

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 101**

51 Int. Cl.:

<b>A01H 5/10</b>	(2008.01)
<b>A01H 1/04</b>	(2006.01)
<b>A01H 1/08</b>	(2006.01)
<b>A01H 3/04</b>	(2006.01)
<b>C12N 15/82</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.09.2012 PCT/EP2012/069191**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.04.2013 WO13045616**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.09.2012 E 12766097 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.01.2018 EP 2760278**

54 Título: **Reproducción del cuarteto**

30 Prioridad:  
**29.09.2011 EP 11183362**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.03.2018**

73 Titular/es:  
**RIJK ZWAAN ZAADTEELT EN ZAADHANDEL B.V.  
(100.0%)  
Burgemeester Crezeelaan 40  
2678 KX De Lier, NL**

72 Inventor/es:  
**VAN DUN, CORNELIS, MARIA, PETRUS**

74 Agente/Representante:  
**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 661 101 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Reproducción del cuarteto

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método para la producción de un conjunto de semillas que son genéticamente idénticas a los gametos masculinos de los cuales surgen. Esta invención por lo tanto conduce a un conjunto de semillas que contiene un número limitado de semillas en las que los cromosomas maternos están ausentes, cuyo conjunto se compone de parejas de semillas complementarias genéticamente que cuando crecen las plantas a partir de las semillas se cruzan resultando en esencia el mismo híbrido.

10 ANTECEDENTES

La reproducción de plantas corresponde a la domesticación de especies de plantas en beneficio de los seres humanos para obtener alimentos, piensos y fibras en calidad y cantidad suficiente. La reproducción de plantas es una ocupación muy antigua de la humanidad y solamente en el curso del siglo XX el conocimiento práctico adquirió una base científica. La reproducción de plantas se basó originariamente en la selección y propagación de aquellas plantas que en los campos locales estaban funcionando bien. Con el redescubrimiento de las leyes genéticas y el desarrollo de herramientas estadísticas la reproducción de plantas se basó en conocimientos genéticos y fue soportado tecnológicamente por métodos tales como haploides duplicados (DH) – ver por ejemplo Haploids in Crop Improvement II eds; Palmer C, Keller W y Kasha K (2005) en: Biotechnology in Agriculture and Forestry 56 Eds; Nagata T, Lörz H y Widholm J. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, ISBN 3-500-22224-3 – y marcadores moleculares – ver por ejemplo De Vienne ed. (2003) Molecular Markers in Plant Genetics and Biotechnology. Science publishers Inc. Enfield, NH USA. ISBN 1-57808-239-0.

25 La reproducción de plantas proporciona conceptos genéticos adaptados a un entorno específico que permita su exploración de una manera económica. Este objetivo de la reproducción de plantas se adquiere a través de la utilización eficiente de la variación genética que existe dentro del germoplasma de especies de plantas. Tales conceptos genéticos comprenden combinaciones de genes que conducen a un fenotipo deseable en un ambiente concreto. Esto significa que las partes de la planta que son cosechadas se maximizan en rendimiento y calidad, al mas bajo coste posible requerido para cultivar las plantas y cosechar el producto. Cuando la reproducción de plantas se aplica a nivel comercial, la producción de semillas es también un asunto importante. La producción de semillas tiene como objetivo la multiplicación de plantas mediante la reproducción sexual, en la que la composición genética se conserva.

35 Además, las semillas comerciales necesitan ser de suficiente calidad para permitir una germinación eficiente. La preservación de la constitución genética a través de la reproducción sexual es sin embargo una paradoja, porque la reproducción sexual existe fundamentalmente para crear descendencia con nuevas combinaciones de alelos. Los mecanismos genéticos que actúan durante la reproducción sexual han evolucionado para aumentar la variación genética, con el fin de aumentar las posibilidades de supervivencia de unas especies en un entorno cambiante.

40 La recombinación meiótica, el surtido de cromosomas independientes y el sistema de apareamiento son los principales factores que contribuyen a este respecto. Sin embargo, la uniformidad en la descendencia a través de la reproducción sexual puede lograrse únicamente cuando las plantas progenitoras son completamente homocigóticas. La combinación de gametos de tales plantas conducirá a la reproducción exacta de la composición genética de los progenitores en cada generación subsiguiente.

50 En muchos cultivos, las semillas comerciales resultan a partir de un cruce de dos líneas progenitoras homocigóticas. Esta aplicación asegura que el híbrido F1 es heterocigótico para varios lugares, que pueden dar como resultado un vigoroso híbrido y uniformidad. Si un criador desea mejorar una variedad híbrida F1 existente o una variedad innata, necesitará tradicionalmente hacer cruces y pasar a través de varias rondas de selección empírica para lograr este objetivo.

55 Como el conocimiento de la función del gen en relación al crecimiento y el desarrollo de las plantas es todavía limitado, los criadores todavía dependen en gran medida de la selección del fenotipo. Como durante la endogamia muchos genes están en un estado heterocigótico, especialmente durante las generaciones tempranas, las variantes alélicas de los genes responsables del valor fenotípico asignado a algunas plantas individuales se pueden perder fácilmente. Esto se debe al hecho de que durante la reproducción sexual y la endogamia heterocigótica e interacciones de genes específicos se han perdido. Por lo tanto, en la cría de plantas estos mecanismos pueden actuar de forma contraproducente, especialmente en aquellos casos en los que se han identificado genéticamente plantas heterocigóticas con altos valores agronómicos, hortícolas u ornamentales. La reproducción sexual dará como resultado la segregación de alelos deseables.

60 Por lo tanto hay una gran necesidad de tecnología que de manera eficiente permita la preservación de la constitución genética durante la reproducción sexual de plantas con un alto valor agronómico, hortícola u ornamental.

65

Una posibilidad para perpetuar las plantas al tiempo que se preserva la constitución genética es mediante la propagación vegetativa. Esto permite una preservación completa de la composición genética, ya que la multiplicación ocurre exclusivamente a través de mitosis. Las plantas han evolucionado mecanismos naturales de propagación vegetativa, lo que les permite ocupar rápidamente hábitats. Por ejemplo, la propagación vegetativa puede ocurrir a través de la formación de tubérculos, bulbos o rizomas. Una alternativa es utilizar tecnologías de cultivo *in vitro* o *in vivo* para producir esquejes. Una desventaja comercial de las tecnologías de propagación vegetativa, cuando se comparan con la propagación a través de semillas, es el hecho de que es intensivo y por lo tanto costoso. Además, es difícil almacenar plantas por períodos de tiempo más largos, que provocan problemas logísticos y riesgos de infecciones del material de las plantas con patologías como las víricas que son considerablemente mayores comparadas a una situación en la que el material de las plantas se propaga a través de las semillas.

Alternativamente, la propagación vegetativa puede lograrse a través de la formación de semillas asexuales, que se conocen generalmente como apomixis. Este fenómeno ocurre de forma natural en un número de especies y puede ser inducido en especies de plantas de propagación sexual mediante ingeniería genética. En teoría, esto se puede lograr haciendo uso de genes específicos que inducen de forma natural las tres diferentes etapas de la apomixis, es decir apomeiosis, partenogénesis y desarrollo autónomo del endospermo. En la práctica, sin embargo, los genes responsables de las diferentes etapas no han sido identificados todavía y su interacción puede ser bastante complicada.

Por otro lado, la ingeniería artificial de los componentes de apomixis puede ser bastante factible. Por ejemplo, modificando las diferentes etapas durante la meiosis se ha demostrado que la meiosis puede convertirse esencialmente en mitosis. Esto llamado "enfoque MiMe" hace uso de una combinación de mutaciones que suprimen la doble formación de roturas de cadena (*spo11-1*), induce la segregación de cromátidas hermanas durante la meiosis I (*rec8*) y omite la segunda división de la célula meiótica (*osd1*). Combinando este enfoque con la partenogénesis y la formación autónoma del endospermo puede resultar finalmente una apomixis de ingeniería (d'Efurth et al: Convertir la meiosis en mitosis; PLoS Biology 2009; WO/2010/079432). Aunque desde hace mucho el potencial de la tecnología de apomixis para la reproducción de plantas ha sido ampliamente reconocido, la prueba de concepto todavía no está disponible.

Como otra alternativa más, se puede hacer uso de la tecnología de reproducción inversa (WO03/017753). La reproducción inversa se basa en la supresión de la recombinación meiótica a través de la ingeniería genética o interferencia química y la producción subsiguiente de las plantas haploides dobladas (DHs) derivadas de esporas que contienen cromosomas progenitores sin recombinar. Estos DHs difieren con respecto a su composición genética únicamente como una consecuencia del surtido cromosómico progenitor independiente que ocurre durante la meiosis. Por lo tanto, es suficiente hacer uso de un marcador polimórfico, co-dominante por cromosoma para determinar cual de los DHs o líneas derivadas de los mismos debería combinarse mediante un cruzamiento para reconstruir la composición genética de la planta original inicial. Como tal, la aplicación de la tecnología de reproducción inversa permite la preservación genética de cualquier planta fértil seleccionada a través de semillas, incluso si su composición genética es desconocida.

Una desventaja de esta tecnología es el hecho de que esa supresión completa de la recombinación meiótica resulta en ausencia de quiasmata. Esto puede conducir a una segregación de cromosomas inapropiada durante la meiosis I, lo que puede conducir a una aneuploidía de los gametos y por lo tanto a una reducción de la viabilidad y rendimiento de los gametos. Cuando ausencia de quiasmata se produce durante la meiosis I, cada cromosoma tiene un 50% independiente de probabilidad para moverse a cualquiera de uno de los polos. Esto significa que la probabilidad teórica de hacer una espора con un complemento cromosómico total es  $(1/2)^n$ , en donde n representa el número de cromosomas haploides. La frecuencia de gametos equilibrados disminuye por lo tanto con el aumento del número de cromosomas haploides. Aunque muchas especies de cultivos tienen un número de cromosomas relativamente bajo (por ejemplo el pepino tiene 7 cromosomas por genoma haploide; la espinaca tiene solamente 6) también hay especies económicamente importantes con número de cromosomas relativamente alto. Un buen ejemplo es el tomate, uno de los cultivos vegetales económicamente más importantes, que tiene 12 cromosomas por genoma haploide. Esta técnica reduce significativamente la restricción de la eficiencia de la tecnología de la reproducción inversa.

Como otro enfoque alternativo se puede hacer el uso de plantas regeneradas a partir de esporas no reducidas. Esta tecnología se ha denominado Reproducción Casi Inversa (WO2006/094773). Las esporas no reducidas están formadas preferentemente como una consecuencia de la omisión de la segunda división meiótica. Este fenómeno que ocurre de forma natural se conoce como Restitución de la Segunda División (SDR), y puede ocurrir en las plantas durante la reproducción sexual de forma concomitante con eventos meióticos regulares. La tecnología de la Reproducción Casi Inversa explota eventos SDR mediante plantas regeneradas a partir de esporas sin reducir, producidas de forma natural o ingeniería SDR. Se han descubierto genes que, cuando están mutados, dan lugar a SDR, tal como *OSD1* y *TAM1*. Las plantas resultantes (denominadas plantas SDR-0) son en su mayoría homocigotos, y pueden ser utilizadas posteriormente para producir DSHs tradicionales. Los marcadores moleculares

que son polimórficos entre los genomas paterno y materno de la planta inicial se pueden utilizar para identificar aquellas plantas SDR-0 (y DHs derivados de las mismas) que son en gran medida complementarios con respecto a su composición genética.

5 El cruce de estas plantas dará como resultado la reconstrucción completa próxima de la composición genética de la planta inicial original. Sin embargo, debido a la recombinación meiótica durante la formación de los eventos SDR-0 y durante la formación de los DHs derivados de los mismos, la complementariedad no será completa. Los híbridos reconstruidos diferirán genéticamente en cierta medida, tanto unos de otros como de la planta híbrida inicial original. Sin embargo, esta variación se reducirá drásticamente en comparación a una situación en la que los DHs se derivan directamente de un evento meiótico regular. Además, estos DHs son fijados genéticamente, lo que significa que no hay lugar para una selección adicional.

10 La ventaja de integrar un evento SDR en este proceso es que la selección para la complementariedad genética ocurre en un proceso de dos pasos. El primer paso se concentra en las zonas proximales de los cromosomas, es decir, incluyendo los centrómeros. El segundo paso se dirige hacia los extremos distales de los cromosomas, es decir aquellas zonas que se intercambiaron debido a la recombinación. Esta fijación genética retrasada reduce la complejidad y aumenta las posibilidades de encontrar en gran medida genotipos complementarios, especialmente cuando los marcadores moleculares están disponibles para selección.

