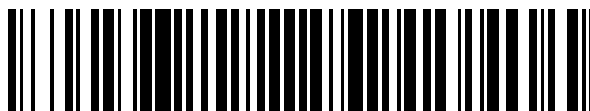


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 753 213**

51 Int. Cl.:

A01H 1/08 (2006.01)

A01H 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.09.2014 PCT/EP2014/070367**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.04.2015 WO15044199**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.09.2014 E 14772335 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019 EP 3048874**

54 Título: **Embriogénesis haploide**

30 Prioridad:

24.09.2013 WO PCT/EP2013/069851

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

07.04.2020

73 Titular/es:

**STICHTING WAGENINGEN RESEARCH (100.0%)
Droevendaalsesteeg 4
6708 PB Wageningen, NL**

72 Inventor/es:

**BOUTILIER, KIMBERLY;
ANGENENT, GERRIT CORNELIS;
SORIANO CASTAN, MERCEDES y
HUI, LI**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 753 213 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

Embriogénesis haploide

5 Campo técnico

La invención se refiere al campo del mejoramiento de plantas y en particular a la generación y obtención de plantas haploides o haploides dobles (DH). Más particularmente la invención se refiere a la inducción fisicoquímica de embriones haploides a partir de gametofitos de plantas y la conversión de estos embriones a plántulas.

10

Antecedentes

15

Muchas células vegetales tienen la capacidad inherente de regenerar un organismo completo a partir de células individuales o tejidos, proceso referido como totipotencia. Durante la reproducción sexual, la totipotencia celular se limita al cigoto, que se forma en la semilla a partir de la fusión del óvulo y los gametos masculinos tras la fertilización. La división sostenida del cigoto genera el embrión, que contiene el plan básico del cuerpo de la planta adulta. El establecimiento de grupos de células madre pluripotentes en el nicho de células madre del brote embrionario y los meristemos apicales de la raíz asegura el crecimiento y desarrollo postembrionario continuos de nuevos órganos laterales que es característico del desarrollo de la planta (véase Bennett, T., y Scheres, B. (2010) *Curr. Top. Dev. Biol.* 91: 67-102 y Besnard, F., y otros (2011) *Cell. Mol. Life Sci.* 68: 2885-2906).

20

El desarrollo embrionario también ocurre en ausencia de la fertilización del óvulo durante la apomixis, un tipo de desarrollo asexual de la semilla. La totipotencia en plantas apomícticas está restringida a las células gametofíticas y esporofíticas que normalmente contribuyen al desarrollo de la semilla y sus precursores, incluido el óvulo no fertilizado y los tejidos esporofíticos circundantes (véase Bicknell, R.A., y Koltunow, A.M. (2004) *Plant Cell* 16: S228-S245).

25

La totipotencia de las células vegetales alcanza su máxima expresión en cultivo de tejidos. La capacidad de una célula para experimentar embriogénesis *in vitro* es una característica inherente y adquirida que requiere la combinación correcta del explante y el ambiente de cultivo. Una amplia variedad de células tienen el potencial de desarrollarse en embriones, incluidas células gametofíticas haploides, como las células de polen y sacos embrionarios (véase Forster, B.P., y otros (2007) *Trends Plant Sci.* 12: 368-375 y Seguí-Simarro, J.M. (2010) *Bot. Rev.* 76: 377-404), así como células somáticas derivadas de las tres capas de tejido de la planta (Gaj, M.D. (2004) *Plant Growth Regul.* 43: 27-47 o Rose, R., y otros (2010) "Developmental biology of somatic embryogenesis" en: *Plant Developmental Biology-Biotechnological Perspectives*, Pua E-C y Davey MR, Eds. (Berlin Heidelberg: Springer), pp. 3-26).

30

Los tratamientos que se usan para inducir embriogénesis son diversos y varían desde la aplicación de reguladores exógenos del crecimiento hasta el estrés abiótico. En las condiciones adecuadas, el explante reanuda la división celular y produce embriones histodiferenciados, ya sea directamente del explante o indirectamente a partir de callos. Los cambios morfológicos y celulares que ocurren durante la embriogénesis *in vitro* se han descrito en algunas especies (Raghavan, V. (2004) *Am. J. Bot.* 91: 1743-1756; Seguí-Simarro, J.M., y Nuez, F. (2008) *Physiol. Plant.* 134: 1-12), pero todavía se conoce muy poco acerca de las etapas iniciales implicadas en la adquisición y expresión de la totipotencia en las células individuales, y muchas de las características diagnósticas asumidas de células embriogénicas cultivadas se están revisando a la luz de los estudios de imágenes en vivo (Daghma, D., y otros (2012) *J. Exp. Bot.* 63: 6017-6021; Tang, X., y otros (2013) *J. Exp. Bot.* 64: 215-228).

