esterilizadas en la superficie en una capa de agarosa al 0,1% sobre placas MS de fuerza media que contienen 50 mg/L de kanamicina. Las plantas de semillero resistentes a kanamicina se transfieren a suelo en un invernadero. En total se hicieron crecer 51 plantas de semillero resistentes a kanamicina/constructo hasta plantas maduras que se analizaron mediante PCR para determinar la presencia de la ADN-T. Se diseñaron combinaciones de cebadores que amplifican específicamente el gen NPTII (NEO-FORW + NEO-REV), la región del promotor 35S de CaMV para el intrón (35S-F1 + ARNi-intr-R1) y la región del intrón para el terminador OCS (ARNi-intr-F1 + OCS-R1). Las secuencias de estas combinaciones de cebadores se proporcionan a continuación. El resultado de este análisis demostró que en todas las plantas se obtuvieron señales de amplificación específicas para las combinaciones de cebadores mencionadas, lo que confirma el estado transgénico de las plantas de semillero resistentes a la kanamicina y que muestra la presencia de los constructos de interferencia por ARN. Las plantas estériles se han confirmado con este experimento.

NPTII: NEO-FORW 5'-CAG ACA ATC GGC TGC TCT GAT GCC-3'

NEO-REV 5'-CGT CAA GAA GGC GAT AGA AGG CG-3'

45 Promotor-Intrón:

35S-F1 5'-AgAATgCTgACCCACAgATggTTA-3'

ARNi-intr-R1 5'-CTTCgTCTTACACATCACTgTCAT-3'

Intrón-Terminador

ARNi-intr-F1 5'-ATgACAgTgATgTgTAAgACgAAg-3'

50 OCS-R1 5'-TggCgCTCTATCATAgATgTCgCT-3'

Ejemplo de referencia 6



Transformación de plantas de cultivo y producción de líneas homocigotas

1. *Constructos*

Las constructos descritos en el Ejemplo 4 se utilizaron para la transformación de diversas plantas de cultivo por medio de *Agrobacterium*. Los constructos de *Arabidopsis* se pueden utilizar en *Brassica*. Opcionalmente, los genes de los constructos del Ejemplo 4 se pueden intercambiar con el gen endógeno homólogo del cultivo correspondiente, como se proporciona en la descripción. Además, se pueden utilizar homólogos funcionales.

2. *Transformación y producción de DH*

2.1. Maíz

La incorporación de constructos de silenciamiento al genoma del maíz se realiza de acuerdo con los documentos EP-801134, US-5.489.520 o EP 97114654.3 que ilustran la transformación con *Agrobacterium* de protoplastos de maíz DSM6009. El constructo de silenciamiento introducido en las células de maíz confiere un efecto inhibitorio cuando la planta transformada regenerada experimenta meiosis durante la recombinación de manera que la recombinación se omite o se reduce significativamente. Como consecuencia de la actividad de dichos ácidos nucleicos inhibidores, se encontró que numerosos óvulos, respectivamente, polen, contienen un número de cromosomas que se desvía del número normal y son parcialmente o completamente inadecuados, para ser fecundados (óvulos) o como polinizador funcional (polen). En ese caso, los transformantes son machos o hembras estériles o disminuye la producción de semillas.

Algunas microsporas, respectivamente óvulos contenían sin embargo un conjunto de cromosomas haploide funcional normal que resulta de una meiosis en la que ha tenido lugar poca o ninguna recombinación (en comparación con el tipo salvaje). Estas microsporas haploides, respectivamente óvulos son el material de partida para la elaboración de dobles haploides.

Los haploides del maíz se obtienen a partir de microsporas como describen 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) En: In Vitro Haploid Production in Higher Plants, vol. 4, 37-71. Kluwer Academic Publishers. Eds. S Jain, S Sopory y R Veilleux.

Con posterioridad se producen plantas diploides a partir de plantas haploides o bien mediante diploidización espontánea o bien químicamente. Preferiblemente, se seleccionan plantas que contienen una única copia del transgén. Debido a la reducción o eliminación de la recombinación durante la meiosis algunas de estas plantas son homocigotas para todos los alelos. En promedio, 50% de esos dobles haploides contiene el transgén que confiere la regulación a la baja de la recombinación mientras que 50% está libre de ácidos nucleicos transgénicos .

Alternativamente, se produjeron plantas de maíz haploides después de la polinización natural y artificial con un inductor haploide como describe Rotarencu V (2002) Meize Genetics Cooperation News Letter 76: 16. En este caso se obtuvieron semillas que contenían embriones haploides. También en este caso, solamente se conservan los haploides que han perdido el transgén debido a la segregación del material donador hemigigoto.

La duplicación de cromosomas se lleva a cabo como describen Wan, Y y Widholm, J (1995) Z. Pflanzenzuecht 114: 253-255.

Las plantas que contienen una copia del transgén (establecida por medio de transferencia de Southern o la denominada tecnología Invader) se conservan para su uso en cruces con el fin de evitar eventos de transformación repetitiva.

2.2. Arroz

Transformación genética del arroz se lleva a cabo de acuerdo con Zhang Bing y Wei Zhiming (1999) Acta Phytologica Sinica vol 25, Núm. 4, ODatta & Datta (1999) En: Methods in Molecular Biology Vol. 111, 335-347 Eds. Robert D. Hall, Humana Press Totowa, Nueva Jersey.

Después de que dicho ADN inhibitorio que confiere inhibición de la recombinación durante la meiosis se incorpore al genoma del arroz, se utilizan adicionalmente de manera preferente regenerantes que contienen una copia del ADN inhibitorio para elaborar dobles haploides por medio de cultivo de anteras, cultivo de microsporas y cultivo de ovarios de acuerdo con Gosal S et al, (1997) En: In Vitro Haploid Production in Higher Plants, vol. 4, 1-35. Kluwer Academic Publishers. Eds. S Jain, S Sopory y R Veilleux.

2.3. Cebolla

El método de la invención es especialmente potente en cultivos con un número relativamente bajo de cromosomas. La cebolla ( $2n = 2x = 16$ ) es por lo tanto una especie excelente para la aplicación práctica de la presente invención. La transformación en la cebolla se realiza de acuerdo con los protocolos desarrollados por Eady (1995) New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, vol 23: 239-250.

De nuevo se conservan las plantas que contienen una copia del constructo de ADN de silenciamiento que confiere la inhibición de la recombinación durante la meiosis y se utilizan como material de partida para la elaboración de dobles haploides de acuerdo con Keller E y Korzun L. (1996) En: In Vitro Haploid Production in Higher Plants, vol. 3, 51-75. Kluwer Academic Publishers. Eds. S Jain, S Sopory y R Veilleux.

- 5 Con posterioridad se producen plantas diploides a partir de plantas haploides o bien mediante diploidización espontánea o bien químicamente.