15 Una ventaja adicional de este enfoque es el hecho de que el SDR pueda ocurrir de forma natural durante la reproducción sexual y que pueda explotarse como tal sin necesidad de más para interferir con los procesos de reproducción sexual. Son conocidos en la técnica métodos para aumentar adicionalmente la prevalencia normal de eventos SDR, por ejemplo a través del tratamiento de estrés con N<sub>2</sub>O (como ha estado descrito anteriormente en lirio: Barba-Gonzalez et al. (2006). *Euphytica* 148: 303-309; y en tulipán: Okazaki et al. (2005) *Euphytica* 143: 101-114).

20 Es un objeto de la presente invención para aumentar aún más la eficiencia de los métodos anteriormente descritos para preservar la constitución genética de una planta heterocigoto con excelentes propiedades agronómicas, hortícolas u ornamentales.

25 La presente invención se aprovecha de la observación de que las mutaciones específicas pueden conducir a un defecto en la separación de microsporas durante la formación del polen. Esto resulta en la formación de grupos de cuatro granos de polen que permanecen juntos unidos físicamente a lo largo de su desarrollo. Aunque los granos de polen individuales en los grupos permanecen juntos en una tétrada en la madurez, ellos son fértiles y cada uno puede realizar la fertilización y producir semillas después de la polinización. La explicación biológica para este denominado fenotipo cuarteto es el fallo para disolver la capa de pectina que normalmente está únicamente presente entre las microsporas, en las primeras etapas del desarrollo del polen.

30 La invención por lo tanto se refiere a un método para la producción de un conjunto de semillas que son genéticamente idénticas a los gametos masculinos de los que surgen, que comprende:

- 35 a) colocar un número de gametos paternos que tienen la forma de tétradas o díadas sobre el estigma de una flor para fertilizar células óvulos maternos para obtener un número de cigotos;
- 40 b) inducir la pérdida de cromosomas maternos de los cigotos para obtener un número de semillas que constituyen un conjunto de semillas en el cual están ausentes las semillas de los cromosomas maternos, en donde el número de gametos paternos es igual a o menor que el número de células óvulos contenidos en el órgano reproductor femenino que lleva el estigma, en concreto dos o cuatro, y

45 en el que la pérdida de material de cromosomas maternos del cigoto se induce mediante la utilización de una línea de inductor haploide como la hembra, en el que la hembra es una planta transgénica que comprende un casete de expresión transgénica heteróloga, comprendiendo el casete de expresión un promotor operativamente unido a un polinucleótido que codifica una alteración de forma recombinada CENH3, CENPC, MIS12, NDC80 o polipéptido NUF2, y que tiene un endógeno inactivado correspondiente CENH3, CENPC, MIS12, NDC80 o gen NUF2.

50 “Genéticamente idéntico” significa que todos los cromosomas de una semilla son los mismos que los cromosomas del gameto correspondiente y la combinación de los cromosomas dentro de una semilla es la misma que la del gameto correspondiente.

55 En la investigación que conduce a la presente invención se encontró además de forma sorprendente que los métodos de combinación disponibles en la técnica anterior con las mutaciones específicas antes indicadas que conducen a un defecto en la separación de microsporas durante la formación del polen llevan a un gran aumento de la eficiencia con la que las plantas progenitoras con una constitución genética complementaria esencialmente puede ser identificada, lo que después del cruce dará lugar a una planta heterocigoto con la misma constitución genética esencialmente como la de su abuelo paterno. Los métodos con los que la invención se puede combinar son por

ejemplo la reproducción inversa y la reproducción casi inversa.

El fenotipo de cuarteto fue por ejemplo descrito en Copenhaver et al. (2000) Plant Physiology 124, 7-15. Mutaciones en diferentes genes no homólogos pueden dar resultado en fenotipos cuarteto similares (por ejemplo *qrt1*, *qrt2* y *qrt3* en *Arabidopsis thaliana*). El gen *QRT3* (en *Arabidopsis*: *At4g20050*) ha sido caracterizado molecularmente, y codifica un miembro de una clase divergente de poligalacturonasas (Rhee et al. (2003) Plant Physiology 133: 1170-1180). Estas mutaciones son útiles para proporcionar la tétrada para utilizar en el método de acuerdo con la invención.

Los granos de polen individuales en los grupos de cuatro granos contienen los productos de la división de una sola célula meiótica. Cuando se usa un cuarteto de polen individual para fertilizar una planta, esto conduce idealmente a la formación de cuatro semillas, cuando la eficiencia de la fertilización es del 100%. El hecho de que los cuatro granos de polen individuales de una tétrada representan los productos de una sola división celular meiótica tiene implicaciones interesantes para la tecnología que es objeto de esta invención.

En el comienzo de la meiosis, el proceso inicial es la replicación del ADN genómico. Posteriormente, durante la profase los cromosomas homólogos se alinean y sinapsan, para formar los bivalentes. Durante esta etapa se forman los cortes de doble cadena (DSBs) que se reparan utilizando las cromátidas no hermanas alineadas. La interacción de cromosomas durante la reparación conduce a la formación de estructuras específicas denominadas uniones de vacaciones dobles, que son resueltas. Esto conduce a la conversión genética o al cruce. Los cruces (CO) de eventos son finalmente visibles en forma de quiasmata, que son estructuralmente necesarios para la segregación homóloga apropiada durante la meiosis I. Con respecto a esta invención debe tenerse en cuenta que independientemente de la distribución de los productos COs de meiosis I son siempre totalmente complementarios unos con respecto a los otros con respecto a su composición alélica. Durante la segunda división meiótica las cromátidas hermanas se segregan en polos opuestos, dando lugar a los productos meióticos finales, es decir cuatro células haploides. Normalmente estos cuatro productos meióticos se desprenden el uno del otro durante su desarrollo adicional, y se mezclarán con los granos de polen derivados de otros eventos meióticos dentro de la misma cavidad antera. Sin embargo, cuando la planta madre exhibe el fenotipo del cuarteto, los cuatro productos de un solo evento meiótico permanecerán físicamente juntos.

El conjunto de cuatro granos de polen en una tétrada puede contener grados variables de complementariedad genética, que es una función del número de cromosomas haploides. Como los productos de meiosis I son totalmente complementarios entre ellos unos con otros, los cuatro granos de polen se mantienen juntos en la tétrada que contiene al menos un 50% de complementariedad. El resultado específico para cada tétrada se determina al azar, y esta casualidad sigue una distribución que viene dada por el llamado Triángulo de Pascal (**Figura 1**).

Por ejemplo, el pepino tiene 7 cromosomas haploides. La primera división meiótica da como resultado dos productos meióticos totalmente complementarios. Durante la segunda división meiótica los cromosomas pueden segregarse al azar en cada uno de los dos productos de la meiosis I, que pueden dar como resultado  $2^n = 2^7 = 128$  productos diferentes. En general, esto permite establecer que en el caso de  $n$  cromosomas, se pueden obtener un total de  $2^n$  diferentes tétradas a partir de un único evento meiótico. El número de eventos totalmente complementarios es siempre 1, es decir el primer número en cada fila (**Figura 1**), mientras que el segundo número de cada fila corresponde al número de cromosomas haploide. Los números siguientes en la misma fila corresponden a números esperados de productos meióticos que tienen 2, 3, 4, 5 y 6 cromosomas no complementarios en una tétrada, respectivamente.

En el ejemplo del pepino, con 128 productos meióticos diferentes que se originan a partir de cualquier evento meiótico dado, estos números son 21, 35, 35, 21 y 7, respectivamente. Como los productos de la meiosis I son totalmente complementarios entre sí, la situación extrema de que ninguno de los cromosomas sería complementario no existe dentro de una tétrada, porque siempre habrá complementariedad a otros cromosomas del otro producto de meiosis I. El número de eventos con un cromosoma no complementario es por lo tanto  $7 * 2$ , con dos cromosomas no complementarios es  $21 * 2$ , etc. Si por ejemplo son tres cromosomas no complementarios. Esto implica que los otros cuatro son complementarios. La probabilidad (porcentaje de probabilidad) de encontrar un cierto grado de complementariedad en los cuatro elementos de una tétrada de polen viene dado por la tabla de la **Figura 2**. La posibilidad de encontrar productos meióticos que tengan 0, 1, 2, o 3 cromosomas no complementarios (y por lo tanto con 7, 6, 5 o 4 cromosomas complementarios, respectivamente) dentro de una tétrada de polen de pepino es por lo tanto 1,6% ( $=(1+1)/128$ ), 10,9% ( $=(7+7)/128$ ), 32,8 ( $=(21+21)/128$ ) y 54,7% ( $=(35+35)/128$ ), respectivamente.

De forma importante, "no complementario" en este contexto en realidad se refiere únicamente a los extremos telómeros de estos cromosomas. Si tenemos por ejemplo una situación con tres cromosomas no complementarios y solo un 40% heterocigotos después de la recombinación, 4 de los 7 cromosomas serán completamente complementarios, mientras que los otros 3 cromosomas todavía son 60% complementarios. En esencia, la constelación tétrada da por lo tanto como resultado una situación en la que los granos de polen son siempre pares en al menos enteramente complementarios para el 50% de los cromosomas, y, como resultado de la recombinación, todavía parcialmente complementario para los cromosomas restantes. Esta invención por lo tanto consigue la casi

completa restitución del genotipo de una planta híbrida, al tiempo que permite entre 0 y 50% de variación comparada con la planta original a partir de la cual las tétradas de polen son derivadas para llevar a cabo la invención.

5 Este método por lo tanto permite la reconstrucción de la constitución genética idéntica o casi idéntica de una planta híbrida. La reconstrucción casi idéntica tiene ventajas definitivas, ya que permite la evaluación del efecto de variación genética adicional en el fenotipo híbrido de interés. Esta variación genética adicional puede o bien probar tener un efecto ventajoso o desventajoso sobre el fenotipo híbrido, y esto permitirá otra mejora genética adicional de un fenotipo híbrido superior. Esta situación para cuatro cromosomas se ilustra gráficamente en la **Figura 3**.

10 Un aspecto importante de la invención reivindicada es la utilización del cuarteto de microsporas para la polinización de la planta madre que elimina el genoma maternal de su progenitor híbrido. Un ejemplo de tal planta ha sido descrito recientemente en Arabidopsis por Maruthachalam y Chan (Plantas haploides producidas mediante la eliminación del genoma centrómero mediado; Nature 464 (2010), 615-619; solicitud de patente EE. UU. 20110083202; WO2011044132), pero este ejemplo no limita de ninguna manera la aplicación de esta invención, ya que la invención también se puede llevar a cabo con otros sistemas de haploides inductores.

15 La eliminación del genoma materno a partir del progenitor híbrido puede por lo tanto lograrse por medio de la sustitución transgénica de la proteína CENH3 histona centrómero-específica endógena por una versión modificada. En la práctica, una versión modificada de la proteína CENH3 se ha expresado en una planta que carece de un endógeno funcional gen *CENH3*.

20 Alternativamente, también los polipéptidos CENPC, MIS12, NDC80 o NUF2 se pueden utilizar para el mismo propósito, cuando se expresa en una planta que tiene el correspondiente endógeno inactivado gen *CENPC*, *MIS12*, *NDC80* o *NUF2*. Así mismo uno o dos alelos de los endógenos *CENPC*, *MIS12*, *NDC80* o *NUF2* secuencia de codificación genómica de la planta están inactivados o noqueados y preferiblemente todos los alelos están inactivados o noqueados. La planta, cuando se cruza con una planta tipo salvaje, genera por ejemplo al menos un 0,1% de progenitores haploides.

25 Preferiblemente el polipéptido es un polipéptido CENH3 alterado de forma recombinada. El polipéptido puede comprender una secuencia de aminoácidos heteróloga de al menos cinco aminoácidos (o alternativamente de al menos diez aminoácidos) vinculado a una proteína que comprende un dominio de pliegue histónico CENH3, en donde la secuencia de aminoácidos es heteróloga hasta el dominio de pliegue histónico CENH3. Así mismo, la citada secuencia de aminoácidos heteróloga está vinculada directamente al dominio de pliegue histónico CENH3 y el polipéptido carece de un dominio de cola CENH3. Alternativamente, la secuencia de aminoácidos heteróloga puede estar vinculada al dominio de pliegue histónico a través de una secuencia de proteína intermedia. Esta secuencia de proteína intermedia puede comprender un dominio de cola CENH3 o un dominio de cola H3 histónico no CENH3 (y la proteína recombinante corresponde entonces a una versión de intercambio de cola de la proteína CENH3).