35

Se han realizado estudios moleculares para identificar los cambios que ocurren durante la embriogénesis *in vitro*, sin embargo la variedad de especies, explantes y condiciones de cultivo que se han usado, combinadas con el bajo porcentaje de células que forman embriones, han hecho difícil el desarrollo de un concepto unificado de la célula vegetal totipotente.

40

En *Arabidopsis*, se ha demostrado que la regulación dinámica de la expresión génica al nivel de la cromatina juega un papel fundamental en la traducción de las señales ambientales y del desarrollo que regulan la totipotencia de la célula vegetal *en la planta* (Zhang, H., & Ogas, J. (2009) *Mol. Plant* 2: 610-627).

45

La unidad estructural y funcional básica de la cromatina es el nucleosoma, que comprende ADN envuelto alrededor de un octámero de histona, e histonas ligadoras asociadas. Los nucleosomas pueden representar una barrera física al ADN para las proteínas que no son histonas debido a la fuerte interacción entre las histonas cargadas positivamente y el ADN cargado negativamente. La transcripción requiere la unión física de factores de transcripción para abrir el ADN, por lo tanto, el control de la compactación y accesibilidad de los loci a través de los nucleosomas ofrece un medio dinámico para controlar la expresión génica. Los cambios dinámicos en la estructura de la cromatina y la transcripción génica están mediados primariamente por los procesos relacionados de la remodelación de la cromatina y la modificación de histonas. Las proteínas de remodelación de la cromatina utilizan la energía a partir de la hidrólisis del ATP para la eliminación o reposición de nucleosomas, mientras que las enzimas modificadoras de histonas modifican químicamente las lisinas y otros aminoácidos en las colas de extremo N-terminal expuestas de las histonas para cambiar su carga e interacción con el ADN y otras proteínas.

50

55

60

65

En las plantas, un grupo de proteínas conservadas, modificadoras de la cromatina, aseguran la transición exitosa desde el desarrollo embrionario hasta el crecimiento postembrionario mediante la represión de vías que controlan la proliferación celular del embrión y la identidad durante la germinación. Los mutantes con pérdida de función de estas proteínas expresan ectópicamente genes de identidad embrionaria y producen embriones somáticos a partir de plántulas. Estas proteínas modificadoras de la cromatina incluyen miembros de la clase SWI/SNF y CHD de Arabidopsis de las ATPasas de remodelación de la cromatina (Ogas, J., y otros (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 13839-13844), miembros del Complejo Represivo 1 (PRC1) y 2 (PRC2) del Grupo Polycomb (PcG), que depositan marcadores represivos en las histonas, respectivamente, ubiquitinación de la lisina 119 de la histona 2A (H2AK119) y trimetilación de la lisina 27 de la histona 3 (H3K27) (véase Chanvittana, Y., y otros (2004) Development 131: 5263-5276; Schubert, D., y otros (2005) Curr. Opin. Plant Biol. 8: 553-561; Makarevich, G., y otros (2006) EMBO Rep. 7: 947-952; Chen, Z., y otros (2009) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106: 7257-7262; Bratzel, F., y otros (2010) Curr. Biol. 20: 1853-1859; Bouyer, D., y otros (2011) PLoS Genet. 7: e1002014; Tang, X., y otros (2012) J. Exp. Bot. 63: 1391-1404). El gran número de proteínas que juegan un papel en este proceso, combinado con la posible interrelación entre diferentes proteínas modificadoras de la cromatina (Zhang, H., y otros (2012) Plant Physiol. 159: 418-432) asegura un control dinámico a múltiples niveles sobre la totipotencia celular.

Los cambios en la organización y modificación de la cromatina se asocian frecuentemente con la regeneración de la planta *in vitro* (Miguel, C., & Marum, L. (2011) J. Exp. Bot. 62: 3713-3725, pero existen pocos ejemplos donde se conoce que los cambios en el nivel de la cromatina juegan un papel directo en este proceso (He, C., y otros (2012) PLoS Genet. 8: e1002911).