#### 2.4. Pepino

El pepino con un número de cromosomas haploide de 7 es también una especie de cultivo, en la que la invención es muy potente. Las constructos de silenciamiento se introducen por medio de transformación con *Agrobacterium* en callo embriogénico como se describe en la Patente Europea EP-97114654.3 o mediante transformación con *Agrobacterium* a través de organogénesis directa de acuerdo con Ganapathi A y Perl-Treves R. En: ISHS Acta Horticulturae 510: VII Eucarpia Meeting on Cucurbit Genetics and Breeding; Mohiuddini A et al, (2000) Plant Tissue Cult 10 (2): 167-173.

15 Después de la identificación de los transformantes con una sola copia del ADN transformado que confiere la inhibición de la recombinación durante la meiosis, se producen haploides por medio de ginogénesis como se describe en la Patente Europea EP 0 374 755.

Con posterioridad se producen plantas diploides a partir de plantas haploides o bien mediante diploidización espontánea o bien químicamente.

#### 2.5. Remolacha azucarera

20 La transformación en la remolacha de azúcar se realiza como describen Hall R et al (1996) Nature Biotechnology 14, 1133-38.

Con posterioridad, se obtienen dobles haploides como describen Pedersen H y Keimer B (1996) En: In Vitro Haploid Production in Higher Plants, vol. 3, 17-36. Kluwer Academic Publishers. Eds. S Jain, S Sopory y R Veilleux.

#### 2.6. *Brassica* sp.

25 La transformación de diversas especies de *Brassica* se lleva a cabo de acuerdo con Moloney M et al., ((1989) Plant Cell Reports 8, 238-242) para *Brassica napus*; Metz T et al., ((1995) Plant Cell Reports 15, 287-292) para brécol (*Brassica oleracea* var. *italica*) y col (*B. oleracea* var. *Capitata*); y Bhalla P y Smith N ((1998) Molecular Breeding 4, 531-541) para coliflor (*Brassica oleracea* var. *Botrytis*).

30 Se prepararon dobles haploides de acuerdo con Palmer C et al, (1996) En: In Vitro Haploid Production in Higher Plants, vol. 2, 143-172. Kluwer Academic Publishers. Eds. S Jain, S Sopory y R Veilleux.

#### 2.7. Berenjena

35 La transformación de *Solanum melongena* se lleva a cabo de acuerdo con Leone et al. (1993) En: Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol. 22, Plant Protoplasts and Genetic Engineering III, Y.P.S. Bajaj ed., Springer-Verlag (Heidelberg), páginas 320-328. Los dobles haploides se preparan de acuerdo con Dumas de Vault, R. y Chambonnet (1982) Agronomie 2: 983-988. Con posterioridad, las plantas diploides se producen a partir de plantas haploides o bien mediante diploidización espontánea o bien químicamente.

#### Ejemplo 7

Mejoramiento genético inverso para transferencia de CMS (esterilidad masculina citoplasmática)

40 La CMS es una de las herramientas más importantes para el fitomejoramiento en la producción de variedades híbridas F1. Los agricultores exigen un fenotipo uniforme (y por lo tanto preferentemente un genotipo) de la planta a partir de las semillas que compran. Con el fin de lograr esto, se ha tenido que excluir la autopolinización de la planta que produce las semillas. Para realizar esto se requiere la emasculación de la línea femenina a mano, que es una actividad costosa y propensa a error.

45 En algunos cultivos la esterilidad masculina natural ofrece una alternativa mejor y más eficaz. Tales cultivos son por ejemplo, pero no se limitan a arroz, remolacha azucarera, zanahoria, y *Brassica* spp. Hasta 1970 casi todo el maíz híbrido fue producido usando el citoplasma T para la producción de F1.

Una línea pura seleccionada como resultado del fitomejoramiento tradicional u obtenida con la ayuda de la metodología de dobles haploides que se ha propagado mediante autofecundación es convertida a la esterilidad masculina, realizando un cruce de esta línea con una línea que es portadora de la esterilidad citoplásmica.

50 Preferiblemente, el polinizador y el donador de CMS se caracterizan genéticamente mediante el uso de marcadores

genéticos tales como, pero no limitados a AFLP, RFLP, RAPD, Invader etc., como es bien conocido por los expertos en la técnica.

5 En este ejemplo, se suprime la recombinación de la línea con esterilidad masculina, como se ilustra en los otros ejemplos. Cuando se logra esta supresión transgénicamente, se seleccionan las líneas que son homocigotas para el transgén. La progenie F1 que resulta del cruce del polinizador con el aceptor de CMS hereda 50% de los cromosomas de ambos progenitores. Los óvulos producidos por las plantas de esta generación se forman en ausencia de recombinación, lo que significa que cuando el número haploide de cromosomas es 9, que es el caso de la coliflor, la zanahoria y la remolacha azucarera, 1 óvulo en 512 óvulos que contienen un conjunto de cromosomas completo hereda exactamente la misma constitución cromosómica que los óvulos o el polen del polinizador. Esto  
10 significa que después de una polinización satisfactoria ya el segundo retrocruzamiento da lugar a semillas en las que el contenido cromosómico del polinizador original ha sido transferido en el entorno citoplásmico de la línea con CMS.

La identificación de esta línea isogénica se lleva a cabo con la ayuda de marcadores moleculares.

#### Ejemplo 8

15 Uso de la invención para producir una línea mantenedora (línea B) a partir de una línea de CMS homocigota (línea A)

Se produjo un mantenedor o línea B de *Daucus carota*, *Brassica oleracea* o *Raphanus sativus* partiendo de una línea estéril masculina citoplásmica homocigota o línea A utilizando la presente invención. En muchos cultivos se utilizan líneas madre estériles masculinas citoplásmica (CMS) para producir semillas híbridas. La línea madre CMS (línea A) se mantiene mediante retrocruzamiento con una línea que tiene la misma o muy parecida constitución nuclear, pero tiene plasma normal, y por lo tanto es fértil masculina (línea B). A menudo, se produce una nueva línea A cruzando genotipos fértiles masculinos de elite con plantas CMS, seleccionando aquellas combinaciones que mantienen la CMS en la descendencia (líneas B, es decir, líneas con "capacidad mantenedora", es decir líneas que carecen de genes restauradores) y retrocruzando la progenie CMS varias veces con la línea B original hasta que la línea A resultante es genéticamente muy similar a la línea B. Sorprendentemente en las especies en las que están presentes genes restauradores (Brassica, zanahoria, rábano), el mejoramiento genético inverso puede proporcionar una línea B correspondiente a partir de cualquier planta CMS homocigota por medio del esquema de mejoramiento genético proporcionado más abajo. Los símbolos utilizados en el esquema de mejoramiento genético son los siguientes:

$R_F$  = Gen restaurador presente

30  $r_{fr}$  = Capacidad de mantenimiento presente/gen restaurador no presente

$R_bR_b$  o  $R_{br_b}$  = Supresor de la actividad del gen diana presente

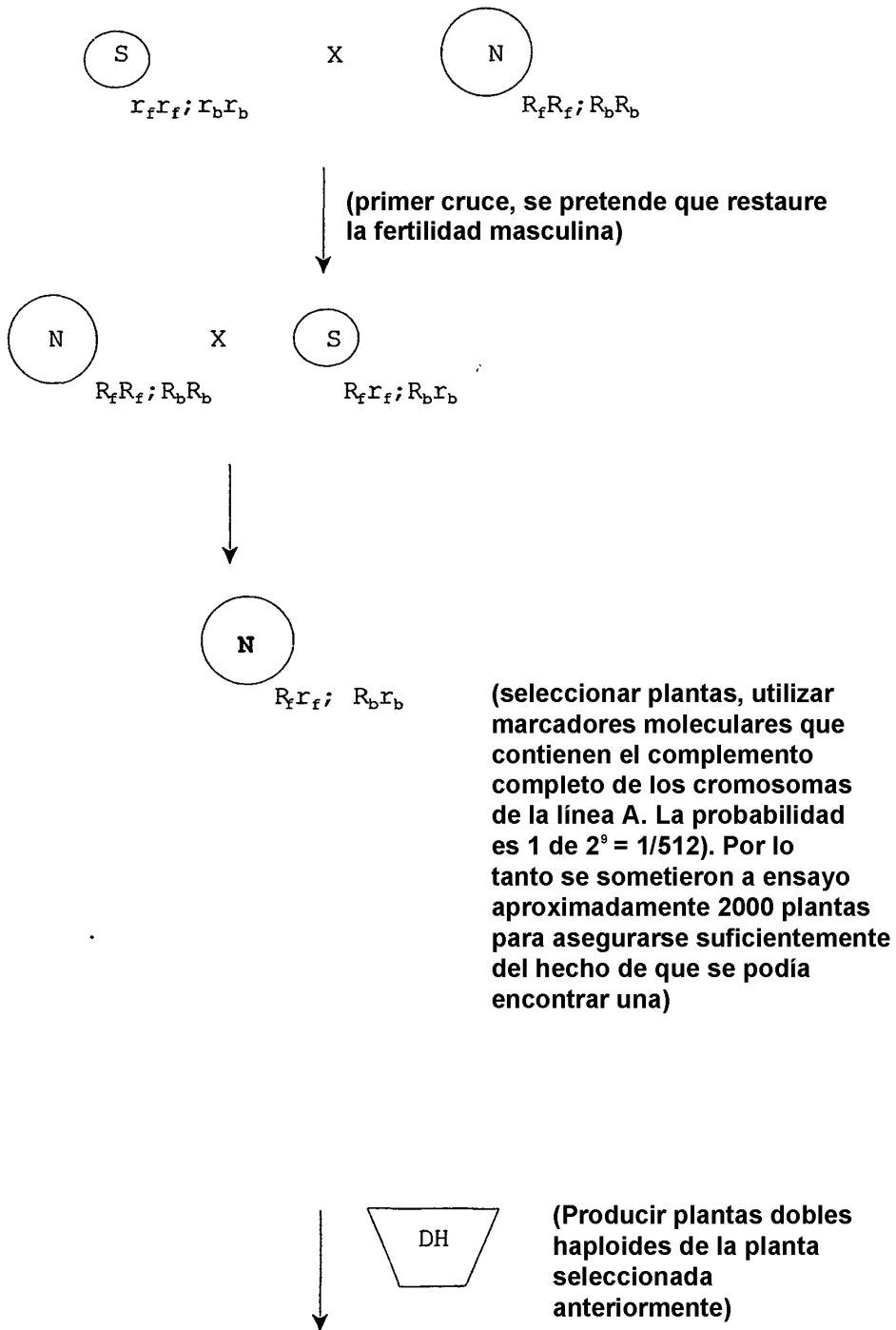
$r_{br_b}$  = Supresor de la actividad del gen diana ausente

N = Citoplasma fértil, normal

S = Plasma estéril masculino citoplásmico

35

Donador, línea A





$r_f r_f$ ;  $r_b r_b$

**(Seleccionar las plantas dobles haploides, utilizando marcadores moleculares que contienen el donador o los cromosomas A. La probabilidad es de 1 de  $2^9 = 1/512$ . Por lo tanto se sometieron a ensayo aproximadamente 2.000 plantas para asegurarse suficientemente de que se podía encontrar una. Esta es la línea mantenedora deseada o línea B)**

Ejemplo 9

Mejoramiento genético inverso utilizando tratamiento con cafeína de células meristemáticas

5 Se esterilizan en superficie semillas de *Brassica oleracea* sumergiéndolas durante 30 minutos en una disolución al 6% de hipoclorito (lejía comercial, concentración final de NaOCl 1,5%) después de lo cual se enjuagan a fondo con MilliQ estéril. Con posterioridad, las semillas se hacen germinar sobre papel de filtro húmedo, estéril. Las semillas germinadas que muestran la raíz primaria se empapan en una disolución de cafeína de 70 mmol/L durante un período de 2 horas después de lo cual las semillas se enjuagan con MilliQ estéril.

10 Con posterioridad, se deja que las semillas se recuperen colocándolas sobre papel de filtro húmedo, estéril durante 24 horas. El tratamiento óptimo para las diferentes especies de plantas puede ser diferente y se debe establecer sometiendo a ensayo diferentes concentraciones de cafeína, diferentes tiempos de incubación y diferentes tiempos de recuperación. Después del tratamiento, las células meristemáticas se ponen en cultivo de tejido mediante la preparación de las puntas de las raíces y transfiriéndolas a medio MS que contiene 0,5 µg/L de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) en la oscuridad durante un período de 2 semanas para inducir el callo.

15 Después de esta inducción de callo, las plantas se regeneran colocando el callos en un medio que contiene BA de 0,5 mg/L (16/8 horas de luz/oscuridad, 25°C). Después de la regeneración se analizan molecularmente los brotes para determinar la presencia de cada uno de los cromosomas haploides mediante el uso de marcadores genéticos para cada cromosoma, preferiblemente marcadores que son polimorfos para cada conjunto de cromosomas. Los brotes haploides que contienen una dotación completa de cromosomas se duplican mediante tratamiento con colchicina.

20

Ejemplo 10

Mejoramiento genético inverso mediante inducción química de aneuploidía seguida de selección de plantas haploides que contiene un conjunto completo de cromosomas

25 Plantas en floración de *Brassica oleracea* que contienen yemas florales jóvenes que se encuentran en un estado pre-meiótico se tratan con diferentes compuestos químicos conocidos por inducir aneuploidía seleccionados entre etopósido, podofilina, benomilo, hidrazida maleica, atrazina, butaclor, APM, griseofulvina, vinblastina-sulfato, diazepam, colchicina, cloruro de cadmio, econazol, pirimetamina, tiabendazol, tимерozal o nocodazol de acuerdo con CBSR Sharma (1990) Mutagenesis 5, 105-125 y las referencias de la misma, y Sandhu et al. (1991) Mutagenesis 6, 369-373.

30 El compuesto químico se aplica sumergiendo las yemas florales pre-meióticas en una disolución o pulverizando una disolución sobre las yemas florales pre-meióticas. Como la fase de desarrollo de las yemas florales de una planta puede ser variable y por lo tanto la eficacia del compuesto químico aplicado puede ser diferente para cada una de las yemas florales individuales, el tratamiento se repite varias veces para aumentar la probabilidad de exponer la fase de desarrollo apropiada para un número máximo de yemas florales. Además del compuesto químico, la disolución contiene un agente tensioactivo como Agralin (Syngenta, Roosendaal, Países Bajos) (0,25 ml/100 ml).