30 Así mismo, cuando la proteína intermedia comprende un dominio de cola CENH3 histona H3, el dominio de cola CENH3 puede ser heterólogo al dominio de pliegue histónico CENH3. Cuando el polipéptido comprende un dominio de pliegue histónico CENH3 y un dominio de cola CENH3 truncado, el extremo amino del dominio de cola está truncado respecto al dominio de cola endógeno de la planta.

35 Polinizando así plantas complementadas de forma transgénica con polen procedente de una planta paterna tipo salvaje da como resultado un progenitor estéril, debido al hecho de que el progenitor F1 es haploide. De hecho cada progenitor F1 es genéticamente idéntico al grano de polen que se utilizó para fertilización y del cual se originó. Tipo salvaje y cromosomas modificados son aparentemente incompatibles en el montaje de cinetocoro en el cigoto. La duplicación espontánea o inducida de cromosomas conduce a la formación de DHs. *CENH3* es un gen conservado y probablemente copia única en plantas, y por lo tanto este sistema puede ser aplicado también en especies de cultivo. Si la formación de semillas fuese problemática debido al desequilibrio del endosperma, se puede realizar el rescate de embriones.

40 En otra realización, el genoma materno se puede eliminar del progenitor F1 por medio de otros sistemas inductores de haploides.

45 En una realización adicional, la mutación del cuarteto también se puede combinar con la tecnología de la reproducción inversa (WO03/017753; Dirks et al. 2009, Plant Biotech J 7: 837-845), de este modo mejora extraordinariamente la eficiencia de la reproducción inversa. En esta realización, el fenotipo del cuarteto se combina con la supresión de la recombinación del cromosoma meiótico en la planta paterna, por genética, transgénesis o medios químicos. Mientras que la mutación del cuarteto da como resultado la unión física de los cuatro productos de una meiosis única en una tétrada en la madurez del polen, la supresión de la recombinación asegura que estos granos de polen contienen cromosomas progenitores no recombinados. La presente invención por lo tanto asegura que DHs con composición genética complementaria pueden ser fácilmente identificados entre los cuatro DHs derivados del polen de una meiosis única, con un marcador polimórfico co-dominante por cromosoma.

65

Un inconveniente de la reproducción inversa puede ser la existencia de esporas desequilibradas (aneuploides). Sin embargo es posible para identificar morfológicamente tétradas equilibradas (por ejemplo mediante tétradas seleccionadas visualmente en las que los cuatro granos de polen son iguales en tamaño, que es indicativo de una distribución igual de todos los cromosomas, o por medio de por ejemplo citometría de flujo), y DHs regenerados a partir de tétradas serán automáticamente complementarios por pares. Cuando las tétradas equilibradas se usan para polinizar una planta madre que elimina el genoma maternal de su progenitor híbrido, esto dará lugar a cuatro semillas haploides que son complementarias a pares con respecto a su composición genética. El cruce posterior de los DHs complementarios o líneas derivadas de los mismos dan como resultado la reconstrucción de la composición genética del inicio original de la planta. Cuando las cuatro plantas progenitoras de este cruce no son genotificadas antes del cruce, la posibilidad de obtener una reconstrucción de la composición genética de la planta original de inicio cruzando al azar dos de estas cuatro plantas es de un 50%.

En otra realización, el fenotipo del cuarteto se puede combinar con la Reproducción Casi Inversa (WO2006/094773). En esta realización la existencia de restitución de segunda división (SDR) en una planta que exhibe el fenotipo del cuarteto conducirá a la producción de díadas de polen por la planta padre, que comprende dos granos de polen diploides con una composición genética perfectamente complementaria, incluyendo puntos de ruptura de cromosomas idénticos. Polinizando una planta madre que elimina genoma materno de su progenitor híbrido con tales díadas de polen dará como resultado dos plantas diploides, y cruzando estas dos plantas entre sí resultará una reconstitución casi completa de la composición genética del híbrido original.

“Casi completa” se refiere en esta solicitud al hecho de que juntas las dos plantas tienen el mismo material genético que su planta padre (ya que no se pierde ni gana ADN durante una división meiótica), pero la posición genómica relativa de los segmentos cromosómicos puede ser diferente, como resultado de eventos cruzados durante la meiosis. La posición de puntos de ruptura cromosómicos es sin embargo idéntica en las dos plantas, ya que se originaron a partir de un único evento meiótico. La identificación de líneas de complementariedad SDR-0 es por lo tanto enormemente facilitada explotando el fenotipo del cuarteto, y la reconstitución casi completa de la composición genética de cualquier híbrido dado se vuelve mucho más fácil y eficiente.

Debido a la recombinación meiótica durante la formación de eventos SDR-0 la reconstitución no será 100% completa, ya que los híbridos reconstruidos diferirán genéticamente hasta cierto punto, tanto entre sí como de la planta híbrida (padre) original inicial, especialmente en los telómeros como resultado de los COs. Por lo tanto esta característica proporciona la ventaja adicional de que la variación genética adicional se está creando en una planta híbrida preseleccionada superior, proporcionando alternativas y disposiciones genómicas ligeramente diferentes mientras se mantiene la mayor parte de la constitución híbrida original. Esto puede llevar a una mayor mejora de un fenotipo híbrido.

Es además objeto de esta invención proporcionar un método eficiente para obtener un conjunto de semillas las cuales semillas son genéticamente idénticas a los gametos masculinos de los cuales surgen, y cuyo conjunto de semillas está compuesto de pares de semillas complementarios esencialmente genéticamente que, cuando las plantas crezcan a partir de ellas sean cruzadas, dar lugar a esencialmente la misma planta híbrida. Esta planta híbrida es genéticamente esencialmente idéntica a la planta que produjeron los gametos masculinos de la que el mencionado conjunto de semillas surgieron.

“Esencialmente” tal como se usa en el presente documento se pretende que signifique que la complementariedad genética de los pares de semillas necesitan que sea del 100%, como también la casi completa reconstitución de una planta híbrida puede ser deseable como se ha explicado anteriormente (porque puede ofrecer la oportunidad de mejorar aún más un fenotipo híbrido). Reconstituida casi completamente la planta híbrida solo es esencialmente idéntica a la planta híbrida original y a otras plantas híbridas reconstituidas casi completamente obtenibles por la invención, porque aunque tiene el mismo o gran parte del material genómico como la planta híbrida original, puede haber alternativa o ligeramente diferentes disposiciones genómicas presentes en sus genomas, como resultado de diferentes eventos de cruce, o algunas zonas genómicas pueden ser homocigotos como resultado de la recombinación. Cuando tiene lugar el cruce meiótico, “esencialmente” se relaciona así con el grado de cruce que ocurrió durante la formación de los granos de polen utilizados para la polinización de la planta madre haploide inductora.

En otro contexto, por ejemplo en la ausencia de la recombinación meiótica, “esencialmente” también puede referirse a la selección de pares de semillas (de entre el conjunto de semillas obtenido mediante esta invención) que no son un 100% genéticamente complementarios entre sí. En esta realización, que también está destinada a entrar dentro del alcance de la presente invención, por ejemplo se puede seleccionar un par de semillas (a partir de dicho conjunto de semillas) que son totalmente complementarias entre sí para  $n-1$  cromosomas (siendo  $n$  el número de cromosomas haploides de las especies), e idéntico para los cromosomas restantes. La planta híbrida resultante del cruce de las plantas que crece a partir de este par de semillas será genéticamente idéntico a la planta híbrida original para todos menos un cromosoma, y diferente (llamado homocigoto) para el resto de cromosomas. En general la planta es por lo tanto “esencialmente” idéntica genéticamente. Tales plantas pueden por ejemplo obtenerse cuando se lleva a cabo la presente invención en una realización preferente, con supresión de la

recombinación meiótica (Reproducción Inversa). Debe entenderse que el mismo concepto se puede hacer para n-2 cromosomas, n-3 cromosomas, etcétera. Este concepto permite, por ejemplo, el análisis genómico y fenotípico de una planta mientras se concentra únicamente sobre el subconjunto de sus cromosomas, y aunque se dejen el resto del genoma híbrido sin cambios.

5 La invención se refiere por lo tanto a un método para la producción de un conjunto de semillas que son genéticamente idénticas que los gametos masculinos de los que surgen, que comprende:

- 10 a) colocar un número de gametos paternos que tienen la forma de tétradas o díadas sobre el estigma de una flor para fertilizar óvulos maternos para obtener un número de cigotos;
- b) inducir la pérdida de cromosomas maternos de los cigotos para obtener una cantidad de semillas que constituyan un conjunto de semillas, en el que las semillas de los cromosomas maternos están ausentes, donde el número de gametos paternos es igual o menor que el número de óvulos contenidos en el órgano reproductor femenino que porta el estigma, en particular dos o cuatro, y

15 donde la pérdida de cromosomas maternos del cigoto se induce mediante una línea inductora haploide como la hembra, en la que la hembra es una planta transgénica que comprende un casete de expresión transgénica heteróloga, comprendiendo el casete de expresión un promotor vinculado de forma operativa a un polinucleótido que codifica un polipéptido de forma recombinada alterado *CENH3*, *CENPC*, *MIS12*, *NDC80* o *NUF2*, y que tiene un gen endógeno inactivado correspondiente *CENH3*, *CENPC*, *MIS12*, *NDC80* o *NUF2*.

20 En este método la competición entre los tubos de polen para la fertilización de óvulos se debería preferiblemente minimizar o prevenir, para evitar que parte de los granos de polen comprendidos en una tétrada o díada fallen para fertilizar un óvulo. Por lo tanto es preferible una polinización limitada, de manera que hayan al menos tantos óvulos presentes en el órgano reproductivo femenino de la flor polinizada como granos de polen depositados en su estigma. Cada grano de polen debería ser capaz entonces de fertilizar un óvulo.

25 Por lo tanto, el número de gametos paternos es igual o menor que el número de células ovulares contenidas en el órgano reproductivo femenino que porta el estigma.

30 El número promedio de células ovulares u óvulos por flor, que es el límite superior preferido para el número de gametos paternos que pueden ser usados con éxito en este método, es conocido para el experto que está familiarizado con un cultivo específico. En general es ligeramente superior que el número promedio de semillas presente en una fruta típica de este cultivo. Para el tomate, por ejemplo, el número promedio de células ovulares por flor es alrededor de 100, para las especies Brassica alrededor de 35, para las Arabidopsis alrededor de 40-50, para la sandía alrededor de 200, para la uva alrededor de 4, para el pepino alrededor de 250-300, para el pimiento dulce alrededor de 100, y para el melón alrededor de 500. Burd et al., Am. J. Bot 96(6), 1159-1167 (2009) describe un estudio sobre el número de óvulos por flor en 187 especies de angiospermas.

35 Un número limitado de gametos paternos de forma aceptable comprende cualquier número que permita utilizar el método de la invención de una manera eficiente. Esto significa que se debe evitar demasiada variación genética en los gametos masculinos, es decir el número de eventos meióticos que dieron lugar a los gametos masculinos en un solo estigma debería mantenerse bajo si esos eventos meióticos generan cada uno un alto grado de reordenamientos genéticos en el genoma de los gametos individuales que constituyen la díada o tétrada (a través de la recombinación cromosómica).

40 En una realización preferente el número limitado de gametos paternos es de dos o cuatro (que corresponden al número de gametos comprendidos en una sola díada o tétrada de polen, respectivamente, y por tanto derivada de una única meiosis en ausencia o presencia de una segunda división meiótica, respectivamente). Esta estrategia llevará a la formación de cuatro semillas (en el caso de que se utilizase una tétrada para la polinización) o dos semillas (en el caso de que se utilizase una díada para la polinización), que son genéticamente idénticas a los granos de polen que se originaron a partir de una única división meiótica. Cuando los gametos tienen la forma de díadas, el número limitado de gametos paternos que permite utilizar el método de la invención de una manera eficiente es mucho mayor de dos, porque la cantidad de variación genética se reduce enormemente, ya que los dos gametos comprendidos dentro de la díada son genéticamente totalmente complementarios entre sí. Especialmente cuando se usan gametos que tienen la forma de díadas es por lo tanto eficiente utilizar cualquier número de gametos que sea menor que el número promedio de células ovulares u óvulos por flor.