La embriogénesis haploide se describió inicialmente hace casi 50 años en *Datura stromonium* (Guha, S., y Maheshwari, S. (1964) Nature 204: 497. La capacidad de los embriones haploides para convertirse espontáneamente o después del tratamiento con agentes de duplicación cromosómica en plantas doblemente haploides se utiliza ampliamente como un medio para generar plantas homocigotas en una sola generación, y tiene numerosas aplicaciones en la mejora y descubrimiento de rasgos (Touraev, A., y otros (1997) Trends Plant Sci. 2: 297-302; Forster y otros (2007) *más arriba*). La producción de embriones haploides a partir de gametofitos masculinos inmaduros cultivados es una técnica de mejoramiento y propagación de plantas muy utilizada.

El gametofito masculino multicelular haploide de las plantas, el grano de polen, es una estructura diferenciada terminalmente cuya función termina en la fertilización. A diferencia del gametofito maduro, el gametofito inmaduro retiene su capacidad de crecimiento totipotente cuando se cultiva *in vitro*. Cuando se cultiva *in vitro* un gametofito inmaduro puede inducirse para que forme embriones haploides. Esta vía de formar embriones haploides se describió hace casi 50 años, pero es poco conocida a nivel mecanístico.

El desarrollo embrionario haploide (referido además como embriogénesis de microsporas, embriogénesis de polen o androgénesis) se induce mediante la exposición de las anteras o gametofitos aislados a estrés abiótico o químico durante el cultivo *in vitro* (véase Touraev, A., y otros (1997) Trends Plant Sci. 2: 297-302. Estos tratamientos con estrés inducen la división sostenida del gametofito que conduce a la formación de un embrión haploide histodiferenciado.

Brassica napus es uno de los modelos mejores estudiados para la embriogénesis de microsporas (véase Custers, J.B.M., y otros (2001) Current trends in the embryology of angiosperms. En: Androgenesis in Brassica, a model system to study the initiation of plant embryogenesis, S.S. Bhojwani y W.Y. Soh, eds (Dordrecht: Kluwer Academic Publishers), pp. 451-470). Un tratamiento de estrés por calor se usa para inducir embriogénesis de microsporas en esta y otras especies de *Brassica*. Solo un pequeño porcentaje de los gametofitos masculinos inmaduros tratados con estrés por calor se desarrollarán a embriones diferenciados, aunque la cantidad de células en división esporofítica puede ser inicialmente mucho mayor.

La embriogénesis derivada de microsporas es un proceso único en el cual el polen haploide e inmaduro (microsporas) es inducido por uno o más tratamientos con estrés para formar embriones en cultivo. Estos embriones derivados de microsporas (MDE) pueden germinar y convertirse en plantas homocigotas haploides dobles (DH) mediante agentes de duplicación cromosómica y/o a través de duplicación espontánea. La producción de DH es una herramienta fundamental en los programas de mejoramiento de plantas y descubrimiento de rasgos porque permite la producción de líneas homocigotas en una sola generación. Esta vía rápida a la homocigosis no solo reduce drásticamente el periodo de mejoramiento, sino que además desenmascara rasgos controlados por alelos recesivos. Los DH se usan ampliamente en la mejora de cultivos como progenitores para la producción de semillas híbridas F1, para facilitar la conversión de retrocruzamiento, para la mejora de mutaciones, y para generar poblaciones inmortales para estudios de mapeo molecular.

Los cambios morfológicos y celulares que ocurren durante la inducción y el desarrollo de embriones haploides se han descrito bien, sin embargo todavía se conoce muy poco acerca de los mecanismos subyacentes a este proceso. Se han realizado estudios moleculares para identificar los cambios que ocurren durante la inducción y el crecimiento de embriones haploides, sin embargo no se han identificado inequívocamente genes específicos o vías de señalización como factores causales.

Muchos años de estudios de biología celular en especies modelos como el tabaco, la cebada y *Brassica*, han establecido una base sólida para comprender los eventos celulares que acompañan la embriogénesis haploide, sin embargo no se conoce el mecanismo subyacente a este cambio en las vías de desarrollo (véase Soriano, M. y otros, (2013) *Plant Reprod.* 26: 181-196).

5 Li, W-Z. y otros (2001) *In vitro Cell. Est. Biol.-Plant* 37: 605-608 describen los efectos de los fármacos hipometiladores del ADN azacitidina y etionina sobre la androgénesis en la cebada (*Hordeum vulgare* L.).

