

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 676 748**

51 Int. Cl.:

A01H 1/00 (2006.01)

A01H 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.08.2009** **PCT/US2009/055191**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.03.2010** **WO10025248**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.08.2009** **E 09810578 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.05.2018** **EP 2339911**

54 Título: **Procedimientos de producción de semillas de plantas**

30 Prioridad:

29.08.2008 US 93131 P

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

24.07.2018

73 Titular/es:

SEMINIS VEGETABLE SEEDS, INC. (100.0%)
800 N. Lindbergh Blvd.
St. Louis MO 63167, US

72 Inventor/es:

JUAREZ, BENITO;
WALKER, TERRY;
MCCUISTION, FRED y
TOLLA, GREG

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 676 748 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

Procedimientos de producción de semillas de plantas

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere al campo de producción de semillas y, más específicamente, a procedimientos para producir semillas triploides de sandía.

Antecedentes de la invención

- Las sandías son diploides naturales, conocidos como 2N (N=11). Muchas plantas, incluyendo las sandías, se pueden someter a una duplicación de su conjunto entero de cromosomas y existir como tetraploides 4N (4N=44). Los tetraploides de sandía se pueden producir habitualmente en el laboratorio usando técnicas de biología celular.
- 10 Se puede cruzar un parental tetraploide con un parental diploide para producir semillas triploides (3N=33). Una planta híbrida triploide produce frutos de la sandía que son "sin semilla", lo que significa que muy raramente produce semillas maduras y solo raramente produce semillas inmaduras con capas de semillas duras, pero no embriones. Para obtener semillas triploides de sandía, se genera un cruzamiento entre una línea tetraploide y una diploide. La flor tetraploide femenina se usa como el 'parental de semilla' y la flor masculina diploide se usa como el donador de polen. Las semillas obtenidas a partir de este cruzamiento tienen embriones triploides. Un parental de semilla tetraploide típicamente produce solo del 5 al 10 % de las muchas semillas como una planta diploide típica. Si las flores femeninas diploides se polinizan con polen que proviene de flores tetraploides, el resultado es de semillas vacías.
- 15 Cuando se hace la producción de híbridos triploides mediante la polinización abierta, no hay control sobre la fuente de polen que alcanza el estigma de la flor tetraploide y, por lo tanto, se pueden hallar semillas tanto tetraploides como triploides en el mismo fruto. En ausencia de procedimientos de selección, las semillas híbridas producidas de este modo se pueden, por lo tanto, contaminar con semillas que resultan de la autopolinización.
- 20

Sumario de la invención

- 25 La invención proporciona un procedimiento para seleccionar semillas de sandías triploides de una población de semillas basándose en el espesor y/o en el peso de las semillas triploides, obteniéndose dicha población de semillas mediante: (a) la obtención de una planta de sandía tetraploide, en la que la planta se ha injertado en un portainjerto que presenta tolerancia al estrés cuando hay condiciones de estrés; (b) permitir la polinización de la planta de sandía tetraploide por una planta de sandía diploide; y (c) permitir que la semilla triploide del tetraploide se forme en la planta de sandía tetraploide. La planta de sandía tetraploide produce semillas triploides (3N) híbridas tras ser polinizada por una planta de sandía que es diploide.
- 30 Un portainjertos usado de acuerdo con la invención puede presentar cualquier tipo de resistencia al estrés. En una realización, el portainjertos presenta tolerancia a un estrés abiótico seleccionado del grupo que consiste en tolerancia al frío, tolerancia al calor, tolerancia a la sequía y tolerancia a la sal. En otra realización, el portainjertos presenta tolerancia al estrés biótico seleccionado del grupo que consiste en resistencia a enfermedades, resistencia a insectos y resistencia a nemátodos. La resistencia a las enfermedades incluye la resistencia a enfermedades bacterianas, fúngicas y víricas. En realizaciones específicas, el portainjertos se puede obtener de una planta seleccionada del grupo que consiste en sandía, calabacín, calabaza, calabaza de cera y calabaza de botella. En realizaciones adicionales, el parental de semilla puede o no cultivarse en condiciones de estrés.
- 35 El injerto llevado a cabo de acuerdo con la invención se puede realizar mediante cualquier procedimiento conocido por un experto en la materia. En una realización, el injerto se realiza mediante un procedimiento seleccionado a partir del grupo que consiste en injerto de empalme, injerto de yema, injerto de hendidura, injerto lateral, injerto de aproximación e injerto de inserción en orificio. La polinización se puede llevar a cabo de acuerdo con procedimientos convencionales, que incluyen la polinización por insectos y la polinización manual.
- 40 Según la invención, las semillas triploides se vuelven visiblemente distinguibles de las semillas del parental tetraploide, basándose en su espesor y/o peso, particularmente cuando el parental de semilla se expone a condiciones de estrés durante el cultivo. Por lo tanto, la invención permite seleccionar semillas de una categoría de ploidía a de semillas de otras categorías de ploidía basándose en el espesor y/o en el peso. En una realización, la selección se puede realizar de forma manual. En otra realización, la selección se puede realizar de forma mecánica mediante una máquina automatizada.
- 45 Las semillas seleccionadas mediante el procedimiento de la invención permiten la producción de un mayor número de frutos, un mayor número de semillas por fruto, y un mayor peso total de semillas por fruto en un parental de semilla injertado en relación con un parental de semilla no injertado. En realizaciones específicas, la producción de semillas por fruto, incluyendo plantas diploides y tetraploides, se puede definir como, por ejemplo, al menos 5, 10, 25, 50, al menos 75, al menos 100, al menos 125, al menos 150, al menos 175, al menos 200, al menos 225 o al menos 250 semillas por fruto, incluyendo de 5 a 150, de 34 a 100, de 60 a 120, de 50 a 150, de 100 a 200, de 125 a
- 50
- 55