35

Después de la aplicación, las yemas tratadas se etiquetan y se cultivan hasta la fase óptima para la regeneración de microsporas que se produce en promedio cuando las yemas tienen una longitud de aproximadamente 3 milímetros. Las microsporas purificadas se cosechan de estas yemas y se les proporciona un tratamiento de estrés de 2 días a 32°C, que es óptimo para inducir el desarrollo esporofítico de las células haploides.

40 Después de la regeneración, los brotes se analizan para determinar la presencia de cada uno de los cromosomas haploides como se ha descrito anteriormente. Los brotes haploides que contienen una dotación completa de cromosomas se duplican mediante tratamiento con colchicina.

Ejemplo 11

Utilización de la invención para proporcionar variedades propagadas por semillas en especies que ahora se multiplican comercialmente mediante técnicas de propagación vegetativa

5 En muchas especies de plantas comerciales, por ejemplo, muchas plantas ornamentales y leñosas, la propagación vegetativa o clonal es la forma exclusiva o predominante de propagación comercial. En los programas de mejoramiento genético de estas especies, se identifican genotipos superiores en poblaciones segregantes, p. ej., en una F2, y a continuación estas se mantienen y se multiplican mediante mecanismos de multiplicación vegetativa, que son bien conocidos por los expertos en la técnica. En muchas de estas especies, el método de propagación vegetativa de plantas (heterocigotos) se ha convertido en dominante debido a que la producción de variedades híbridas a través de semillas (como se realiza en muchos cultivos anuales y bianuales) requiere en primer lugar 10 varias generaciones de endogamia de las líneas parentales, que en muchas especies leñosas y arbóreas tomarían demasiado tiempo para cualquier programa comercial. Por medio de la propagación vegetativa, los genotipos superiores se multiplican en una población de partida de plantas genéticamente idénticas, y no se "pierde" tiempo en producir líneas parentales como es el caso en los cultivos híbridos propagados por semillas.

15 Sin embargo, también existen claras desventajas en la propagación vegetativa. La logística de la producción de las plantas a través de la propagación vegetativa es mucho más difícil que a través de semillas. Las semillas se pueden almacenar fácilmente, y con frecuencia sin problemas durante mucho tiempo. Las semillas se pueden sembrar siempre que se requieran cantidades comerciales de población de partida de plantación. En el caso de material propagado vegetativamente, es mucho más difícil responder a las necesidades comerciales variables para la nueva 20 población de partida de plantación. Además, la producción vegetativa requiere el uso de mano de obra y tecnología intensivos, y por lo tanto es relativamente costosa. Las enfermedades, especialmente los virus, son una amenaza constante para la multiplicación vegetativa. Muchos virus no son transmitidos por semillas, pero se transmiten fácilmente a la descendencia clonal obtenida mediante técnicas de reproducción vegetativa. Por esta razón, algunos países tienen estrictas normas de cuarentena que rigen la importación de plantas producidas vegetativamente. 25 Además, no todos los genotipos funcionan igualmente bien en la propagación vegetativa. Algunos son difíciles de propagar de esta manera. Por ejemplo, la capacidad de enraizamiento de esquejes de árboles varía entre especies y clones.

A través del mejoramiento genético inverso de acuerdo con la invención el genotipo de la planta propagada clonalmente heterocigota se puede resintetizar ahora y proporcionar semillas híbridas con dicho genotipo.

30 La transformación de *Malus domestica* se lleva a cabo de acuerdo con Yepes, L.M. y H.S. Aldwinckle. 1989. Genetic transformation of apple. Resumen. UCLA Symposium on Plant Gene Transfer. Park City, Utah, 1 – 7 de Abril, 1989.

Los dobles haploides se preparan de acuerdo con Zhang et al. (1992) Plant Breeding 108:173-176. Con posterioridad, se producen plantas diploides a partir de plantas haploides o bien mediante diploidización espontánea o bien químicamente.

35 Ejemplo 12

Utilización del mejoramiento genético inverso para mejorar la producción de semillas en cultivos híbridos

La producción de semillas híbridas a escala comercial puede encontrar un gran número de dificultades que conduce a una reducción de la calidad o cantidad de las semillas. Esto puede dificultar su vez, la comercialización de variedades híbridas de alta calidad. Estas dificultades pueden estar causadas por varios factores diferentes como 40 una mala capacidad intrínseca de producción de semillas de la línea materna del híbrido o una diferencia en el tiempo de floración, la altura del cultivo o la morfología de la flor (evitando que los insectos lleven a cabo la polinización cruzada debido a una preferencia por un tipo de flor sobre el otro) de las líneas materna y paterna del híbrido.

45 Mediante la aplicación del mejoramiento genético inverso de acuerdo con la invención a un híbrido que tiene excelentes propiedades agronómicas pero pobres características de producción de semillas (que hace menos atractiva o incluso imposible la comercialización del híbrido), este híbrido se puede resintetizar utilizando líneas que difieren de las líneas materna y paterna originales. Mediante la selección de una combinación de líneas que permite la producción de semillas comerciales tanto de alta calidad como en gran cantidad, la comercialización del híbrido se vuelve económicamente viable o más atractiva.

50

**LISTA DE SECUENCIAS**

- <110> Rijk Zwaan Zaadteelt en Zaadhandel B.V. Dirks, Robert Helene Ghislain van Dun, Cornelis Maria Petrus Reining, Kornelius
- 5 <120> MEJORAMIENTO GENÉTICO INVERSO
- <130> L/AS95/MK/15
- 10 <140> PCT/EP 02/09526  
<141> 23-08-2002
- <150> EP 01 203 193.6  
<151> 23-08-2001
- 15 <150> EP 02 075 582.3  
<151> 12-02-2002
- <160> 26
- 20 <170> PatentIn versión 3.2
- <210> 1  
<211> 380
- 25 <212> ADN  
<213> Brassica oleracea
- <220>  
<221> rasgo misc
- 30 <223> Secuencia de nucleótidos parcial de BoDMC1
- <400> 1
- |                                                                     |     |
|---------------------------------------------------------------------|-----|
| aagaggcttt tggggaattt aggtctggga aaactcaatt agcacatacc ctttgtgtca   | 60  |
| ccaocgcagct gcctacaaga atgaaagggtg ggaatgggaa agtggcttac attgacactg | 120 |
| agggaacott ccgccctgat cggattgtcc aaattgctga aagatttga atggatcccg    | 180 |
| gagctgtgct tgacaatate atttatgctc gtgcttacac ctatgagcat cagcacaact   | 240 |
| tgctttcttg ccttgctgca aaaatgtccg aggaaccatt taagattctg attgttgaet   | 300 |
| caatcattgc tttattccga gtggatttca ctggaagagg agaactcgca gaccgccagc   | 360 |
| 35 aaaaaactago tcagatgctt                                           | 380 |
- <210> 2  
<211> 381  
<212> ADN
- 40 <213> (Brassica carinata)
- <220>  
<221> rasgo misc  
<223> Secuencia de nucleótidos parcial de BcDMC1
- 45 <400> 2