45 La forma de la tétrada o díada de los gametos masculinos es el resultado de la interferencia con la separación de la tétrada de microspora en la planta padre. En una realización, la interferencia con la separación de la tétrada de microspora comprende interferencias con uno o más genes objetivo involucrados en la descomposición de la capa de pectina entre las microsporas que resultan de una sola división meiótica. El uno o más genes objetivo pueden ser seleccionados a partir del grupo que consta de *QRT1*, *QRT2*, *QRT3*, o sus homólogos funcionales. Mutaciones adecuadas son la introducción de codones de paro o cambios de marco en los genes objetivo, sustituciones de aminoácidos que interrumpen la estructura y/o la función proteínica, e inserciones de elementos genéticos tales

- 5 como T-DNA en la secuencia de codificación, promotor u otra secuencia reguladora del gen. En Arabidopsis, la mutación *qrt1-4* resulta a partir de la inserción de un T-DNA en un exón del gen *QRT1*, el fenotipo mutante de *cuarteto* en el *qrt1-5* mutante es causado por una inserción T-DNA en el promotor de gen *QRT1*, y la mutación *qrt1-6* es causada por una inserción T-DNA en un intrón del gen *QRT1*. El *qrt2-1* mutante en Arabidopsis comprende una sustitución de aminoácido de Valina a Alanina sobre la posición 372 (una mutación de GTC a GCG) en la proteína QRT2, que es la causa subyacente del fenotipo *cuarteto* en esta línea mutante.
- 10 En otra realización, la interferencia con la separación de la tétrada de microsporas comprende la interferencia con la descomposición de la capa de pectina entre las microsporas que resultan de la única división meiótica por medios químicos. Los productos del gen QRT son enzimas que juegan un papel en la descomposición de la capa del polisacárido péctico (pectina) que está presente entre los gametos masculinos individuales (microsporas) que surgen de la división meiótica de una célula madre de polen. Si esta capa de pectina no se degrada, los cuatro gametos masculinos (microsporas) permanecen físicamente unidos entre sí en una forma tétrada.
- 15 Interferir con uno o más genes objetivo involucrados en la separación de la tétrada de microsporas se puede conseguir mediante un número de enfoques diferentes. La interferencia con un gen puede consistir en prevenir la transcripción del mismo. En una realización la transcripción de un gen objetivo puede prevenirse por medio de oligo nucleótidos RNA, oligo nucleótidos DNA o moléculas RNAi dirigidas contra el promotor del gen objetivo.
- 20 En otra realización la transcripción es prevenible por medio de la expresión de una actuación negativa factor de transcripción que actúa sobre el promotor del gen objetivo. Además, la interferencia con el gen objetivo también puede consistir en desestabilizar el gen objetivo mRNA o transcrito. Esto se puede lograr por medio de moléculas de ácido nucleico que son complementarias al gen objetivo mRNA o transcrito, seleccionado del grupo que consta de antisense RNA, moléculas RNAi, gen de virus inducido por moléculas de silenciamiento (VIGS), moléculas de co-supresor, oligo nucleótidos RNA u oligo nucleótidos DNA.
- 25 La interferencia con el gen objetivo también puede consistir en inhibir el producto expresión del gen objetivo, por medio de una o más estructuras de ácidos nucleicos negativos dominantes, o por medio de uno o más compuestos químicos.
- 30 Todavía en otra realización, la interferencia con el gen objetivo consiste en la introducción de una o más mutaciones en el gen objetivo, que conduce a la perturbación de su función biológica. La una o más mutaciones se pueden introducir ya sea al azar, por medio de uno o más compuestos químicos (tales como metano-sulfonato de etilo, nitroso-metil-urea, hidroxilamina, proflavina, N-metil-N-nitroso-guanidina, N-etil-N-nitroso-urea, N-metil-N-nitroso-guanidina, dietil sulfato, etilenimina, ázida sódica, formalina, uretano, fenol, óxido de etileno) y/o medios físicos (tales como irradiación UV, exposición a neutrones rápidos, rayos X, irradiación gamma) y/o inserción de elementos genéticos (tales como transposones, T-DNA, elementos retrovirales) o específicamente, por medio de recombinación homóloga u oligo-nucleótido inducción basada en la mutación.
- 35 Los medios químicos para interferir con separación de tétradas microsporas comprenden la utilización de inhibidores químicos que reducen la actividad (o la estabilidad) del gen QRT productos, o la utilización de químicos que, directa o indirectamente, reducen el nivel de expresión del gen QRT productos, que da como resultado la persistencia de la capa de pectina entre las cuatro microsporas que resultan a partir de un único evento meiótico. La actividad enzimática de las proteínas QRT puede ser inhibida por medio de inhibidores químicos, tales como el tratamiento de un brote floral durante la etapa de separación de micro esporas (o una etapa anterior) con la inhibición química que conduce a la persistencia de la capa de pectina entre las microsporas son derivadas de una sola meiosis, y por lo tanto a la persistencia tétradas de microsporas durante etapas de desarrollo posteriores y en antesis.
- 40 En una realización preferente, la planta padre, que produce los citados gametos masculinos (en forma de una tétrada o una díada) muestra, además del cuarteto fenotipo, la supresión de la recombinación cromosómica, que anula el cruce de cromosomas y conduce a la transmisión intacta de todos los cromosomas. En esta realización la posibilidad de identificar dos genomas complementarios genéticamente entre los granos de polen individuales de una tétrada es del 50%. Cuando la planta padre que produjo los citados gametos masculinos exhibe la supresión de la recombinación cromosómica, esta supresión de la recombinación cromosómica se logra interfiriendo con uno o
- 45 más genes objetivo implicados en la recombinación.
- 50 En una realización el gen objetivo está implicado en roturas de doble cadena, y puede seleccionarse a partir del grupo que consta de *SPO11*, *MER1*, *MER2*, *MRE2*, *MEI4*, *REC102*, *REC104*, *REC114*, *MEK17/MRE4*, *RED1*, *HOP1*, *RAD50*, *MRE11*, *XRS2*, o sus homólogos funcionales.
- 55 En otra realización el gen objetivo está involucrado en el emparejamiento cromosómico y/o intercambio de cadenas y puede seleccionarse a partir del grupo que consta de *RHD54/TID1*, *DMC1*, *SAE3*, *RED1*, *HOP1*, *HOP2*, *REC8*, *MER1*, *MER2*, *ZIP1*, *ZIP2*, *MEI5*, *RAD51*, *RAD52*, *RAD54*, *RAD55*, *RAD57*, *RPA1*, *SMC3*, *SCC1*, *MSH2*, *MSH3*, *MSH6*, *PMS1*, *SOLODANCERS*, *HIM6*, *CHK2*, o sus homólogos funcionales.
- 60
- 65

En aún otra realización el gen objetivo está involucrado en el proceso de recombinación meiótica, y puede ser seleccionado a partir del grupo que consta de *SGS1*, *MSH4*, *Mush4*, *ZIP1* y *ZIP2*, o sus homólogos funcionales.

5 En otra realización el gen objetivo es seleccionado a partir del grupo que consta de *PRD1*, *PRD2*, *PRD3*, *PSH1*, *NBS1*, *COM1*, *MND1*, *MER3/RCK*, *ZIP3*, *ZIP4*, *PTD*, *SHOC1*, *ZYP1*, *MLH1*, *MLH3*, o sus homólogos funcionales.

10 La interferencia con uno o más genes objetivo involucrados en la recombinación se puede lograr mediante un número de diferentes enfoques. La interferencia con un gen objetivo puede consistir en prevenir la transcripción de los mismos.

15 En una realización la transcripción de un gen objetivo se puede prevenir por medio de oligo nucleótidos RNA, oligo nucleótidos DNA o moléculas RNAi dirigidas contra el promotor del gen objetivo. En otra realización la transcripción se previene mediante la expresión de un factor de transcripción que actúa negativamente actuando sobre el promotor del gen objetivo. Además, la interferencia con el gen objetivo también puede consistir en desestabilizar el gen objetivo mRNA o transcrito. Esto se puede lograr por medio de moléculas de ácido nucleico que son complementarias al gen objetivo mRNA o transcrito, seleccionado a partir del grupo que consta de antisentido RNA, moléculas RNAi, Virus-Inducido de moléculas Silenciadas Génicas (VIGS), moléculas co-supresoras, oligo nucleótidos RNA u oligo nucleótidos ADN. Interferir con el gen objetivo también puede consistir en inhibir el producto de expresión del gen objetivo, por medio de una o más estructuras de ácido nucleico negativo dominante, o por medio de uno o más compuestos químicos.

20 Todavía en otra realización, la interferencia con el gen objetivo consiste en la introducción de una o más mutaciones en el gen objetivo, lo que conduce a la perturbación de su función biológica. La una o más mutaciones pueden ser introducidas o bien al azar, por medio de uno o más compuestos químicos (tales como metano-sulfonato de etilo, nitroso-metil-urea, hidroxilamina, proflavina, N-metil-N-nitroso-guanidina, N-etil-N-nitroso-urea, N-metil-N-nitro-nitroso-guanidina, sulfato dietil, etileno imina, azida sódica, formalina, uretano, fenol, óxido de etileno) y/o medios físicos (tales como irradiación UV, exposición a neutrones rápidos, rayos X, irradiación gamma) y/o inserción de elementos genéticos (tales como transposones, T-DNA, elementos retrovirales), o específicamente, por medios de recombinación homóloga u oligo nucleótido, inducción basada en la mutación.

25 En otra realización preferente, la planta padre que produjo los citados gametos masculinos muestra, además del fenotipo del cuarteto, la restitución de la segunda división (SDR) durante la meiosis. En esta realización, la planta padre produce gametos masculinos que son 2n y que tienen la forma de díadas, porque no tiene lugar la segunda división meiótica. Los dos gametos masculinos contenidos dentro de una díada son totalmente complementarios genéticamente, y la posibilidad de identificar dos genomas genéticamente complementarios entre los dos granos de polen individuales de una díada es por lo tanto del 100 por ciento.

30 Cuando la planta padre, que produjo los citados gametos masculinos, exhibe la restitución de la segunda división durante la meiosis, esta restitución de la segunda división puede ocurrir de forma espontánea, sin interferencia con el organismo inicial. En otra realización, la restitución de la segunda división es inducida por medio de modificación genética. Esta modificación genética puede ser transitoria, o puede lograrse mediante la incorporación estable en el genoma de un elemento genético (tal como un transgén, mutación, transposón, elemento retroviral, T-DNA) aumentando el número de eventos de restitución de segundas divisiones en el organismo.

35 Aún en otra realización la restitución de la segunda división se logra sometiendo a la planta padre a un estrés ambiental, tal como un estrés de temperatura, NO<sub>2</sub>, óxido de nitrógeno (N<sub>2</sub>O), o combinaciones de los mismos (Zhang et al. (2002) Journal of Horticultural Science & Biotechnology 78: 84-88; WO 2006/094773; Barba-Gonzalez et al. (2006), Euphytica 148: 303-309; Okazaki et al. (2005), Euphytica 143: 101-114).

40 La pérdida de cromosomas del cigoto, para obtener un conjunto de semillas que contienen un número limitado de semillas en las que los cromosomas maternos están ausentes, se puede conseguir de diferentes maneras. En una realización, una línea inductora haploide se puede utilizar como hembra. Una línea inductora haploide es una planta en la que los cromosomas de uno de los progenitores son eliminados del genoma del cigoto formado después de la fertilización de una célula ovular por polen. La hembra puede ser por ejemplo una planta de una especie diferente, como ha sido descrito por, por ejemplo, Bains & Howard 1950, Nature 166: 795. En otra realización la pérdida de cromosomas maternos del cigoto resulta a partir de una planta transgénica como el organismo madre, que la planta transgénica comprende un casete de expresión transgén heterólogo, comprendiendo el casete de expresión un promotor vinculado de forma operable a un polinucleótido que codifica un CENH3 alterado de forma recombinada, polipéptido CENPC, MIS12, NDC80 o NUF2, y que tienen el correspondiente endógeno inactivado *CENH3*, *CENPC*, *MIS12*, *NDC80* o gen *NUF2* como se describe en WO2011/044132.

45 También se describe en el presente documento un conjunto de semillas que contiene un número limitado de semillas en el que están ausentes los cromosomas maternos, cuyo conjunto se compone de pares de esencialmente semillas complementarias genéticamente que cuando se cruzan dan como resultado esencialmente el mismo híbrido, y que el conjunto de semillas es obtenible mediante el método de la invención. Las semillas de este conjunto de semillas

5 todas tienen el mismo padre, porque se originaron a partir de la polinización de la planta madre con un número limitado de gameto paternos que tienen la forma de tétradas o díadas, cuyos gametos paternos habían sido recolectados de una única planta padre. Debido a esto, y debido a la eliminación de los cromosomas maternos de los cigotos, desde un punto de vista genético las semillas del citado conjunto de semillas un abuelo masculino y una abuela femenina, nominalmente los padres de su padre. Esto está esquemáticamente representado en la **Figura 4**.