250 y de 150 a 200, semillas por fruto producidas usando un parental de semilla injertado con una planta diploide donadora de polen. En el caso de plantas de sandía diploides, la producción de semillas por fruto se puede definir en realizaciones específicas como al menos 150, 200, 250, 300, 350 o al menos 400.

- 5 Éstas y otras características y ventajas de la presente invención se describen en, o son evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de diversas realizaciones ejemplares del procedimiento de acuerdo con la presente invención.

Descripción detallada de la invención

10 La invención supera limitaciones en la técnica al proporcionar procedimientos mejorados de producción de semillas triploides de sandía. Los inventores descubrieron sorprendentemente que la producción de semillas triploides se puede mejorar de manera sustancial cruzando una línea diploide donadora de polen con un parental de semilla tetraploide que se ha injertado en un portainjertos que presenta resistencia a estrés biótico o abiótico cuando está en condiciones de estrés, y que estos beneficios se observan incluso en ausencia de exposición del parental de semilla al estrés al que confiere resistencia el portainjertos. Por ejemplo, se descubrió que el uso de un portainjertos de resistencia a enfermedades confiere una producción de semillas mejorada incluso en ausencia de la presión de la enfermedad. De manera significativa, los inventores también descubrieron que las semillas triploides producidas mediante los parentales de semilla injertados presentaban una morfología que era más diferente de las semillas tetraploides en relación con las plantas no injertadas. Las distinciones mejoradas en las características morfológicas de la semilla son de gran importancia debido a la dificultad que puede darse para distinguir las semillas tetraploides también halladas en frutos del parental de semilla de las semillas triploides. Mejorando las distinciones entre las semillas triploides y tetraploides, tales como el espesor y el peso, la invención permite una fácil separación de las semillas triploides mediante selección manual o automatizada. La cualidad de la semilla y la eficacia de la producción de semillas aumentan de este modo, beneficiando tanto a los productores de semillas como a los agricultores.

25 Los parentales de semilla injertados también se pueden usar para mejorar la producción y la calidad de las semillas. Los inventores sorprendentemente descubrieron que se podrían obtener elevados números de semilla por fruto en parentales de semilla injertados en relación con los parentales de semilla no injertados, e incluso más sorprendentemente se descubrió el efecto incluso en ausencia del estrés para el que el portainjertos confiere resistencia. Se desvela el cruzamiento de un parental de semilla injertado, que puede ser una planta de sandía diploide o tetraploide, con una planta donadora de polen injertada o no injertada. Los ejemplos de líneas de semillas diploides que se pueden usar como parentales de semilla o donadores de polen de acuerdo con la invención son bien conocidos en la materia e incluyen Allsweet, Crimson Sweet, Jubilee, Dixie Lee, Sugar Baby, Calsweet, Charleston Grey y Minilee.