**REIVINDICACIONES**

1. Método para producir de manera eficaz plantas homocigotas a partir de una planta de partida heterocigota, que comprende:

a) proporcionar una planta de partida heterocigota;

5 b) permitir que la planta de partida produzca células haploides a la vez que evita o suprime al menos parcialmente la aparición de recombinación con el fin de obtener un número limitado de células haploides genéticamente diferentes;

c) crear plantas homocigotas a partir de las células haploides obtenidas de ese modo; y

d) seleccionar las plantas que tienen el conjunto deseado de cromosomas,

en donde la prevención o supresión de la recombinación se consigue:

10 - interfiriendo con uno o más genes diana implicados en la recombinación, en donde la interferencia con el gen diana consiste en la introducción de una o más mutaciones en el gen diana que conducen a la alteración de su función biológica, en donde las una o más mutaciones se introducen de manera específica mediante métodos de recombinación homóloga o inducción de mutaciones basada en oligonucleótidos; o

15 - mediante un compuesto químico que evita la formación del huso o mediante un compuesto químico que induce aneuploidía.

2. Método como se reivindica en la reivindicación 1, en donde el gen diana está en particular

- implicado en las roturas de la doble cadena, y se selecciona en particular del grupo que consiste en SPO11, MER1, MER2, MRE2, MEI4, REC102, REC104, REC114, MEK1/MRE4, RED1, HOP1, RAD50, MRE11, XRS2, o sus homólogos funcionales, o

20 - implicado en el emparejamiento de cromosomas y/o el intercambio de cadenas, y se selecciona en particular del grupo que consiste en RHD54/TID1, DMC1, SAE3, RED1, HOP1, HOP2, REC8, MER1, MRE2, ZIP1, ZIP2, MEI5, RAD51, RAD52, RAD54, RAD55, RAD57, RPA, SMC3, SCC1, MSH2, MSH3, MSH6, PMS1, SOLODANCERS, HIM6, CHK2, o sus homólogos funcionales, o

25 - implicado en el proceso de recombinación meiótica, y se selecciona en particular del grupo que consiste en SGS1, MSH4, MSH5, ZIP1 y ZIP2, o sus homólogos funcionales.

3. Método reivindicado en la reivindicación 1 ó 2, en donde la etapa de creación de plantas homocigotas a partir de células haploides obtenidas de ese modo se lleva a cabo por medio de una técnica de dobles haploides, restitución de la segunda división o auto-polinización de la planta que contiene las células haploides para producir una población de semillas, utilizando la genotipificación molecular para identificar las semillas homocigotas entre la población y haciendo crecer las plantas a partir de las semillas homocigotas así identificadas.

30



**Figura 1**

AAGAGGCTTTTGGGGAATTTAGGTCTGGGAAAACCTCAATTAGCACATACCCTTTGTGTCA  
CCACGCAGCTGCCTACAAGCATGAAAGGTGGGAATGGGAAAGTGGCTTACATTGACACTG  
AGGGAACCTTCCGCCCTGATCGGATTGTCCAAATTGCTGAAAGATTTGGAATGGATCCCG  
GAGCTGTGCTTGACAATATCATTTATGCTCGTGCTTACACCTATGAGCATCAGCACAACT  
TGCTTCTTGGCCTTGCTGCAAAAATGTCCGAGGAACCATTTAAGATTCTGATTGTTGACT  
CAATCATTGCTTTATTCCGAGTGGATTTCACTGGAAGAGGAGAACCTCGCAGACCGCCAGC  
AAAAACTAGCTCAGATGCTT

**Figura 2**

ACAGAGGCTTTTGGGGAATTCAGGTCTGGGAAAACCTCAGTTAGCACATACCCTTTGTGTC  
ACCACGCAGCTGCCTACAAGCATGAAAGGTGGGAATGGGAAAGTGGCTTACATTGACACT  
GAAGGAACCTTCCGCCCTGATCGAATCGTCCCCATTGCTGAAAGATTTGGAATGGATCCA  
GGAGCTGTGCTTGACAATATCATCTATGCTCGTGCTTACACCTATGAGCATCAGTACAAC  
TTGCTTCTTGGCCTTGCTGCAAAAATGTCTGAGGAACCATTTAAGATTCTGATTATTGAC  
TCGATCATTGCTTTATTCCGAGTTGATTTCACTGGAAGAGGGGAACTCGCAGACCGCCAG  
CAAAAACCTAGCTCAGATGCTT

**Figura 3**

AGAGGCTTTTGGGGAATTCAGGTAAGGATCAATCAAATATTGTATTAACCTTGTGGTAGA  
GCTTTAGTAGAATATTTTCATCTAACTCTGCTGTATGAACTATTTATTTCAGATCTGGAAAG  
ACACAACCTTGCTCATACTCTCTGTGTCTCTACTCAGGTTTCAGCTCTGATCTTAGTCAGAA  
GCAATGGAACATCATTACCGTCTAGATTACTTCTGATCCTTTATATGCTTTATGCTGAAT  
CATGATATCATTCCGAGTTTAAACAAGATTGCCAATTGATTTGTCTGATTTACTGCAGCTT  
CCGACTAGTATGAAAGGAGGGAATGGAAAAGGTGGCTTACATTGATACTGAGGGAACATT  
GTATCCTTGCTAATATTTTCGCAACTCATGAAAATTCAAACCTAGCACCTATTACTCTCTTC  
ATTAAGTAGCAGCTGCAGAAACTCAAGTGAATGCTGCTTCCTTCCATTTTATCTTTTTTC  
CTCAACCAAAGCGTACTACAGTCGGCCAGATCGTGTTGTTCCCATTTGCTGAAAGATTTGG  
AATGGACGCTGGAGCAGTTCTTGACAATGTAAAGGGTCTTTTACACCCACCATTTAATCA  
TCTACTGCTCTTTGTTTTAGTGTACTGATTTCTTATCCTTTCTTTCCTTATTATGTGATCA  
GATCATTATGCTCGCGCATAACATATGAACATCAATATAACCTGCTTCTTGGTCTGGC  
AGCAAAAATGGCTGAAGAGCCTTTCAGACTTCTGGTGAAAGCCACATCATCTGCTTTATC  
TTGAATAAGACCATTACTGGCGGCAGTTGTCTCAGATACTGAAATTTTACTTGCAGATTG  
TTGACTCTGTGATTGCTTTATTTTCGAGTGGATTTCACTGGAAGAGGAGAGCTTGCAGACC  
GTCAGGTATAACTAAATACACAAGCATAATATTTGATTAATTAATAAACCTATCTCTGATA  
TTTATCTGTGTTGAGAAGAACCTGCAATCACCTGTTCTGGTAGACTTTTTCTGAATGCTT  
ATGCCTTCTTGCCATTTTCAGCAAAAACCTAGCTCAGATGCTT