10 Furuta, K., y otros (2011) *Plant Cell Physiol.* 52: 618-628 se titula "The CKH2/PKL chromatin remodelling factor negatively regulates cytokinin responses in *Arabidopsis calli*." El tema de este trabajo científico fueron dos mutantes aislados de *Arabidopsis thaliana*, *ckh1* (hipersensible a citocina 1) y *ckh2*. Estos mutantes son hipersensibles a citocina y producen callos verdes de crecimiento rápido (diploides) en respuesta a niveles más bajos de citocinas. Los autores buscaban un mecanismo detrás del reverdecimiento del callo inducible por citoquinina. Se descubrió que la tricostatina A (TSA) puede reemplazar parcialmente el regulador del crecimiento citoquinina en la formación de callos a partir de segmentos de hipocotilo, que generalmente requieren auxina y citoquinina. El material de partida y los callos analizados fueron todos diploides. Dichos callos diploides son organizados, arraigados y organogénicos.

20 La acetilación y la desacetilación del residuo de lisina en las proteínas histonas a menudo están involucradas en la modulación reversible de la estructura de la cromatina en eucariotas y pueden mediar la regulación positiva-negativa de la transcripción. La histona acetiltransferasa cataliza la acetilación de histonas. La histona desacetilasa (HDAC) cataliza la desacetilación de histonas. Hasta ahora, en la literatura científica se han sugerido una serie de funciones discrepantes y supuestas para las HDAC en plantas.

25 Por ejemplo, Tanaka M, y otros (2008) *Plant Physiol.* 146: 149-61 informa sobre efectos del inhibidor de HDAC tricostatina A (TSA) sobre la germinación de semillas en *Arabidopsis*. Normalmente, las semillas de *Arabidopsis* muestran aparición de radículas con expansión de cotiledones y reverdecimiento en aproximadamente 7 días después de la siembra. Por el contrario, después del tratamiento con TSA, la mayoría de las semillas de *Arabidopsis* muestran aparición de radículas, pero no expansión de cotiledones o reverdecimiento. Esto también se asocia con la expresión de factores específicos del embrión y la formación de estructuras similares a embriones. Se observó una detención del crecimiento posterior a la germinación, dependiente de la concentración de TSA, así como la formación de estructuras similares a embriones después de la germinación. Los autores sugieren un papel de la HDAC después de la germinación en la represión de las propiedades embrionarias existentes en *Arabidopsis*, pero sin indicar ningún mecanismo.

35 Aunque la producción de DH se utiliza ampliamente, a menudo hay uno o más cuellos de botella que deben superarse antes de que se pueda establecer un sistema de producción de DH eficiente para un cultivo o genotipo específico. Un cuello de botella importante es un nivel bajo de inducción de embriones haploides. Especies enteras a menudo son recalcitrantes, e incluso las especies sensibles muestran un fuerte componente genotípico para la producción de DH. En los genotipos que no responden, las microsporas no se dividen o se detienen temprano en su desarrollo. Un segundo cuello de botella es la baja tasa de germinación y conversión de embriones a plántulas, un fenómeno que se ha atribuido al pobre desarrollo de meristemas (Tahir, M y Stasolla, C (2006). *Can J Bot* 84:1650-1659).

45 Los inhibidores de histona desacetilasa (HDACi) tienen una larga historia y se han utilizado en psiquiatría y neurología como estabilizadores del estado de ánimo y antiépilépticos. Más recientemente se han investigado además en relación con posibles tratamientos para enfermedades inflamatorias y cánceres.

El documento WO 02/052926 de Northwest Plant Breeding Co describe el ácido 2-hidroxinicotínico (2-HNA) como un compuesto inductor esporofítico que genera con éxito plantas de maíz a partir de microsporas.

Descripción de la invención

50 Los inventores han descubierto que al utilizar un enfoque químico, el cambio a la embriogénesis haploide se controla por la actividad de las histona desacetilasas (HDAC). El bloqueo de al menos parte de la actividad de HDAC con un compuesto de ácido hidroxámico o un inhibidor tetrapeptídico cíclico de HDAC (HDACi) en gametofitos masculinos inmaduros cultivados conduce a un gran aumento en la proporción de células que cambian de polen al crecimiento embriogénico. Sin desear estar sujetos a ninguna teoría en particular, los inventores han descubierto que dicho HDACi utilizado en el cultivo de microsporas bloquea un programa de desarrollo existente y provoca el cambio a un nuevo programa.