35 Las técnicas desveladas también son aplicables a otras especies que son susceptibles al injerto. Por lo tanto, se desvela un procedimiento de producción de semillas de plantas que comprende: cruzar una primera planta que se ha injertado en un portainjerto que presenta tolerancia al estrés cuando hay condiciones de estrés, permitir que la primera planta sea polinizada por una segunda planta de la misma especie, y permitir que la semilla se forme en la primera planta, en la que la primera planta se cultiva en ausencia de dichas condiciones de estrés. Los ejemplos de especies aplicables al procedimiento incluyen pimienta picante, pimienta dulce, tomate, calabacín, pepino, calabaza, calabaza ornamental, melón, berenjena y quingombó. El portainjertos confiere resistencia a enfermedades bacterianas, fúngicas y/o víricas.

45 El parental de semilla puede ser una planta tetraploide que se cruza con un donador de polen diploide para producir semillas híbridas triploides. Los ejemplos de parentales de semilla tetraploide que se pueden usar se conocen en la materia. Los procedimientos para producir plantas tetraploides de sandía también se conocen en la materia y se describen en, por ejemplo, véase Kihara, 1951 y Eigsti, 1971. Para desarrollar un tetraploide, se pueden usar compuestos químicos que alteran la mitosis de una línea endogámica diploide, de manera que se obtienen números inusuales de cromosomas. Por ejemplo, la colchicina es un compuesto químico que altera las fibras del huso mitótico de células diploides dando como resultado un número de células que son tetraploides. La línea diploide usada para crear un tetraploide se puede seleccionar basándose en los rasgos deseados para la línea tetraploide. Por lo tanto, los rasgos que se desean para una línea tetraploide se pueden introgresar en primer lugar en las líneas endogámicas diploides que se usarán para desarrollar las líneas tetraploides mediante procedimientos de cultivo bien conocidos para el experto en la materia. De ese modo, las líneas parentales diploide y tetraploide se pueden cultivar por separado para los rasgos deseados.

55 Se pueden requerir dos generaciones de autopolinización y selección para "fijar" la condición de 4N porque, tras el tratamiento con colchicina, a menudo se encuentran anomalías cromosómicas que afectan a la fertilidad de la semilla, y se deben eliminar. Una vez se ha verificado el tetraploide estable que contiene las características deseadas, se pueden usar como parental femenino estable para la producción del híbrido triploide.

El cruzamiento de dos tetraploides diferentes seguido por el cultivo de recombinación también puede dar como resultado nuevas líneas de tetraploide. Se requiere un período de cultivo más largo para desarrollar una línea tetraploide estable usando esta estrategia. Esto se debe al gran número de combinaciones genéticas y a las pocas

semillas que producen los tetraploides.

Los parentales de semilla también se pueden propagar mediante cultivo tisular. El uso de cultivo tisular para propagar plantas de sandía se ejemplifica en Zhang y col., 1994a.

Selección y uso del portainjertos

- 5 Se desvelan adicionalmente procedimientos que implican la selección y el uso de un portainjertos que tiene un fenotipo deseado que comprende la tolerancia al estrés cuando hay condiciones de estrés. Puede ser deseable seleccionar un portainjertos que presente rasgos deseables que están ausentes en el parental de semilla. Por ejemplo, si un parental de semilla tetraploide es susceptible a una enfermedad transmitida por el suelo, se puede seleccionar para el injerto un portainjertos que es resistente a la enfermedad transmitida por el suelo.
- 10 Los ejemplos de estrés abiótico para los que el portainjertos puede conferir resistencia incluyen frío, altas temperaturas, sal, sequías e inundaciones. Los ejemplos de estrés biótico incluyen patógenos de plantas, insectos y nemátodos. Los portainjertos pueden ser de plantas de cualquier nivel de ploidía, incluyendo plantas diploides y tetraploides. Los ejemplos de portainjertos conocidos incluyen RS-841, Shintoza, Shogun, Charmtoza, FR Couple y FR Strong.
- 15 No es necesario que el portainjertos sea de la misma especie de la que proviene el vástago. También se pueden usar los portainjertos de otras plantas que sean compatibles con el vástago. Los ejemplos de tal portainjerto compatible para su uso con sandía y otras especies incluye, pero sin limitación, calabaza de botella (*Lagenaria Siceraria* var. *hispida*), calabaza de cera (*Benincasa hispida*), calabaza (*Cucurbita pepo*), calabaza comestible (*Cucurbita moschata*), pepino africano (*Cucumis metuliferus*), *Cucurbita maxima*, el interespecífico *Cucurbita maxima* x *Cucurbita moschata* y la bur-cucumber *Sicyos angulatus*. (Véase, por ejemplo, Zhang y col. 1994a).
- 20

El portainjertos también puede ser una progenie de un cruzamiento interespecífico. En una realización particular, el portainjertos es una progenie de cruzamientos interespecíficos entre *Cucurbita maxima* y *Cucurbita moschata*. Un ejemplo de tal progenie es Shintoza.