**Figura 4**

ACAGAGGCTTTTGGGGAATTCAGGTAAGGATCAACTAACTATTGCTTTAGCTTTGTGGTA  
GAAGCATTAGTAGAATTTTACATCTAACTGTCTGAATGAACTATTTATTCAGATCTGGAA  
AGACACAACCTTGCTCATACTCTCTGTGTCTCTACTCAGGTTACCTCTGATCTTAGTCAG  
AAGCAATGGAACATCTTTACCTTCTAGATTACTCCTGATCCTTTATATGCTTTATGCTTA  
ATCATGGTATCATCCTGAATTTAACAAGATTGCCAATTGATTTGTCTGGTTTATTGCAGC  
TTCCTACAAGCATGAAAGGAGGGAATGGAAAGGTGGCTTACATTGACACCGAGGGAACATTG  
TATCCTTGCTAATATTTCTCTACTCATAACAGCATGAACTACAACTAGCTCCTATTAG  
TCTCTTCACTAAGTAGCAGCTGCAGAAGCTCAAGAGAATCTTCCCTCCTATATTTTTTC  
CCTCAACTAAGTGTACTATAGTCGGCCAGATCCGTGTGGTGCCCATGCTGAAAGATTTG  
GAATGGACGCAGGAGCAGTTCTTGACAATGTTAAGTGTCTTTTATTCACTCATTTAATCA  
TCTACTGCTCTTTGTTTCAGCGTACTGATTTCTCAGCTGATTTTCTAATCCTTTCCTTTCCTAA  
TCACGTGAATGAATCAGATCATTTATGCTCGCGCATAACACATACGAACATCAATACAACCTG  
CTTCTTGGTTTGGCAGCAAAAATGGCTGAAGAGCCTTTCAGACTTCTGGTGAAAGCCACAAC  
TTCTGGTTTATCCTGAATAAGTCCATTACTGATGGCAGTTGTCTCAGATACTGAAATTTTAC  
TTGCAGATCATTGACTCCGTGATTGCTTTATTTTCGAGTGGATTTCACTGGAAGAGGAGAGCT  
TGCAGATCGCCAGGTATGAAATACAGAGCATGATAGCTGATTTATTAAGTTCCTCCTTTATTG  
CTATTTACGGTTGTGTTAAGAAGACCTGCAATCACCTGTTCTGATGTGCTATCTTTTGAATG  
CCTACACTTTGTTGCCATTTACAGCAAAAACCTAGCTCAGATGCTT

**Figura 5**

AGAGGCTTTTGGGGAATTCAGGTAACAATCAACTAATTATCGTTTTACCTTTGGTGTAGA  
 AGCATTATCTGAATATTTTCATCTAACTCTCTGCTGAATGAACAATTTATTCAGATCTGGA  
 AAGACACAACCTTGCTCATACTCTATGTGTCTCTACTCAGGTTACACCTCTGATCTTAGTTA  
 GAAGCAATGAAGTTTTTGACCTTCTAAATCCCTCCTTATCCTTTATATGCTTTAGACTTA  
 ATCATGGTATCATCCAGAACATGACAAGAGTGTCAATTCGTTTGTCTGATTTATTTTCAGC  
 TTCCTACTAGCATGAAAGGAGGGAATGGAAAGGTGGCTTACATTGATACTGAGGGAACGT  
 TGTATCCTTGCTGATATTTCTTACTCATGTAGCATCAATAATCAAACCTAGCACTTAAAA  
 GTCTCCTCATGAAGTAGCAGCTGTAGAAACAAAAGAGAATGCTTCCTTCCATTTTATCTT  
 GTTTCTTCAACCTAAGTGTACTATAGTCGGCCAGATCGTCTTGTGCCCATTGCTGAAAGA  
 TTTGGAATGGACGCAGGAGCTGTTCTTGACAATGTAAAGCGTCTTTTGACCCTCATTTAA  
 TGATCTCTCCCTCTCTTTGTTTAGCTTACTGATTTTTCAGCTGATTTCTTATCATTCCCT  
 TTTCCCCTTATGATGTGAATTCACCAGATCATTTATGCTCGTGCATACACATACGAACAT  
 CAGTACAGCCTGCTTTTTGGTCTGGCAGCAAAAATGGCTGAAGAGCCTTTCAGACTTCTG  
 GTGAAAGCCACAACCTCCAGTTTATCCTGAATAGAATCATTGCTAATGGACTCATATACT  
 GAAATATTACTTGCAGATTGTTGACTCTGTGATTGCTTTATTTTCGAGTGGATTTCACTGG  
 AAGAGGAGAACTTGCAGAACGTCAGGTATAACAAAATACAGAAATATGATATTTGATTTA  
 TAAGTTCCTGTCTCTTGATATTTATCTTTGTTCTAAGAAGAGCCTGCAATCACCTATTCT  
 AAATATGTTTTAATTTGAGTGACTGCACCTTCTTGCCATATCCAGCAAAAACCTAGCTCTG  
 ATGCTT

**Figura 6**

AACGGGTGGTGATGGGGTGGTTAAAGTTTAGGGAAGCTGGAAGGAAGTTTGATTGTTTA  
AGCAGCCTGAATACTGCATTTCCCGTTCCTGTTCTTGTAGAGGAAGTCGAAGATATTGTT  
AGTTTGGCAGAGTACATACTGGTGGTGGAAAAGGAAACAGTATTCAGCGTTTAGCAAAT  
GACATGTTTTGCAAGACGAACCGCTGCATCGTCGTCACAGGAAGAGGCTATCCTGATGTC  
TCTACAAGAAGGTTCTTGCGACTCCTGATGGAGAAGTTGCAACTACCTGTGCATTGTCTA  
GTTGACTGTGATCCATATGG

**Figura 7**

AACGGGTTGGTGATGGGGTGGTTAAAGTTTAGGGGAAGCTGGAAGGAAGTTTGATTGTTTA  
AGCAGCCTGAGTACTGCATTTCCCGTTCCTGTTCTTGTAGAGGAAGTCGAAGATATTGTT  
AGTTTGGCAGAGTACATACTGGTGGTGGAAAAGGAAACAGTATTCCAGCGTTTAGCAAAT  
GACATGTTTTGCAAGACGAACCGCTGCATCGTCGTCACAGGAAGAGGCTATCCTGATGTC  
TCTACAAGAAGGTTTTTGC GACTCCTGATGGAGAAGTTGCAACTACCTGTGCATTGTCTA  
GTTGACTGTGATCCATAT

**Figura 8**

GTTTTTATGGCTCATATTGGATGTTTTGTCCCGGCTGCATCGGCCAAAATCGGCCTAGCCA  
GAGAGATTTTCACGCGACTCTATTCGGAAGAGTCGACGCACAACAGCCAGTCGTCATTCCAG  
TTGGAATTGATACAAATGAGTCGAATATTGTCATCGTCGTCGGACCGGTCACTGATTTTGAT  
TGACGAATTCGGAAGGGA ACTAATACTGTGGATG