10 También se describe en el presente documento un conjunto de plantas padre para la producción de una planta cuya constitución genética es esencialmente idéntica a la constitución genética de su abuelo masculino, que comprende el cultivo de plantas a partir de semillas del conjunto de semillas de la invención, después o antes de la duplicación del número de cromosomas de las semillas, e identificando dos plantas genéticamente complementarias como las plantas progenitoras. Tales plantas genéticamente complementarias se pueden identificar por medio de marcadores moleculares (genéticos) para los que la planta padre (que produjo los gametos masculinos) era heterocigoto, y para el cual los dos abuelos paternos tenían alelos diferentes. Estos marcadores se pueden puntuar con un número diferente de enfoques, tales como secuencia directa DNA de zonas genómicas específicas, AFLP, RFLP, SSR, RAPD, KASPar (KBioscience), Invader™ o Invader Plus™ (ver por ejemplo De Vienne ed. (2003) Molecular Markers in Plant Genetics and Biotechnology. Science publishers INC. Enfield, NH USA. ISBN 1-57808-239-0).

15 Además, se describe un método para el cribado del conjunto de semillas o de las plantas cultivadas de las mismas para su constitución genética, para identificar una planta de la que su constitución genética es esencialmente idéntica a la constitución genética de su abuelo paterno, y para identificar otra planta de la que su constitución genética es esencialmente idéntica a la constitución genética de su abuela paterna.

20 Una planta de la que la constitución genética es esencialmente idéntica a la constitución genética de su abuelo paterno puede después cruzarse con otra planta de la que la constitución genética es esencialmente idéntica a la constitución genética de su abuela paterna, con el fin de obtener plantas descendientes de las que la constitución genética es esencialmente idéntica a la constitución genética de su propio abuelo. Por "su propio abuelo" se entiende la planta (híbrida), que produjo las tétradas de polen o díadas de polen que fueron utilizadas para la polinización de la línea inductiva haploide. Este pedigrí se ilustra y clarifica en la **Figura 4**.

25 El citado conjunto de semillas, después o antes de duplicar el número de cromosomas de las semillas, puede ser utilizado para la identificación de dos plantas genéticamente complementarias como los padres para un cruce.

30 Las especies de cultivos sobre las que se pueden practicar en esta invención incluyen por ejemplo tabaco, álamo, azúcar, remolacha, colza oleaginosa, soja, tomate, pepino, pepinillo, maíz, espinaca, pimienta, petunia, patata, berenjena, melón, sandía, zanahoria, rábano, especies vegetales *Brassica* (repollo, coliflor, brócoli, colinabo, coles de Bruselas), alubia, guisante, cebolla, fresa, remolacha, espárragos y vid.

35 La invención se ilustra adicionalmente en los ejemplos que siguen y que no están destinados a limitar la invención de ninguna manera. En los ejemplos, se hace referencia a las siguientes figuras:

40 **Figura 1:** el llamado triángulo de Pascal, que representa el resultado específico de los cromosomas complementarios para cada tétrada de polen, en función del número de cromosomas de las especies. De arriba abajo aumenta el número de cromosomas haploides, y la suma de los números en cada fila siempre es igual a  $2^n$ , siendo el número total de diferentes productos meióticos que pueden surgir a partir de una meiosis en la que están involucrados  $n$  cromosomas. Si tomamos la séptima fila como un ejemplo (por ejemplo el pepino, con 7 cromosomas haploides,  $n = 7$ ), se puede ver que el número de eventos totalmente complementarios es siempre 1, es decir el primer número de la fila, mientras que el segundo número de la fila corresponde al número de cromosomas haploides. Los números siguientes en la misma fila corresponden al número esperado de productos meióticos que tienen 2, 3, 4, 5 y 6 cromosomas no complementarios en una tétrada, respectivamente. El número total de eventos con un cromosoma no complementario es  $7 * 2$ , con dos cromosomas no complementarios  $21 * 2$ , etc. Si por ejemplo 3 cromosomas son no complementarios, esto implica que los otros cuatro cromosomas son complementarios. De forma importante, "no complementarios" en este contexto en realidad solo se refiere a los extremos teloméricos de estos cromosomas. Si por ejemplo tenemos una situación con 3 cromosomas no complementarios y solamente un 40% heterocigotos después de la recombinación, 4 de los 7 cromosomas serán totalmente complementarios, mientras los otros 3 cromosomas aún son 60% complementarios.

45 **Figura 2:** esta tabla muestra la probabilidad (porcentaje de posibilidad) de encontrar un cierto grado de complementariedad en los cuatro elementos de una tétrada de polen, como una función del número de cromosomas haploides. Por ejemplo el pepino (con  $n = 7$ ) la posibilidad de encontrar productos meióticos que tienen 0, 1, 2 o 3 cromosomas no complementarios (y por lo tanto con 7, 6, 5, o 4 cromosomas complementarios, respectivamente) dentro de una tétrada de polen de pepino es por lo tanto 1,6% ( $=(1+1/128)$ ), 10,9% ( $=(7+7/128)$ ), 32,8% ( $=(21+21/128)$ ) y 54,7% ( $=(35+35/128)$ ), respectivamente.

50 La probabilidad (porcentaje de posibilidad) de encontrar un cierto grado de complementariedad en los cuatro elementos del cuarteto está dado por la tabla de la figura 2. La posibilidad de encontrar productos meióticos que tengan 0, 1, 2 o 3 cromosomas no complementarios (y por lo tanto con 7, 6, 5 o 4 cromosomas

complementarios, respectivamente) dentro de una tétrada de polen de pepino es por lo tanto 1,6%  $(=(1+1)/128)$ , 10,9%  $(=(7+7)/128)$ , 32,8%  $(=(21+21)/128)$  y 54,7%  $(=(35+35)/128)$ , respectivamente.

**Figura 3:** representación gráfica de un evento meiótico con 4 cromosomas haploides ( $n = 4$ ). Uno de los padres de la planta híbrida contribuyó con cromosomas azules, mientras que el otro padre contribuyó con cromosomas rojos al híbrido. En un primer paso el genoma se duplica de  $2n$  a  $4n$ , y posteriormente el cruce puede tener lugar entre las zonas homólogas de la hermana cromátida, como se ilustra aquí con un único evento de cruce por cromosoma. Durante la primera división meiótica se producen dos células hijas diploides, que son genéticamente completamente complementarias (es decir si ambos genomas se toman en conjunto la composición genómica  $4n$  se obtiene antes a partir de la división). En esta figura solamente se muestra un posible ejemplo del resultado de meiosis I. Durante la segunda división meiótica los gametos (en este contexto microsporas o granos de polen) se producen, y los cromosomas pueden segregarse de forma aleatoria cualquier célula hija. Esto lleva a  $2^{n-1}$  pares diferentes de células hija (gametos). Para la célula diploide de la izquierda de la figura se muestra un posible par de gametos, mientras que para la célula diploide de la derecha se muestran el total de los 8 posibles pares de gametos  $(= 2^3 = 2^{n-1})$ .

Cuando posteriormente se duplican las plantas haploides son regeneradas a partir de los diferentes gametos (por ejemplo mediante el método de la invención, generando plantas haploide y duplicando su genoma), estas plantas se pueden cruzar entre sí. Los números justo debajo de los diferentes conjuntos de cromosomas corresponden al número de cromosomas que son complementarios al conjunto de cromosomas sobre el extremo izquierdo de la figura. Si por ejemplo la planta que contiene los cuatro cromosomas que están representados en el extremo izquierdo (es decir los cuatro cromosomas enteramente azules) pudiera cruzarse con una planta que contenga los cuatro cromosomas enteramente rojos desde el primero de los ocho pares de cromosomas en la derecha, entonces el total de los 4 cromosomas serían complementarios. Este cruce daría lugar a la reconstitución exacta de la planta híbrida original que había producido los gametos. Similarmente, cruzar la misma planta con los cuatro cromosomas azules con plantas que contiene los otros posibles conjuntos de cromosomas mostrados en la derecha (más precisamente: el conjunto de cromosomas izquierdo de cada uno de los ocho pares) dará como resultado ya sea la reconstitución completa de la planta híbrida original (cuando el total de los 4 cromosomas son enteramente complementarios), o la casi completa restitución de la planta híbrida original (cuando uno o dos de los cuatro cromosomas no son enteramente complementarios). La situación en la que más de dos cromosomas no fuesen complementarios no existe, porque los gametos se originaron desde el mismo evento meiótico. Además, está claro a partir del dibujo que una gran parte de los cromosomas "no complementarios" es de hecho complementaria, y este cruce conducirá a una gran progenie heterocigoto; las únicas partes de cromosomas no complementarios se deben al cruce de eventos en los cromosomas telómeros, cuyos cruces de zonas se convertirían homocigotos en el resultado progenie. Cuando los números bajo los pares de cromosomas se suman para agrupar los eventos que tienen 0, 1 o 2 cromosomas no complementarios en comparación con el conjunto de cromosomas del extremo izquierdo, esto conduce a la distribución  $2 - 8 - 6$  para  $n = 4$ , que también se puede encontrar en la cuarta fila del triángulo de la figura 1 (donde se muestran como  $1 - 4 - 6 - 4 - 1$ ).

En el extremo derecho de esta figura se representa un posible segundo par de gametos, que se puede derivar de la célula diploide más a la izquierda durante la meiosis II. Los números listados en la parte inferior de la figura representan el número de cromosomas complementario cuando uno de los gametos de este par se combina con cualquiera de los 16 gametos derivados de la célula diploide más a la derecha. De nuevo se puede observar el mismo resultado: de los 16 gametos 2 son totalmente complementarios (es decir 4 cromosomas complementarios), 8 tienen un cromosoma no complementario y 6 tienen dos cromosomas no complementarios. Manteniendo juntos los cuatro productos derivados de un solo evento meiótico, y proporcionando un medio para obtener plantas progenie que son genéticamente idénticas a estos cuatro productos meióticos, la presente invención maximiza la posibilidad de identificar pares de plantas progenie que al cruzarse pueden dar lugar a la planta híbrida original, o a un híbrido que es genéticamente esencialmente el mismo que el híbrido original.

**Figura 4:** descripción simplificada de un pedigrí de acuerdo con la presente invención, suponiendo que no tiene lugar la recombinación. Una planta híbrida, que resulta del cruce de dos (homocigotos) líneas progenitoras (con genotipos AA y BB, respectivamente) produce granos de polen en forma de tétradas. Cuando se utiliza una sola tétrada para polinizar una planta madre inductora haploide (con genotipo aleatorio) el progenie que resulta de este cruce constará de un conjunto de cuatro semillas haploides. Genéticamente estas semillas son A, A, B y B (en ausencia de recombinación), y no hay contribución genética de la planta madre. Por lo tanto estas cuatro semillas haploides solamente tienen dos abuelos, nominalmente las líneas progenitoras de la planta padre híbrida que produjo la tétrada de polen. Después de que el genoma doblara cuatro plantas haploides duplicadas se puede obtener, que, en la ausencia de recombinación, siempre será pareja complementaria totalmente genéticamente. Cruzar las dos plantas complementarias genéticamente a partir de cualquiera de los pares conduce a la reconstitución de la planta híbrida original. La situación es más compleja cuando ocurre la recombinación, como se ilustra en las figuras 1, 2 y 3. Cuando ocurre la recombinación la posibilidad de encontrar un par de plantas completamente complementarias entre la progenie de una tétrada de polen disminuye en función del número de cromosomas haploides, pero en la ausencia de recombinación el número de cromosomas no tiene efecto en el resultado.

## EJEMPLOS

**EJEMPLO 1***Identificación de las plantas de Brassica que desprenden cuartetos de polen*

Un recurso esencial para llevar a cabo esta invención es una planta de especies de interés que desprende sus granos de polen en forma de una tétrada, por lo que los cuatro productos de una división meiótica permanecen físicamente unidos. Tal planta se puede obtener ya sea en una pantalla mutante o a través de un enfoque transgénico. Este ejemplo ilustra la primera opción, mientras que la segunda opción se explicará en ejemplos posteriores.

Con el fin de identificar una planta que exhibiese el fenotipo cuarteto de polen, *Brassica oleracea* EMS, la población mutante se proyectó de forma fenotípica, para detectar la existencia de los granos de polen en el fenotipo cuarteto (es decir tétradas de polen) en las anteras de plantas individuales. En un enfoque general, se agrupó polen de múltiples plantas juntos y diluidos en una solución de manera que los granos de polen individualizados pudieran discernirse claramente. Estas agrupaciones de polen después fueron tamizadas visualmente a través de binoculares, aunque alternativamente esta visualización también es posible mediante citometría de flujo o por filtración (con un filtro que tiene un tamaño de poro mayor que el diámetro de un grano individual de polen, pero más pequeño que el diámetro de una tétrada de polen). Una vez detectado el fenotipo del cuarteto deseado en una agrupación de polen, todas las plantas que contribuyeron con polen a esta agrupación fueron tamizadas individualmente, hasta que fue identificada positivamente una planta del cuarteto mutante. En la próxima generación fue confirmada la transmisibilidad del fenotipo del cuarteto.