- 25 Los procedimientos de injerto para sandía y otras especies son conocidos en la materia. Los ejemplos de procedimientos de injerto incluyen injerto de empalme, injerto de yema, injerto de hendidura, injerto lateral, injerto de aproximación e injerto de inserción en orificio. (Véase, por ejemplo, Cushman 2006). El injerto se puede realizar de forma manual o mediante una máquina automatizada.

Selección de los donadores de polen diploides y cruzamiento con los parentales de semilla

- 30 Se seleccionan plantas donadoras de polen diploides para su uso como un parental masculino en un cruzamiento con una planta tetraploide injertada. Se puede seleccionar un diploide endogámico estable. Se puede requerir un suministro de polen viable y adecuado del donador de polen diploide para que las flores femeninas se establezcan y se desarrollen en un fruto regular. En algunas realizaciones, se injerta un donador de polen diploide en un portainjertos seleccionado. En otras realizaciones, el donador de polen diploide es una planta no injertada. En una realización no limitante, la planta donadora de polen diploide puede ser una línea públicamente disponible tal como, por ejemplo, Crimson Sweet, Jubilee, Sugar Baby, Dixie Lee, Allsweet, Calsweet, Charleston Grey y Minilee. Generalmente, se seleccionarán donadores de polen que producen una progenie con fenotipos deseables cuando se cruzan con el correspondiente parental de semilla.
- 35

- 40 Se proporcionan procedimientos para cruzar un parental de semilla con un donador de polen. Estos procedimientos se ejemplifican adicionalmente como procesos para preparar semillas o plantas de sandía híbridas, en las que un parental de semilla se cruza con una planta de sandía donadora de polen de una línea diferente y distinta para proporcionar un híbrido que tiene una planta de sandía injertada como uno de sus parentales. En estos procedimientos, el cruzamiento dará como resultado la producción de semillas. La producción de semillas tiene lugar independientemente de si la semilla se recolecta.

- 45 La primera etapa en el "cruzamiento" comprende plantar los parentales de semilla y los donadores de polen en proximidad para que se dé la polinización, por ejemplo, mediada por vectores de insectos. El polen se puede transferir de forma manual. La proporción deseada de parentales de plantas y donadores de polen para la producción de semillas híbridas de sandía es bien conocida para el experto en la materia. En un ejemplo, los parentales de semilla y los donadores de polen se plantan a una proporción de 2:1. Los ejemplos de otras proporciones de parentales de semilla y de donadores de polen incluyen 1:1, 3:1, 4:1 y 5:1. En una realización particular, se pueden plantar campos de producción de semillas en la proporción de 2 filas de la línea femenina y 1 fila de la línea masculina diploide.
- 50

- 55 Una segunda etapa puede comprender cultivar o dejar crecer las semillas del parental de semilla y de las plantas de sandía donadoras de polen hasta plantas que tengan flores. Una tercera etapa puede comprender evitar la autopolinización de las plantas, tales como mediante emasculación de las partes masculinas de las flores, (es decir, tratando o manipulando a las flores para producir una planta de sandía parental emasculada). También se pueden usar sistemas de autoincompatibilidad en algunos cultivos híbridos para el mismo fin. Las plantas autoincompatibles

aún arrojan polen viable y pueden polinizar plantas de otras variedades pero son incapaces de polinizarse a ellas mismas o a otras plantas de la misma línea. En algunas realizaciones, todas las partes masculinas de la flor se pueden eliminar de forma manual de las plantas femeninas. El procedimiento se conoce como eliminación de yemas o emasculación. En otras realizaciones, se puede usar una línea de parental de semilla estéril masculina que puede no requerir el procedimiento de eliminación de yemas.