60 Los inventores también descubrieron que el compuesto de ácido hidroxámico o inhibidores tetrapeptídicos cíclicos de HDAC indujeron embriogénesis y el crecimiento puede mejorar mediante, pero sin depender de, otros factores de estrés, tal como estrés por temperatura alta.

Los inventores también descubrieron que el compuesto de ácido hidroxámico o los inhibidores tetrapeptídicos cíclicos de HDAC pueden reemplazar el requisito de un tratamiento por estrés en cultivo de microsporas.

Los inventores han descubierto, además, que el gametofito masculino inmaduro de una especie recalcitrante para el desarrollo embrionario haploide en cultivo, también forma grupos de células embriónicas y/o embriones después del tratamiento con inhibidor de HDAC.

5 En consecuencia, la presente invención proporciona un método para producir un embrión de planta haploide que comprende cultivar o sembrar material vegetal haploide en presencia de un compuesto de ácido hidroxámico o un tetrapéptido cíclico que tiene actividad de inhibidor de histona desacetilasa (HDACi) y actividad de embriogénesis de microsporas.

10 El método puede comprender, además, convertir el embrión haploide en un vástago; opcionalmente que comprende, además, cultivar el vástago hasta una planta haploide.

15 La invención proporciona, además, un método para producir una planta haploide doble que comprende cultivar o sembrar material vegetal haploide en presencia de un compuesto de ácido hidroxámico o un tetrapéptido cíclico que tiene actividad de inhibidor de histona desacetilasa (HDACi) y actividad de embriogénesis de microsporas durante un periodo, estimular o permitir una duplicación cromosómica espontánea, y cultivar el material vegetal haploide doble hasta obtener un vástago, plántula o planta.

20 Después de la exposición al compuesto de ácido hidroxámico o tetrapéptido cíclico el material vegetal haploide se transfiere preferentemente a un medio de crecimiento libre del compuesto de ácido hidroxámico o tetrapéptido cíclico.

25 Cuando se estimula la duplicación cromosómica, esto es preferentemente mediante la exposición del material vegetal haploide a un agente de duplicación cromosómica; opcionalmente en donde el agente de duplicación cromosómica comprende un gas, solución o un sólido.

Antes de cultivar el material vegetal haploide con el compuesto de ácido hidroxámico, o tetrapéptido cíclico, el material vegetal puede someterse a un estrés físico; preferentemente en donde el estrés físico se selecciona de uno o más de temperatura, estrés osmótico o privación.

30 El material vegetal haploide de acuerdo con la invención puede ser un gametofito masculino inmaduro o una microspora.

El material vegetal de acuerdo con la invención puede cultivarse o sembrarse en presencia de más de un compuesto de ácido hidroxámico o tetrapéptido cíclico.

35 Los compuestos de ácido hidroxámico de acuerdo con la invención pueden seleccionarse de tricostatina A (TSA), ácido suberoilánilida hidroxámico (SAHA), análogo de amida M344 de TSA y análogos descritos en el documento US2011/0237832, ácido suberoil bis-hidroxámico (SBHA), vorinostat (ácido suberoilánilida hidroxámico (SAHA)), scriptaid (hidroxiamida del ácido 6-(1,3-dioxo-1H, 3H-benzo[de]isoquinolin-2-il)-hexanoico), rocilinstat (ACY-1215), belinostat (PXD101), dacinostat (LAQ824), droxinostat (CMH, 5809354), resminostat (RAS2410), panobinostat (LBH589), pracinostat (SB939), givinostat (ITF2357), quisinostat (JNJ-26481585) abexinostat (PCI-24781), oxamflatina (ácido (2E)-5-[3-(fenilsulfonilamino) fenil]-pent-2-en-4-inohidroxámico, bishidroxamida del ácido m-carboxicinnámico (CBHA), tubacina, tubastatina A HCl, CUDC 101 (7-[[4-(3-Etínifetilamino)-7-metoxiquinazolin-6-il]oxi]-N-hidroxiheptanamida), MC1568, PCI-34051, CUDC-907, AR-42 (OSU-HDAC42), APHA Compuesto 8 (3-(1-metil-4-fenilacetil-1H-2-pirrolil)-N-hidroxi-2-propenamida), CHR-2845, CHR-3996.