**EJEMPLO 2***Crear una planta Brassica que elimine el genoma maternal de su progenie F1*

Una publicación de Maruthachalam & Chan (Nature 464, 615-619; 2010) enseña que la transformación de plantas mutantes de *Arabidopsis thaliana* con una estructura de expresión para una proteína de intercambio de cola GFP-CENH3 da como resultado una división mitótica aberrante en el cigoto, seguida de fertilización. Durante esta mitosis aberrante los cromosomas maternos son eliminados selectivamente del cigoto divisor. Como la proteína CENH3 es universal en eucariotas y su función está muy bien conservada esta estrategia de *Arabidopsis* es ampliamente aplicable en otras especies de plantas.

Con el fin de crear una planta *Brassica oleracea* en cuya progenie F1 el genoma materno se elimina selectivamente, se creó una planta *Brassica* que carece de una versión funcional de la proteína que es ortóloga para CENH3 de *Arabidopsis*. Esto se consiguió por medio de un enfoque RNAi. Esta planta fue transformada posteriormente genéticamente por medio de la infección de *Agrobacterium*, con la GFP-CENH3 estructura de intercambio de cola descrita por Maruthachalam & Chan (Nature 464, 615-619; 2010). Debido a la letalidad de la planta mutante *cenh3* homocigoto (como es el caso en *Arabidopsis*), es necesario para transformar una planta silenciada heterocigota con esta estructura. Las plantas transformantes fueron seleccionadas posteriormente en base al marcador de selección de estructura, y la presencia y expresión correcta de la proteína de fusión de intercambio de cola GFP-CENH3 podría detectarse con microscopía fluorescente durante la división mitótica.

**EJEMPLO 3***Combinar el fenotipo del cuarteto con la eliminación del genoma materno en Arabidopsis*

Este ejemplo ilustra como el genotipo de una planta híbrida puede ser reconstituido de una forma eficiente. Una planta transgénica *Arabidopsis thaliana* se creó de la accesión Ler, que alberga una sola copia (en estado homocigótico) de una estructura RNAi que tiene como objetivo el gen (*Atg55590*) QRT1, impulsado por el promotor constitutivo *CaMV 35S*. Alternativamente se pueden utilizar otras técnicas tales como micro RNAs (amiRNAs) artificiales para este propósito. Esta planta se cruzó luego con una planta tipo salvaje *Arabidopsis thaliana* de la accesión Ws.

La generación F1 resultante constaba de plantas híbridas con un fondo mixto Ler/Ws, que eran hemocigotos para la estructura RNAi. Porque la estructura RNAi actúa de forma esporofítica y de manera dominante, todas las plantas F1 exhibieron el fenotipo del polen del cuarteto. Una planta F1, que exhibía el fenotipo del polen del cuarteto, fue cruzada después como un padre con una planta mutante *Arabidopsis thaliana cenh3* de la accesión Col-0, que había sido genéticamente transformada con la GFP-CENH3 estructura de intercambio de cola como repostada por Maruthachalam & Chan (Nature 464, 615-619; 2010). Este cruce dio como resultado la eliminación de los cromosomas maternos durante la primera división mitótica en el cigoto, conduciendo a la formación de semillas haploides.

En la preparación para el cruce, se abrieron casi dehiscentes anteras de la planta padre bajo un microscopio binocular para permitir la recolección de tétradas de polen, individuales maduras. Cada tétrada de polen fue cuidadosamente depositada en el pistilo de una planta madre, utilizando una pestaña o un fino cepillo de cabello, y los cuatro granos de polen fueron validados para fertilizar cuatro óvulos. Las cuatro semillas resultantes de esta

5 polinización limitada con una única tétrada de polen fueron validadas para madurar, y posteriormente fueron cosechadas y validadas para germinar. Alternativamente, se puede depositar más de una tétrada en el pistilo de la planta madre, pero debe tenerse cuidado de que la cantidad de granos de polen no exceda el número promedio de óvulos en el aparato reproductor de la especie. La utilización de más de una tétrada para la polinización reducirá concretamente la eficiencia con la que las plantas de progenie genéticamente complementaria pueden ser identificadas.

10 La ploidía de las plántulas resultantes de la polinización limitada de la planta madre transgénica Col-0 fue probada por citometría de flujo. Su ploidía era  $n$ , excepto en algunos casos en los que, mientras tanto ocurría, que el genoma espontáneo duplica hasta  $2n$ . Para genomas haploides individuales que duplican se logró posteriormente por métodos estándar conocidos por las personas expertas (por ejemplo tratamiento con colchicina). Una vez que las cuatro plántulas resultantes de este cruce fue  $2n$ , su ADN genómico fue aislado y analizado genéticamente para marcadores genéticos que cubren por completo el genoma Arabidopsis. Especialmente fueron probados marcadores polimórficos entre Col-0 y Ler y entre Col-0 y Ws, para distinguir la contribución de ambos genomas progenitores a las cuatro plantas de progenie. Debido a la eliminación del genoma materno de los cigotos las cuatro plantas de progenie solo contenían cromosomas recombinados de la planta padre híbrida, y por lo tanto dieron prueba negativa para todos los marcadores específicos Col-0.

20 La **Figura 2** muestra que la tasa de ocurrencia de plantas de progenie con un cierto número de cromosomas complementarios dentro de una tétrada de polen depende del número ( $n$ ) de cromosomas haploides. *Arabidopsis* tiene cinco cromosomas, y debido al fenotipo del cuarteto de polen en la planta padre original la constelación del cromosoma de las cuatro semillas da como resultado una sola división meiótica. Esto implica que hay una posibilidad teórica de 1 sobre 16 (6,3%) para que dos genomas totalmente complementarios estén presentes en una única tétrada de polen. La posibilidad es del 31,3% para tener dos genomas que tengan un cromosoma no complementario, y 62,5% para tener dos genomas que tengan dos cromosomas no complementarios. En todos los casos los granos de polen individuales en una tétrada son al menos un 50% complementarios entre sí. Es importante destacar que, si la recombinación da como resultado por ejemplo un 40% de heterocigosidad, la complementariedad general entre el genoma de los granos de polen individuales será siempre mayor del 50%, porque incluso los cromosomas "no complementarios" serían entonces aún un 60% complementarios entre sí.

30 Por lo tanto, en teoría solamente se requieren 16 cruces individuales con una tétrada de polen de promedio para identificar dos plántulas de *Arabidopsis* que tengan conjuntos de cromosomas esencialmente complementarios. En la práctica, sin embargo, son necesarios más porque la eficiencia de la polinización, la formación de semillas y la germinación y supervivencia están generalmente por debajo del 100 por ciento. Como regla de oro se hacen 10 veces más cruces con tétradas individuales, es decir, 160 en este caso, para maximizar las posibilidades de éxito.

40 Después de la identificación, dos plantas esencialmente complementarias genéticamente se cultivaron para anéxisis y luego se cruzaron. La constitución genética del progenie F1 que resulta a partir de este cruce se demostró experimentalmente ser esencialmente idéntica a la constitución de su abuelo paterno, es decir la planta mutante *qrt1* con un fondo híbrido Ler/Ws.

#### Ejemplo 4

45 *Combinar el fenotipo cuarteto con eliminación del genoma materno en Arabidopsis, con progenie no transgénica.*

50 En el **Ejemplo 3** la progenie F1 permaneció transgénica, porque retuvo el objetivo estructura RNAi el gen *QRT1*, y por lo tanto también el fenotipo del cuarteto de polen. Sin embargo, cuando un casete reportero GFP que expresa específicamente la Proteína Fluorescente Verde en granos de polen maduro está integrado en la estructura RNAi utilizada en el **Ejemplo 3**, esto permite otro enfoque, en el que las plantas progenie no son transgénicas. La estructura T-ADN contiene también entonces una proteína GFP con una señal de localización nuclear bajo un promotor específico de polen tardío (el promotor *LAT-52*, Twell et al., 1990, Development 109: 705-713), que permite la detección visual fácil de esta estructura en granos de polen maduros.

55 En anteras de calabazas de la planta híbrida Ler/Ws mencionada en el **Ejemplo 3** (homocigoto para la estructura RNAi dirigida al gen *QRT1*), fueron seleccionadas tétradas de polen en las cuales dos de cuatro granos de polen no expresaron GFP en sus núcleos, ya sea visualmente (utilizando un binocular fluorescente o microscopio) o mediante FACS (clasificador de células activadas con fluorescencia). Solamente dos de cuatro granos de polen por lo tanto contenían la estructura RNAi dirigida al gen *QRT1*. La polinización de la planta madre Col-0 anteriormente mencionada, que indujo la eliminación de los cromosomas maternos durante la primera división mitótica en el cigoto, con tal tétrada de polen dio lugar a dos plantas de progenie haploides transgénicas (que albergan la estructura RNAi) y a dos plantas de progenie haploides no transgénicas (que no albergan la estructura RNAi).

65 Las plantas de progenie no transgénica por definición perdieron el fragmento del cromosoma Ler que albergaba la estructura RNAi para *QRT1*, y el cruce de estas dos plantas nunca puede conducir por lo tanto a la reconstitución exacta del híbrido original F1, porque las plantas reconstituidas serán homocigoto para al menos una zona del cromosoma Ws, entendiendo por zona del cromosoma la que corresponde a la zona del cromosoma que contiene la

estructura RNAi para *QRT1* en la planta parental Ler.

**EJEMPLO 5**

5 *Combinar el fenotipo del cuarteto de polen con la restitución de la segunda división en pimiento dulce (Capsicum annuum)*

10 Cuando se produce la restitución de la segunda división (SDR), la segunda división meiótica no tiene lugar, y el resultado de la meiosis serán dos granos de polen diploides, en lugar de cuatro granos de polen haploides. Por lo tanto, cuando los productos meióticos permanecen físicamente unidos entre sí, como es el caso del fenotipo de polen del cuarteto, una planta producirá díadas de polen cuando se produzca SDR. En esta realización preferida de la presente invención, los dos productos meióticos diploides permanecen físicamente unidos entre sí, y debido a que sus cromosomas tienen puntos de ruptura de recombinación idénticos los dos granos de polen son 100% complementarios entre sí.

15 Una planta de pimiento dulce (*Capsicum annuum*) que muestra el fenotipo del cuarteto de polen se obtuvo a través de un enfoque RNAi, similarmente al descrito en el **Ejemplo 3**. Una planta progenie de la misma, homocigoto para el fenotipo del cuarteto, se sometió a estrés mediante frío, con el fin de aumentar la frecuencia de formación de microsporas (gameto) no reducidas, según descrito por Zhang et al. (2002) Journal of Horticultural Science & Biotechnology 78: 84-88 y en ejemplo 2 de WO 2006/094773. Hasta un 25% de las microsporas y polen producido en las anteras de la planta tratada con frío tenían la forma de una díada. Aisladas fracciones de microsporas se enriquecieron adicionalmente mediante díadas por análisis microscópico (alternativamente se puede utilizar citometría de flujo). Utilizando este enfoque, la aplicación referida como Reproducción Casi Inversa (WO 2006/094773) podría ser viable en una realización preferente.

25 Para este propósito, se creó una segunda planta de pimiento dulce que elimina el genoma materno de sus cigotos durante la primera división mitótica, siguiendo el enfoque experimental descrito en el **Ejemplo 2**. Esta planta transgénica de pimiento dulce fue polinizada con una sola díada de polen derivada de la planta de pimiento dulce tratada con frío anteriormente mencionada, y las dos semillas diploides resultantes fueron cosechadas y germinadas. La díada de polen fue seleccionada manualmente en una antera de calabaza de entre los cuartetos de polen que resultaron de eventos meióticos no SDR.

35 Las plantas cultivadas a partir de estas dos semillas diploides fueron cruzadas posteriormente, y, utilizando marcadores genéticos, la composición genética de las plantas de progenie de este cruce podría confirmarse como que es esencialmente idéntica a la composición genética de la planta del pimiento dulce que produjo la díada de polen que utilizamos para la polinización. Sin embargo, debido a eventos cruzados que habían tenido lugar durante la formación de las díadas de polen se introdujeron algunas variaciones teloméricas, lo que proporcionó variación genética adicional en el fondo del híbrido seleccionado.

40 Por lo tanto, la planta de pimiento dulce creada en este ejemplo mediante polinización de una planta madre inductora haploide con una díada de polen producida por otra planta de pimiento dulce fue solo genéticamente "esencialmente idéntica" a la planta de pimiento dulce que produjo la díada de polen para polinización, porque la variación genética adicional había sido introducida en los telómeros, como resultado de eventos cruzados que se habían producido durante la formación de las díadas de polen. Todo el material genético de la planta padre se había mantenido, pero algunas partes del mismo se habían reorganizado a través de eventos cruzados, y esta reorganización puede causar efectos fenotípicos adicionales.