Una cuarta etapa para un cruzamiento híbrido puede comprender la polinización cruzada entre el parental de semilla y las plantas de sandía donadoras de polen. En una realización, el polen del parental donador de polen diploide se transfiere a un parental de semilla femenino diploide o tetraploide mediante procedimientos manuales bien conocidos para un experto en la materia. En otra realización, el polen se transfiere mediante vectores de insectos. En una realización particular, el cruzamiento de parentales de semilla puede implicar la autopolinización, que puede tener lugar de forma manual o sin ninguna intervención humana.

Otra etapa más comprende la recolección de semillas del parental de semilla. Se puede recolectar todo o una parte del fruto establecido en el parental de semilla, y se aíslan las semillas. (patente de EE.UU. n.º 6.018.101). La semilla recolectada se puede usar para cualquier fin deseado, incluyendo el cultivo para producir plantas de sandía y la venta a agricultores.

Recuperación de las semillas

Las semillas se pueden recuperar de frutos maduros usando procedimientos conocidos para un experto en la materia. En algunas realizaciones, un parental de semilla tetraploide polinizado de forma abierta puede producir semillas tetraploides además de semillas triploides. Por ejemplo, con el fin de reducir el coste y la mano de obra implicados en la polinización manual, se puede dejar el transporte de polen en manos de las abejas en el campo de parentales de semilla polinizados de forma abierta. En estas condiciones, dado que no hay control sobre la fuente de polen que alcanza el estigma de la flor tetraploide, se pueden hallar semillas tetraploides y triploides en el mismo fruto.

En un ejemplo, un parental de semilla tetraploide injertado de la invención produce semillas triploides que son visiblemente distinguibles de las semillas tetraploides basándose en su espesor y/o peso. El parental de semilla injertado produce semillas con distinciones mejoradas en espesor de la semilla y/o peso de la semilla entre semillas triploides y tetraploides en relación con un parental de semilla no injertado. El parental de semilla injertado, incluso si crece en condiciones de estrés, produce semillas triploides que son distinguibles de las semillas tetraploides y se pueden seleccionar, por ejemplo, por ser más finas que las semillas tetraploides y/o por pesar menos que las semillas tetraploides.

Las semillas triploides, por lo tanto, se pueden separar de las semillas tetraploides basándose en diferencias en las características morfológicas. En una realización, las semillas se separan de forma manual. En otra realización, las semillas se separan de forma mecánica usando una máquina automatizada. La máquina automatizada puede separar las semillas de acuerdo con su espesor y/o su peso.

Se desvela adicionalmente una planta de un parental de semilla injertado e hibridado que presenta un número promedio de semillas de al menos 50 semillas por fruto. En realizaciones específicas, el número de semillas se puede definir adicionalmente como, por ejemplo, al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 75, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 125 o al menos aproximadamente 150 semillas por fruto, incluyendo de aproximadamente 50 a aproximadamente 150, de aproximadamente 34 a aproximadamente 100 y de aproximadamente 60 a aproximadamente 120 semillas por fruto producidas mediante el uso de un parental de semilla injertado con una planta diploide donadora de polen.

Se desvela adicionalmente una planta de un parental de semilla injertado e hibridado que presenta un peso promedio de semillas de al menos 8 gramos (g) por fruto. El peso de las semillas se puede definir adicionalmente como, por ejemplo, al menos 0,5 g, al menos 2 g, al menos 5 g, al menos 8 g, al menos 10 g, al menos 20 g o al menos 50 g por fruto, incluyendo de 5 a 50, de 8 a 40 y de 8 a 15 g por fruto producidas mediante el uso de un parental de semilla injertado con una planta diploide donadora de polen.

Esterilidad masculina

La planta parental de semilla puede ser un estéril masculino (es decir, que comprende un vástago masculino estéril). Por ejemplo, un vástago de sandía tetraploide injertado tal como se describe en el presente documento puede ser masculino estéril. En determinados aspectos, un parental de semilla se puede volver masculino estéril mediante la eliminación física de los tejidos masculinos de la planta tal como la eliminación de las flores productoras de polen. En algunos aspectos, un parental de semilla se puede volver masculino estéril mediante la aplicación de un gametocida, por ejemplo el descrito en la patente de Estados Unidos n.º 4.936.904. Aún en otros aspectos adicionales, un parental de semilla puede comprender un rasgo de esterilidad masculina tal como esterilidad masculina genética o citoplásmica. Por ejemplo, las plantas de sandía tetraploides que comprenden un gen recesivo para la esterilidad masculina se describieron por Love y col., 1986. Una línea de sandía recesiva masculina estable, G17AB, también se ha descrito (Zheng y col., 1994b; Zheng y col., 1996). Las plantas de sandía que comprenden un gen de esterilidad masculina, tales como la línea G17AB, o la progenie de tal planta o línea de plantas también se puede

usar de acuerdo con los procedimientos descritos en el presente documento.