## Figura 9

>[gi|1582703|prf|2119252A](#) gen MSH5 [*Saccharomyces cerevisiae*]  
Longitud = 901

Puntuación = 62,0 bits (149), Esperado = 2e-09  
Identidades = 29/72 (40%), Positivos = 44/72 (60%)  
Marco = +2

Problema: 5 FMAHIGCFVPAASAKIGLAREIFTRLYSEESTHNSQSSFQLELIQXXXXXXXXXXXXXXXXX 184  
++A IGCFVPA A+IG+A +I TR+ ++E+ + +QSSF L+ QM  
Sujeto: 661 YLAQIGCFVPAERARIGIADKILTRIRTQETVYKTQSSFLDSQOMAKSLSLATEKSLIL 720

Problema: 185 XXEFGKGTNTVD 220  
E+GKGT+ +D  
Sujeto: 721 IDEYGKGTDILD 732

>[gi|3108220|gb|AAC62533.1|](#)

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/list.cgi?O=3108220\[pgil\]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/list.cgi?O=3108220[pgil])"TYPE=PICT;ALT=LocusLinkinfo"[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/list.cgi?O=3108220\[pgil\]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/list.cgi?O=3108220[pgil]) (AF048986)

Homólogo MutS 5 [*Homo sapiens*]  
Longitud = 834

Puntuación = 59,7 bits (143), Esperado = 8e-09  
Identidades = 32/72 (44%), Positivos = 40/72 (55%)  
Marco = +2

Problema: 5 FMAHIGCFVPAASAKIGLAREIFTRLYSEESTHNSQSSFQLELIQXXXXXXXXXXXXXXXXX 184  
FMA +G FVPA A+IG IFTR++S ES S+F ++L Q+  
Sujeto: 610 FMALVGSFVPAEAEIGAVDAIFTRIHSCEISLGLSTFMIDLNQVAKAVNNATAQSLVL 669

Problema: 185 XXEFGKGTNTVD 220  
EFGKGTNTVD  
Sujeto: 670 IDEFGKGTNTVD 681

>[gi|5814102|gb|AAD52100.1|](#) (AF107355) MSH5 [*Mus musculus*]  
Longitud = 258

Puntuación = 58,2 bits (139), Esperado = 2e-08  
Identidades = 31/72 (43%), Positivos = 41/72 (56%)  
Marco = +2

Problema: 5 FMAHIGCFVPAASAKIGLAREIFTRLYSEESTHNSQSSFQLELIQXXXXXXXXXXXXXXXXX 184  
FMA +G FVPA A+IG+ IFTR++S ES S+F ++L Q+  
Sujeto: 141 FMALVGSFVPAEAEIGVIDAIFTRIHSCEISLGLSTFMIDLNQVAKAVNNATEHSLVL 200

Problema: 185 XXEFGKGTNTVD 220  
EFGKGTN+VD  
Sujeto: 201 IDEFGKGTNSVD 212

>[gi|11359791|pir|T43201](#)

[gi|3831701|gb|AAC70065.1|](#) Homólogo proteína MutS - *Caenorhabditis elegans* (fragmento)  
(AF070070) homólogo MutS [*Caenorhabditis elegans*]  
Longitud = 933

Puntuación = 52,4 bits (124), Esperado = 1e-06  
Identidades = 26/70 (37%), Positivos = 38/70 (54%)  
Marco = +2

Problema: 5 FMAHIGCFVPAASAKIGLAREIFTRLYSEESTHNSQSSFQLELIQXXXXXXXXXXXXXXXXX 184  
F++HIG FVPA AKIG+ I TR+++ +S + S+F ++ Q+  
Sujeto: 657 FLSHIGSFVPAHAKIGIVDRIVTRMFTVDSVLDMSTFAKDVEQVALALRKATGNSLVI 716