45 Este ejemplo permite de esta manera la introducción de la variación genética adicional en una planta híbrida (élite) seleccionada. Esta variación adicional puede tener efectos fenotípicos adicionales positivos o negativos, cuando se compara con el fenotipo híbrido original, ya así proporciona una oportunidad interesante para seguir mejorando (y/o afinar) un fenotipo híbrido, sin perder la combinación de los rasgos seleccionados contenidos en el híbrido original. Alternativamente, la planta del pimiento dulce que exhibe el fenotipo del cuarteto se puede cruzar con una planta de pepino dulce que exhiba de forma natural un grado superior a la media de SDR. Su progenie entonces producirá de forma natural un porcentaje por encima de la media de díadas de polen. Otra estrategia es hacer mutaciones en una población de plantas de pimiento dulce que de forma natural exhiban un grado superior a la media de SDR, y cribar las plantas que muestran el fenotipo del cuarteto de polen en esta población mutante, en un enfoque genético avanzado.

50 En todas y cada una de las díadas la probabilidad es un 100% de que los dos granos de polen sean esencialmente complementarios genéticamente entre sí (con puntos de rotura cromosómica idénticos). Las dos microsporas contenidas en una díada son por definición esencialmente complementarias genéticamente, y al cruzar las dos plantas que pueden ser derivadas de una cualquiera de estas díadas resultará siempre una planta híbrida que es esencialmente idéntica genéticamente que la planta híbrida original que produjo las díadas. Esta realización por lo tanto mejora enormemente la eficacia de la tecnología de la Reproducción Casi Inversa.

65 Generalmente, en esta realización de la invención una planta que es portadora de una característica genética que

provoca la eliminación de cromosomas maternos de su progenie F1 es polinizado a través de una polinización limitada. El polen utilizado en este cruce es una única díada de polen obtenida a partir de una planta híbrida de la misma especie, que exhibe el fenotipo del cuarteto de polen en combinación con SDR. Esta díada de polen se obtiene al examinar visualmente anteras aplastadas y mediante selección posterior de una constelación de díada de entre las constelaciones de tétradas (que resultaron de divisiones meióticas durante las cuales no se había producido SDR), o por enriquecimiento de una fracción de polen de las díadas, en una configuración de mayor rendimiento, por medio de citometría de flujo o clasificación de células.

Después de la polinización de la planta madre que es portadora de una característica genética que provoca la eliminación de los cromosomas maternos de su progenie F1, cada uno de los dos granos de polen diploide comprendidos en la díada fertilizan un óvulo, y la semilla puede formarse y madurar. Al madurar las dos semillas que resultan de este cruce se cosechan y germinan. Las plántulas resultantes se comprueban luego para ver su nivel de ploidía por medio de citometría de flujo, para confirmar que son en efecto  $2n$ , como era de esperar.

Posteriormente, el ADN genómico se aisló de las dos plántulas, y los marcadores genéticos que cubren todo el genoma se prueban en ambos individuos. Debido a la eliminación de los cromosomas maternos del cigoto, se espera que ambas plántulas solo posean cromosomas paternos. Debido al hecho que los cromosomas de ambas plántulas se originaron en una sola división meiótica, todos los puntos de ruptura cromosómica son idénticos, y sus genomas son 100% complementarios. Esto se confirma por el análisis del marcador genómico completo.

Las plántulas se cultivan posteriormente para maduración y cruce entre sí. Su progenie F1 es genéticamente esencialmente idéntico a la planta híbrida inicial original que se utilizó como padre en el primer cruce, excepto para eventos cruzados que ocurrieron durante la formación de los gametos SDR. Estos eventos cruzados introducen alguna variación telomérica, que proporciona variación genética adicional en el fondo híbrido seleccionado.

La reconstrucción casi exacta del genotipo (híbrido) del organismo abuelo paterno se consiguió en solo dos generaciones y sin necesidad de regeneración intermedia o etapas de duplicación del genoma o cultivo de tejidos.

#### Ejemplo 6

*Combinar el fenotipo de polen del cuarteto con supresión de recombinación cromosómica y eliminación del genoma materno en Arabidopsis*

A partir de un cruce entre una planta *Arabidopsis* que exhibe el fenotipo de polen del cuarteto y otra planta *Arabidopsis* en la que la recombinación del cromosoma se ha suprimido parcial o totalmente (ya sea por medios transgénicos, por mutación o químicos), se puede seleccionar una planta progenie F2 en la que se combinan ambas propiedades: los cuatro granos de polen que resultan a partir de una sola división meiótica permanecen físicamente unidos hasta el momento de la antesis y derramamiento del polen y durante la meiosis se suprime la recombinación de cromosomas homólogos.

Esta planta progenie permite la aplicación de la Reproducción Inversa (WO 03/017753; Dirks et al 2009) de manera más eficiente. Ya que los productos meióticos permanecen físicamente unidos entre sí, la posibilidad de identificar dos granos de polen con conjuntos de cromosomas esencialmente complementarios aumenta considerablemente. El número de tétradas diferentes es una función del número de cromosomas de las especies, pero dentro de una sola tétrada, sin embargo, la posibilidad de que dos granos de polen tengan conjuntos de cromosomas totalmente complementarios es siempre el 50%, ya que los cuatro granos de polen son complementarios de dos en dos. Dentro de cada tétrada la posibilidad de encontrar dos pares de granos de polen complementarios es por lo tanto del 100%.

Como se describe en el **Ejemplo 3**, se creó una planta Ler *Arabidopsis thaliana*, que alberga una sola copia (en estado hemicingótico) de una estructura RNAi que apunta el gen *QRT1*, impulsado por el promotor constitutivo CaMV 35S. Esta planta se cruzó después con una planta *Arabidopsis thaliana* de la accesión Ws que albergaba una copia única homocigoto de una estructura RNAi que apunta el gen *DMC1*, impulsado también por el promotor constitutivo CaMV 35S.

La generación F1 resultante constituida de plantas híbridas con un fondo mixto Ler/Ws, que eran todas homocigotos para ambas estructuras RNAi. Ya que las estructuras RNAi ambas funcionan de forma esporofítica y de manera dominante, las plantas F1 exhibían el fenotipo del cuarteto de polen y la supresión de la recombinación cromosómica durante la meiosis. Como efecto lateral no deseado la supresión de la recombinación cromosómica también resultó la aparición de tétradas de polen desequilibradas (junto con tétradas equilibradas), porque a falta de suficiente proteína funcional *DMC1* cada cromosoma se distribuye de forma aleatoria sobre las células hijas de una división. Sin embargo, las tétradas equilibradas se pueden seleccionar de anteras experimentalmente (a través de inspección visual y/o citometría de flujo).

Las tétradas de polen equilibradas derivadas de una planta F1, exhibiendo el fenotipo de polen del cuarteto en combinación con la supresión de la recombinación cromosómica, siendo hemicingotos para ambas estructuras transgénicas, fueron posteriormente utilizados para polinizar plantas mutantes *Arabidopsis thaliana cenh3* de la

accesión Col-0 (como se creó y reportó por Maruthachalam & Chan, 2010), que ha sido genéticamente transformado con la estructura de cambio de cola *GFP-CENH3* reportada por Maruthachalam & Chan (2010), que da como resultado la eliminación de los cromosomas maternos durante la primera división mitótica en el cigoto.

5 Cuando se utilizó una sola tétrada de polen equilibrada para la polinización de un pistilo de la planta madre, este cruce idealmente dio como resultado cuatro semillas de la progenie haploide. Las cuatro semillas de la progenie se dejaron germinar, y las plántulas fueron probadas genéticamente con marcadores. Ya que no se produjo la recombinación cromosómica durante la meiosis (debido a la estructura RNAi que apunta *DMC1* todos los cromosomas se pasaron a la próxima generación en su totalidad), sólo se necesitó probar unos pocos marcadores de cada cromosoma, para determinar si fue heredado del abuelo Ler o del abuelo Ws (de hecho un único marcador polimórfico por cromosoma sería suficiente; en nuestro enfoque experimental utilizamos un marcador por brazo cromosómico, es decir dos marcadores por cromosoma).

10  
15 Para asegurar que la planta madre no ha contribuido genéticamente a la progenie también fueron probados marcadores específicos Col-0, pero no se pudo identificar material genético Col-0, como también fue el caso en el **Ejemplo 3**.

20 Se encontró que las cuatro plantas de la progenie eran parejas perfectamente complementarias genéticamente, y basado en los análisis del marcador genético estas parejas podían ser identificadas de forma eficiente. Cruzando tales pares de la progenie de las plantas genéticamente complementarios entre sí resultó una reconstitución genética eficiente de la planta híbrida original que produjo la tétrada de polen que se utilizó para la polinización, es decir, la planta híbrida Ler/Ws hemicingoto para ambas estructuras RNAi. La **Figura 4** ilustra el pedigrí de las plantas utilizado en este experimento.

## REIVINDICACIONES

1. Método para la producción de un conjunto de semillas que son genéticamente idénticas a los gametos masculinos de los cuales surgen, que comprende:

- 5 a) colocar un número de gametos paternos que tienen la forma de tétradas o díadas en el estigma de una flor para fertilizar células ovulares maternas para obtener un número de cigotos;
- 10 b) inducir la pérdida de cromosomas maternos de los cigotos para obtener un número de semillas de constituyen un conjunto de semillas, en el cual los cromosomas maternos de las semillas están ausentes, en donde el número de gametos paternos es igual o menor que el número de células ovulares contenidas en el órgano reproductivo femenino que lleva el estigma, en particular dos o cuatro, y en donde la pérdida de cromosomas maternos del cigoto se induce utilizando una línea de inductor haploide como la hembra, en donde la hembra es una planta transgénica que comprende un casete de expresión transgén heterólogo, comprendiendo el casete expresión un promotor vinculado operativamente a una codificación polinucleótida de un *CENH3*, *CENPC*, *MIS12*, *NDC80* alterado de forma recombinable o polipéptido *NUF2*, y teniendo un correspondiente endógeno inactivado *CENH3*, *CENPC*, *MIS12*, *NDC80* o gen *NUF2*.

2. Método como el reivindicado en la reivindicación 1, en el que los gametos paternos que tiene la forma de tétradas o díadas son el resultado de interferencia con la separación de la tétrada de microspora, por interferencia con uno o más genes objetivo seleccionados del grupo que consta de *QRT1*, *QRT2* y *QRT3*, en donde la interferencia con el uno o más genes objetivo consiste en prevenir la transcripción de los mismos, en particular por medio de oligonucleótidos de ARN, oligonucleótidos de ADN o moléculas RNAi dirigidas contra el promotor del gen objetivo, o por medio de la expresión de una actuación negativa factor de transcripción que actúa sobre el promotor del gen objetivo o desestabilizar el ARNm del gen objetivo o transcrito, preferiblemente por medio de moléculas de ácido nucleico que son complementarias al ARNm del gen objetivo o transcrito, seleccionado del grupo que consta de ARN antisense, moléculas ARNi, moléculas del gen inducido por el virus de silenciamiento (VIGS), moléculas co-supresoras, oligonucleótidos de ARN u oligonucleótidos de ADN, o en donde la interferencia con el uno o más genes objetivo consiste en inhibir el producto expresión del gen objetivo, preferiblemente por medio de producto(s) expresión de una o más estructuras de ácido nucleico negativas dominantes, o preferiblemente por medio de uno o más compuestos químicos, o la introducción de una o más mutaciones en el gen objetivo, llevando a la perturbación de su función biológica, y en donde una o más mutaciones se introducen preferiblemente de forma aleatoria por medio de uno o más compuestos químicos, tales como metano-sulfonato de etilo, nitroso-metil-urea, hidroxilamina, proflavina, N-metil-N-nitroso-guanidina, N-etil-N-nitroso-urea, N-metil-N-nitro-nitroso-guanidina, dietil sulfato, etilenimina, ázida sódica, formalina, uretano, fenol y óxido de etileno, y/o por medios físicos, tales como irradiación UV, exposición a neutrones rápidos, rayos X, irradiación gamma, y/o por inserción de elementos genéticos, tales como transposones, T-ADN, elementos retrovirales, y/o en donde se introducen específicamente la una o más mutaciones por medio de recombinación homóloga o inducción de mutación basada en oligonucleótidos.