Ejemplos

Los ejemplos que no entran dentro del ámbito de las reivindicaciones tienen fines ilustrativos.

Ejemplo 1

5 Efecto del injerto del parental de semilla sobre el número de semillas y la hibridación

Se obtuvieron vástagos de la variedad híbrida de sandía tetraploide TML 110-1440 y se injertaron en los portainjertos Charmtoza, Shintoza y Shogun. El injerto se llevó a cabo mediante injerto lateral. El tetraploide injertado se plantó en un campo junto con plantas tetraploides no injertadas y la variedad diploide 110-6433 para servir como planta parental masculina. Las plantas se cultivaron en condiciones en las que las plantas no se sometieron a presión de enfermedades u otro estrés destacable.

Se permitió que tuviese lugar la polinización mediada por insectos entre las plantas diploide y tetraploide injertada y se permitió que se formasen las semillas. Las semillas se recolectaron después del parental tetraploide y se tomaron mediciones del peso de las semillas, del número de semillas y de la hibridación (el % de hibridación representa el % de semillas triploides en el fruto del parental tetraploide). Los resultados se presentan en la Tabla 1

15 **Tabla 1 - Elevado peso de semilla por fruto, número de semillas por fruto e hibridación que son resultado del injerto de semillas Parentales.**

	Número total de frutos	Peso de semilla total (g)	Peso de limpio/tamaño (g)	Número total de semillas	Gramos por fruto	Número de semillas por fruto	Hibridación (%)
No injertados	35	348,53	347,80	5.015	9,96	143	65,40
Injertados (todos)	60	689,90	691,20	9.753	11,50	163	81,83
Charmtoza injertada	15	166,30	166,50	2.488	11,09	166	78,70
Shintoza injertada	32	372,34	373,10	5.359	11,64	167	87,20
Shogun injertado	13	151,26	151,60	1.906	11,64	147	79,60

20 Tal como muestra, en la Tabla 1, las plantas injertadas produjeron el peso total de semillas por fruto de 11,50 g, pero las plantas no injertadas produjeron el peso total de semillas por fruto de solo 9,96 g. También, las plantas injertadas produjeron un promedio de 163 semillas por fruto, pero las plantas no injertadas produjeron un promedio de solo 143 semillas. Las plantas injertadas produjeron la hibridación del 81,83 %, pero las plantas no injertadas produjeron la hibridación de solo el 65,40 %.

Ejemplo 2

25 Efecto del injerto del parental de semilla sobre la producción del fruto, el peso de la semilla y la hibridación

30 El parental de semilla tetraploide TML 110-1440 se injertó en los portainjertos, Shintoza, Shogun, Charmtoza, FR Couple y FR Strong mediante injerto lateral. Las plantas tetraploides injertadas, las tetraploides no injertadas y la línea donadora de polen diploide 110-6433 se plantaron en un campo y se cultivaron hasta su madurez. Los donadores de polen diploides se plantaron junto con los parentales de semilla tetraploides injertados, con espaciados de 40,6 cm x 40,6 cm (16" X 16"), 81,3 cm x 81,3 cm (32" X 32"), 122,0 cm x 122,0 cm (48" X 48"), y 61,0 cm x 61,0 cm (24" X 24").

Los parentales de semilla tetraploides se polinizaron de forma abierta por insectos y se dejó que se formasen las semillas. Las semillas se recolectaron y se midió el peso de las semillas, el número de semillas y la hibridación. Los resultados se proporcionan en la Tabla 2.

Tabla 2 - Elevado peso de semillas por fruto e hibridación que son resultado del injerto de parentales de semillas.