Problema: 185 XXEFGKGTNT 214  
EFGKGT T  
Sujeto: 717 IDEFGKGTMT 726

Figura 10

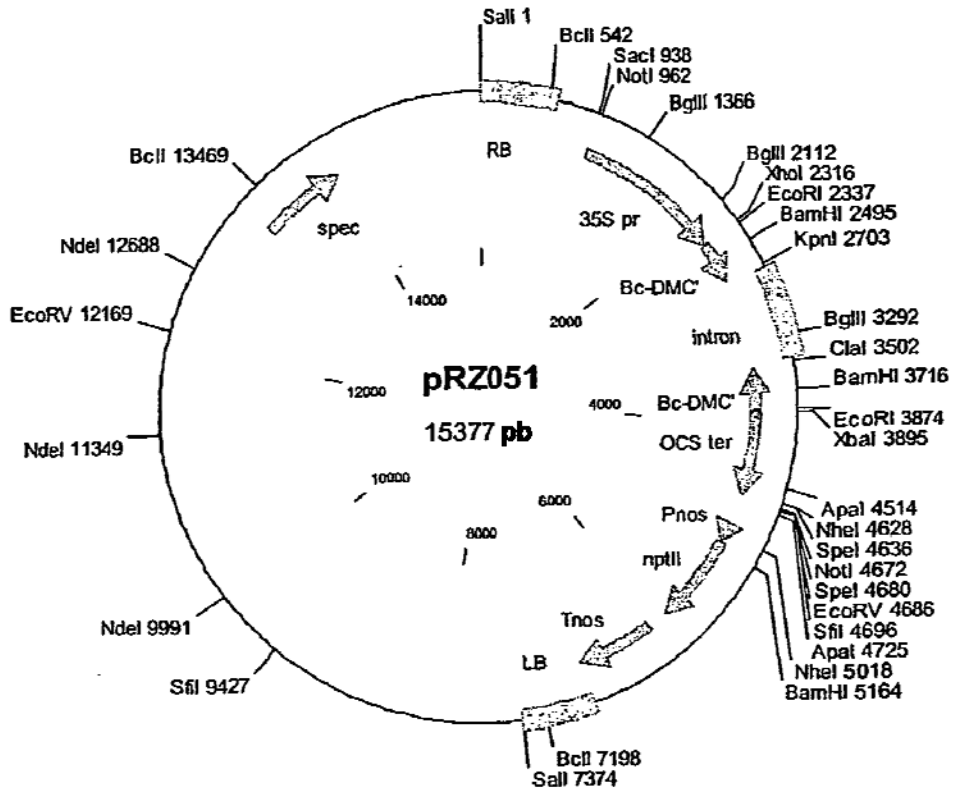


Figura 11

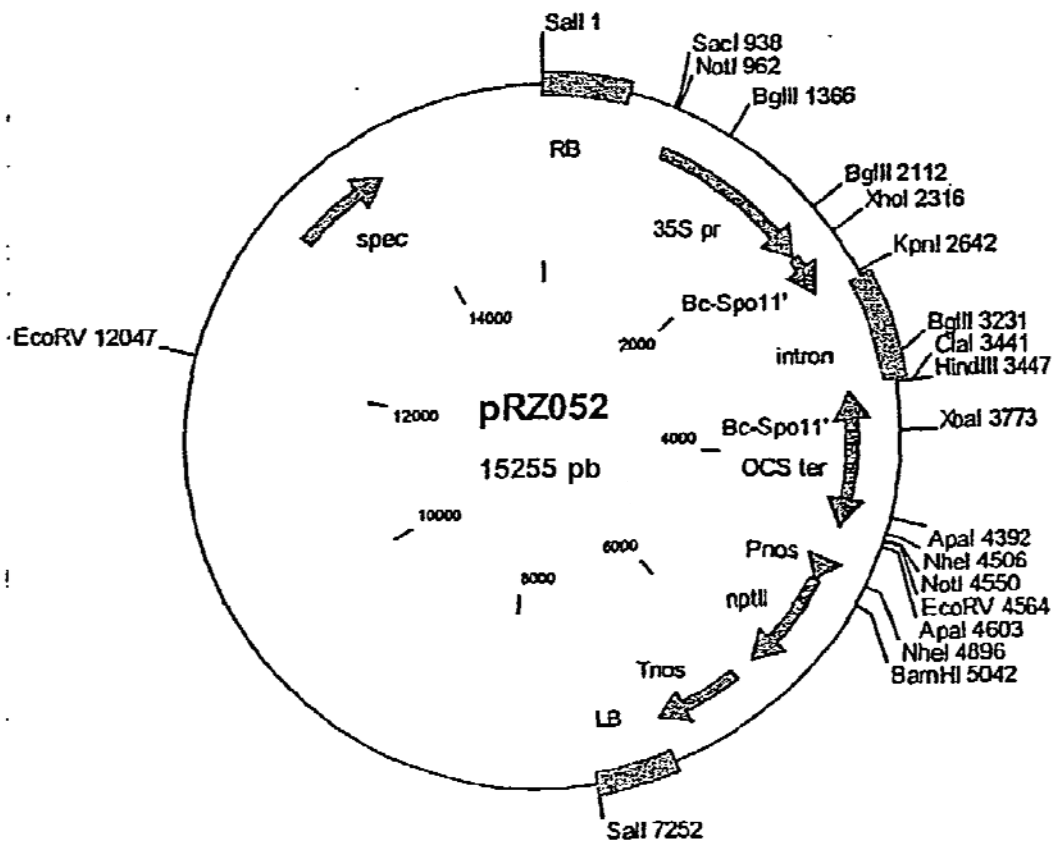
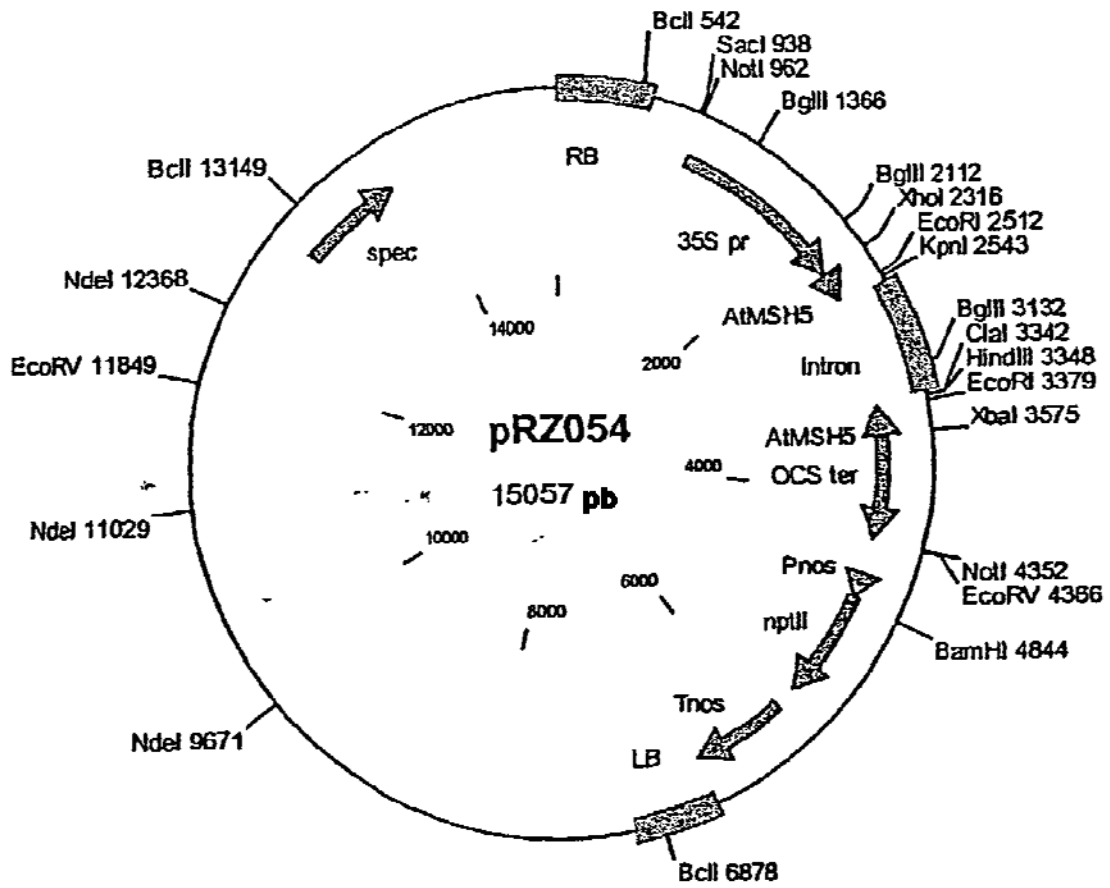


Figura 12



**Figura 13**

TGTCCTGGCTGCACGGCCAAAATCGGCCTAGCCAGAGAGATTTTCACGCGACTCTATTCGGA  
AGAGTCGACGCACAACAGCCAGTCGTCATTCCAGTTGGAATTGATACAAATGAGTCGAATAT  
TGTCATCGTCGTCGGACCGGTCACTGATTTTGATTGACGAATTC

**Figura 14**

TGTCCCGGCTGCGCCAAAATCGGCCTAGCCAGAGAGATTTTCACGCGACTCTATTGGAA  
GAGTCGACGCACAACAGCCAGTCGTCATTCCAGTTGGAATTGATACAAATGAGTCGAATA  
TTGTCATCGTCGTCGGACCGGTCACTGATTTTGATTGACGAATTC

**Figura 15**

TGTCCCGGCGCATCGGCCAAAATCGGCTAGCCAGAGAGATTTTCACGCGACTCTATTTCG  
GAAGAGTCGACGCACAACAGCCAGTCGTCATTCCAGTTGGAATTGATACAAATGAGTCGA  
ATATTGTCATCGTCGTCGGACCGGTCACTGATTTTGATTGACGAATTC

**Figura 16**

TGTCCCGGCTGCATCGGCCAAAATCGGCCTAGCCAGAGAGATTTTCACGCGACTCTATTC  
GGAAGAGTCGACGCACAACAGCCAGTCGTCATTCCAGTTGGAATTGATACAAATGAGTCG  
AATATTGTCATCGTCGTCGGACCGGTCACTGATTTTGATTGACGATTC