3. Método como el reivindicado en las reivindicaciones 1 o 2, en donde la planta padre exhibe la supresión de la recombinación cromosómica durante la meiosis, cuya supresión de la recombinación cromosómica se logra por interferencia con uno o más genes objetivo implicados en la recombinación, en particular con uno o más genes objetivo que están involucrados en rupturas de doble cadena, tales como *SPO11*, *MER1*, *MER2*, *MER3*, *MEI4*, *REC102*, *REC104*, *REC114*, *MEK1/MRE4*, *RED1*, *HOP1*, *RAD50*, *MRE11*, *XRS2* o con uno o más genes objetivo que están involucrados en parejas de cromosomas y/o intercambio de cadenas, tales como *RHD54/TID1*, *DMC1*, *SAE3*, *RED1*, *HOP1*, *HOP2*, *REC8*, *MER1*, *MER2*, *ZIP1*, *ZIP2*, *MEI5*, *RAD51*, *RAD52*, *RAD54*, *RAD55*, *RAD57*, *RPA*, *SMC3*, *SCC1*, *MSH2*, *MSH3*, *MSH6*, *PMS1*, *SOLODANCERS*, *HIM6*, *CHK2*, o con uno o más genes objetivo que están involucrados en el proceso de recombinación meiótica, tales como *SGS1*, *MSH4*, *MSH5*, *ZIP1* y *ZIP2*, o con uno o más genes objetivo que se seleccionan del grupo que consta de *PRD1*, *PRD2*, *PRD3*, *PHS1*, *NBS1*, *COM1*, *MND1*, *MER3/RCK*, *ZIP3*, *ZIP4*, *PTD*, *SHOC1*, *ZYP1*, *MLH1*, *MLH3*, en donde la interferencia con uno o más genes objetivo consiste en prevenir transcripción de los mismos, en particular por medio de oligonucleótidos de ARN, oligonucleótidos de ADN o moléculas ARNi dirigidas contra el promotor del gen objetivo, o por medio de la expresión de una actuación negativa factor de transcripción que actúa sobre el promotor del gen objetivo o que desestabiliza el ARNm del gen objetivo o transcrito, preferiblemente por medio de moléculas de ácido nucleico que son complementarias al ARNm del gen objetivo o transcrito, seleccionado del grupo que consta de ARN antisense, moléculas ARNi, moléculas del gen inducido por el virus de silenciamiento (VIGS), moléculas co-supresoras, oligonucleótidos de ARN u oligonucleótidos de ADN, o en donde la interferencia con el uno o más genes objetivo consiste en inhibir el producto expresión del gen objetivo, preferiblemente por medio del producto(s) expresión de una o más estructuras de ácido nucleico negativas dominantes, o preferiblemente por medio de uno o más compuestos químicos, o la introducción de una o más mutaciones en el gen objetivo, llevando a la perturbación de su función biológica, y en donde la una o más mutaciones se introducen preferiblemente de forma aleatoria por medio de uno o más compuestos químicos, tales como metano-sulfonato de etilo, nitroso-metil-urea, hidroxilamina, proflavina, N-metil-N-nitroso-guanidina, N-etil-N-nitroso-urea, N-metil-N-nitro-nitroso-guanidina, dietil sulfato, etilenimina, ázida sódica, formalina, uretano, fenol y óxido de etileno, y/o por medios físicos, tales como irradiación UV, exposición a neutrones rápidos, rayos X, irradiación gamma, y/o por inserción de elementos genéticos, tales

como transposones, T-ADN, elementos retrovirales, y/o en donde se introducen específicamente la una o más mutaciones por medio de recombinación homóloga o inducción de mutación basada en oligonucleótidos.

5 4. Método como el reivindicado en las reivindicaciones 1 o 2, en el que la planta padre exhibe la restitución de segunda división (SDR) durante la meiosis.

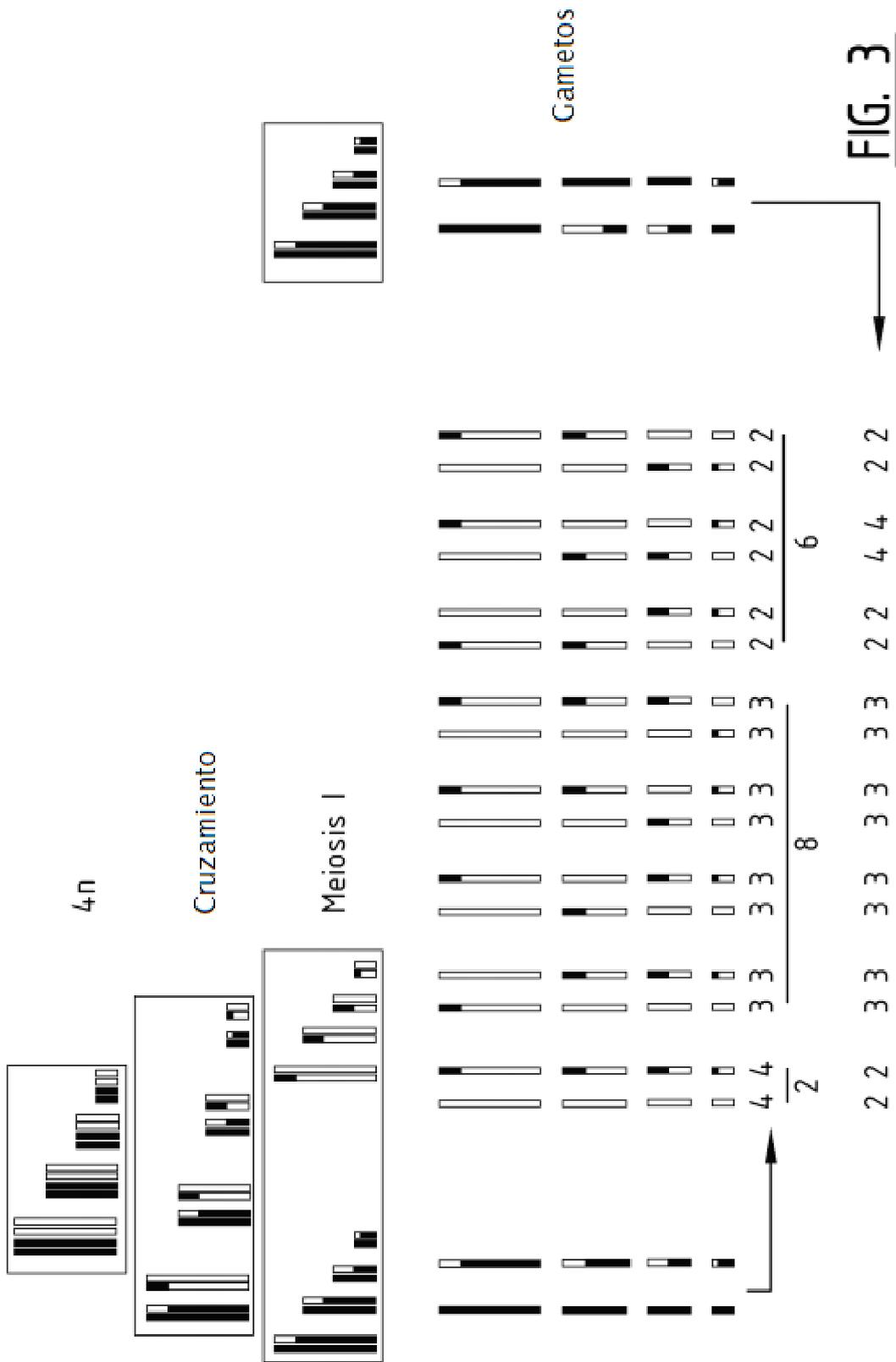
10 5. Método como el reivindicado en la reivindicación 4, en el que la restitución de la segunda división ocurre espontáneamente, en particular sin interferencia con el organismo inicial, o por medio de modificación genética, en donde la modificación genética es transitoria, o en la que la modificación genética se consigue por la incorporación estable en el genoma de un elemento genético que aumenta el número de eventos de restitución de segunda en el organismo, o la restitución de la segunda división se consigue sometiendo la planta padre a estrés ambiental, tal como estrés de temperatura, NO<sub>2</sub>, óxido nitroso (N<sub>2</sub>O), o combinaciones de los mismos.

15



Probabilidad		# de cromosomas no complementarios												
n	2>n	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2	4	50,0	50,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	8	25,0	75,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	16	12,5	50,0	37,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	32	6,3	31,3	62,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	64	3,1	18,8	46,9	31,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	128	1,6	10,9	32,8	54,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	256	0,8	6,3	21,9	43,8	54,7	0	0	0	0	0	0	0	0
9	512	0,4	3,5	14,1	32,8	49,2	0	0	0	0	0	0	0	0
10	1024	0,2	2,0	8,8	23,4	41,0	50,0	0	0	0	0	0	0	0
11	2048	0,1	1,1	5,4	16,1	32,2	45,6	0	0	0	0	0	0	0
12	4096	0,05	0,6	3,2	10,7	24,2	38,9	45,6	0	0	0	0	0	0

FIG. 2



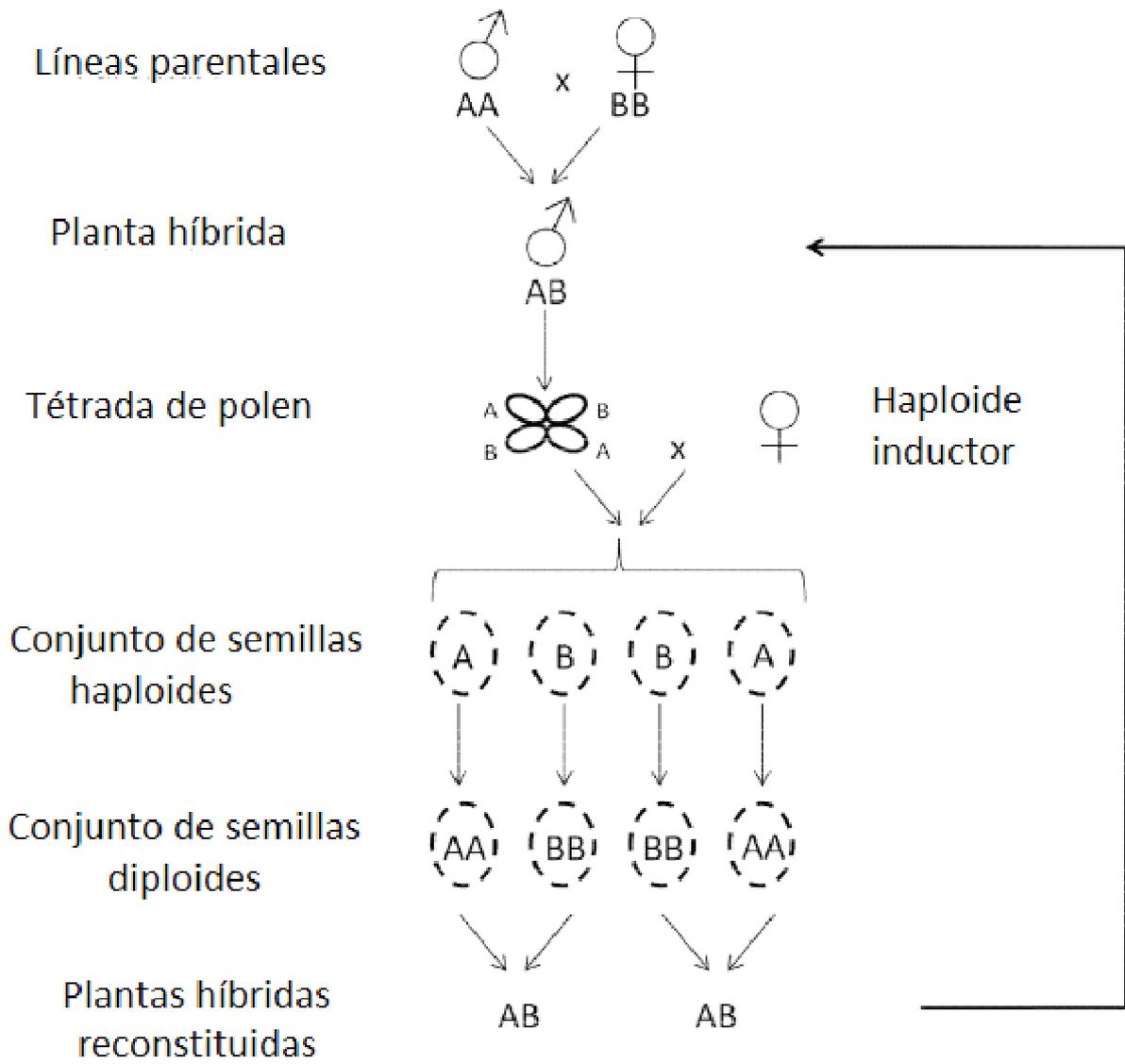


FIG. 4