Parental femenino, TML 110-1440 más portainjertos	Espaciado (cm (pulgadas))	g/planta	n.º de frutos/planta	PMS (Peso de Mil Semillas) g	Hibridación	Rendimiento prolongado kg/ha (kg/Ac)
TML 110-1440	40,6 (16)	9,2	1,15	70	87,2	148 (60)
sin portainjertos	81,3 (32)	15,1	1,69	71	85	121 (49)
	122,0 (48)	18,5	1,57	70	89	99 (40)
	6,0 (24)	13	1,35	70	83,7	138 (56)
	Autopolinizada de forma manual	4,2		85		
	Polinización cruzada de forma manual.	7,6		72		
Parental femenino, TML 110-1440 más portainjertos						
Shintoza	40,6 (16)	14,5	1,45		83	232 (94)
	81,3 (32)	30	2,5	67,95	88	242 (98)
	122,0 (48)	43	3,83	67,7	88	230 (93)
	6,0 (24)	15,9	2,32		95,7	170 (69)
	Autopolinizada de forma manual	N/A				
	Polinización cruzada de forma manual	6,4,8,2				
Shogun	40,6(16)	12,8	1,4	74	84	205 (83)
	81,3(32)	20,6	2,3	72	86	166 (67)
	122,0 (48)	N/A	N/A			
	6,0 (24)	N/A	N/A			
	Autopolinizada de forma manual	4,3, 7,8		76 y 80		
	Polinización cruzada de forma manual	20,9		72		
Charmtosa	40,6 (16)	16	1,7	72,05	83	257 (104)
	81,3 (32)	28,9	2,4	68	89	232 (94)
	122,0 (48)	29,3	3,2	72,1	87	155 (63)

(continuación)

Parental femenino, TML 110-1440 más portainjertos	Espaciado (cm (pulgadas))	g/planta	n.º de frutos/ planta	PMS (Peso de Mil Semillas) g	Hibridación	Rendimiento prolongado kg/ha (kg/Ac)
	6,0 (24)	19,6	2,25	65,55	83,5	210 (85)
	Autopolinizada de forma manual	N/A				
	Polinización cruzada de forma manual	8,4, 8,0				
FR Couple	40,6(16)	17,6	1,75		70,7	282 (114)
(TW 1)	81,3 (32)	23,2	2,53	73,5	85	185(75)
	122,0 (48)	32,6	3,3	73,2	82	175 (71)
	6,0 (24)	20,6	2,1	68,7	88,9	220 (89)
	Autopolinizada de forma manual	3,5				
	Polinización cruzada de forma manual	10,7, 8,8				
FR Strong	40,6 (16)	15,7	1,6	73,1	83,9	252 (102)
(TW 2)	81,3 (32)	25	2,3	74,15	80	200 (81)
	122,0 (48)	41,4	3,29	72,6	86	222 (90)
	6,0 (24)	21,5	2,38	67,75	83,3	230 (93)
	Autopolinizada de forma manual	N/A				
	Polinización cruzada de forma manual	12,8, 9,1				

Tal como se muestra en la Tabla 2, los parentales de semilla injertados en los portainjertos Shintoza, Shogun, Charmtoza, FR Couple y FR Strong produjeron un elevado número de frutos, producción de semillas, peso total de semillas e hibridación.

Ejemplo 3

El efecto del injerto sobre el número de semillas y la producción de semillas

Las líneas de sandía tetraploides TML110-1440, TML110-0064, TCS110-1009, y TCS110-1018 se cruzaron como líneas parentales de semillas con una línea donadora de polen diploide. Antes del cruzamiento, se injertaron los parentales de semilla tetraploides en el portainjertos interespecífico *Cucurbita maxima* x *Cucurbita moschata* (Shintoza) mediante injerto lateral. Las plantas donadoras de polen diploides no se injertaron.

Las plantas parentales de semillas tetraploides injertadas y no injertadas se trasplantaron el mismo día a un campo que estaba sometido a condiciones normales (sin estrés destacable) durante el cultivo. El donador de polen diploide WAS 110-6433 se plantó con las plantas parentales de semilla tetraploide. Las plantas se cultivaron hasta la

madurez teniendo lugar la polinización de las plantas tetraploides mediada por abejas. Los frutos se recolectaron en diferentes días considerando la madurez relativa para permitir el desarrollo completo de las partes de la semilla. Se extrajeron las semillas y se determinó el número de frutos, el peso total de semillas, el peso promedio de la semilla por fruto, el número total de semillas y el número promedio de semillas por fruto. Los resultados se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3 - Elevado peso de semillas y número de semillas por fruto que son resultado del injerto de parentales de semilla

Material experimental	Número de frutos	Peso de semilla total (g)	Peso promedio de semilla por fruto (g)	Recuento total de semillas	Número promedio de semillas por fruto
B64 NI	20	172,86	8,64	2.432	121
B64 I	19	182,59	9,61	2.825	148
1440 NI	27	324,17	12	4.078	151
1440 I	20	267,63	13,38	3.677	184
1009 NI	19	176,82	9,3	2.297	121
1009 I	15	121,02	8,07	1.854	124
1018 NI	24	191,32	7,97	2.521	105
1018 I	15	130,67	8,71	1.807	120
NI - No injertado; I - Injertado					

Tal como se muestra en la Tabla 3, los parentales de semilla injertados produjeron un mayor peso y número de semillas por fruto en relación con los parentales de semillas no injertados. Por ejemplo, el parental de semilla B64 injertado produjo 9,61 g de semillas por fruto, pero el B64 no injertado produjo solo 8,64 g de semillas por fruto. Asimismo, las plantas 1440 y 1018 injertadas produjeron más peso de semillas por fruto en relación con sus plantas no injertadas. El peso de las semillas para las plantas 1009 injertadas fue menor que las plantas no injertadas, posiblemente porque el rasgo que controla el número de semillas por planta se estaba segregando en esta línea y estaba desigualmente representado entre aquellas plantas seleccionadas para el injerto en relación con las de no injerto. Además, el parental de semilla B64 injertado produjo 148 semillas por fruto, mientras que el B64 no injertado produjo solo 121 semillas por fruto y cada una de las plantas 1440, 1009, 1018 injertadas produjeron más semillas por fruto en relación con sus plantas no injertadas.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de selección de semillas triploides de una población de semillas basándose en el espesor y/o en el peso de las semillas triploides, en el que dicha población de semillas se ha obtenido mediante:
 - (a) la obtención de una planta de sandía tetraploide, en la que la planta se ha injertado en un portainjerto que presenta tolerancia al estrés cuando hay condiciones de estrés;
 - (b) permitir la polinización de la planta de sandía tetraploide por una planta de sandía diploide; y
 - (c) permitir que la semilla triploide se forme en la planta de sandía tetraploide.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que
 - (i) la tolerancia al estrés comprende una tolerancia al estrés abiótico seleccionada de tolerancia al frío, tolerancia a altas temperaturas, tolerancia a la sequía y tolerancia a la sal; o
 - (ii) la tolerancia al estrés comprende una tolerancia al estrés biótico seleccionada de una resistencia a la enfermedad, una resistencia a insectos y una resistencia a nemátodos; o
 - (iii) la tolerancia al estrés comprende una tolerancia al estrés biótico seleccionada de resistencia a la enfermedad vírica, resistencia a la enfermedad bacteriana y resistencia a la enfermedad fúngica.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que
 - (i) el portainjertos es de una planta seleccionada de sandía, calabacín, calabaza, calabaza de cera y calabaza de botella; o
 - (ii) la planta de sandía diploide se injerta un portainjertos que presenta tolerancia al estrés cuando hay condiciones de estrés; o
 - (iii) la planta de sandía diploide no se ha injertado.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que
 - (i) la planta de sandía tetraploide se cultiva en ausencia de dichas condiciones de estrés; o
 - (ii) la planta de sandía tetraploide se cultiva en presencia de dichas condiciones de estrés.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que
 - (i) la selección se hace de forma manual; o
 - (ii) la selección es automática.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que
 - (i) la planta de sandía tetraploide se poliniza por un insecto; o
 - (ii) la planta de sandía tetraploide se poliniza manualmente.
7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el injerto se realiza mediante un procedimiento seleccionado de injerto de empalme, injerto de yema, injerto de hendidura, injerto lateral, injerto de aproximación e injerto de inserción en orificio.
8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que
 - (i) la semilla de sandía triploide formada en la etapa (c) presenta una morfología que es distinguible de la semilla tetraploide producida por el mismo parental; o
 - (ii) la planta de sandía tetraploide produce un mayor número de semillas por fruto y/o con un mayor grado de hibridación en relación con una planta de sandía del mismo genotipo que dicha planta de sandía tetraploide que no se ha injertado y se cultiva en las mismas condiciones que la planta de sandía tetraploide; o
 - (iii) la planta de sandía tetraploide se expone a al menos un primer estrés biótico y/o abiótico antes de la formación de semillas triploides.