45 En aspectos preferidos de la invención, el compuesto de ácido hidroxámico se selecciona de tricostatina A (TSA), ácido suberoilánilida hidroxámico (SAHA), ácido suberoil bis-hidroxámico (SBHA), scriptaid (hidroxiamida del ácido 6-(1,3-dioxo-1H, 3H-benzo[de]isoquinolin-2-il)-hexanoico), oxamflatina (ácido (2E)-5-[3-(fenilsulfonilamino)fenil]-pent-2-en-4-inohidroxámico, tubacina, APHA Compuesto 8 (3-(1-metil-4-fenilacetil-1H-2-pirrolil)-N-hidroxi-2-propenamida).

50 Los tetrapéptidos cíclicos de acuerdo con la invención pueden seleccionarse de trapoxina, trapoxina B, trapoxina A (ciclo((S)-fenilalanil-(S)-fenilalanil-(R)-pipercolinil-(2S,9S)-2-amino-8-oxo-9,10-epoxidecanoil), compuestos tetrapeptídicos relacionados con trapoxina A que tienen el ácido aminoácido-2-amino-8oxo-9,10-epoxi-decanoico en sus moléculas, clamidocina, HC-toxina, Cyl-2, WF-3161.

55 En cualquiera de los métodos o usos de la invención, la planta puede ser una especie o variedad de un género seleccionado de *Brassica* o *Capsicum*.

60 En los métodos de la invención definidos anteriormente, cuando se compara con un material vegetal haploide cultivado sin el ácido hidroxámico o tetrapéptido cíclico, el material vegetal equivalente cultivado con ácido hidroxámico o tetrapéptido cíclico HDACi genera al menos 10 % más embriones haploides, plántulas haploides o plántulas haploides dobles.

65 La invención incluye además el uso de un compuesto de ácido hidroxámico que tiene actividad de inhibidor de histona desacetilasa (HDACi) y actividad de embriogénesis de microsporas en la producción de embriones de plantas, vástagos

o plantas haploides, o embriones, vástagos o plantas haploides dobles, al cultivar o sembrar material vegetal haploide en presencia del compuesto de ácido hidroxámico.

5 La invención incluye, además, el uso de un tetrapéptido cíclico que tiene actividad de inhibidor de histona desacetilasa (HDACi) y actividad de embriogénesis de microsporas en la producción de embriones de plantas, vástagos o plantas haploides, o embriones de plantas, vástagos o plantas haploides dobles, al cultivar o sembrar material vegetal haploide en presencia del tetrapéptido cíclico.

10 En determinadas modalidades, la embriogénesis haploide y la duplicación cromosómica pueden tener lugar prácticamente de manera simultánea. En otras modalidades, puede haber un retraso temporal entre la embriogénesis haploide y la duplicación cromosómica. El retraso temporal puede estar relacionado con la etapa de desarrollo alcanzada por el embrión, vástago o plántula haploides en crecimiento. Si el crecimiento de vástagos, plantas o plántulas haploides no involucra un evento de duplicación cromosómica espontánea, entonces se puede usar un agente químico duplicador de cromosomas de acuerdo con los procedimientos conocidos por un experto en la materia.

15 Surgen varias posibilidades, que incluyen exponer el material vegetal haploide a un compuesto de ácido hidroxámico o un tetrapéptido cíclico HDAC, como se define en la presente hasta que se alcanza una etapa en la que se forma al menos uno de: una masa globular multicelular haploide, un embrión globular, un embrión de torpedo, un embrión con cotiledón(es), luego cultivar el material vegetal haploide en adelante desde esa etapa en cultivo durante un período de tiempo para permitir una duplicación cromosómica espontánea y regenerar el material vegetal haploide doble posterior en cultivo para formar una plántula. Donde una microspora se expone al compuesto de ácido hidroxámico o un tetrapéptido cíclico HDAC, como se definió en la presente, entonces, una vez que puede identificarse una ruta de crecimiento esporofítico, por ejemplo a partir de una de las etapas de división simétrica, masa globular multicelular o embrión derivado de microsporas globulares (MDE), embrión en estado de corazón, embrión en estado torpedo y después embrión con cotiledón(es), entonces la exposición al compuesto de ácido hidroxámico o tetrapéptido cíclico puede detenerse y el crecimiento esporofítico o crecimiento embrionario pueden continuar en medio de crecimiento adecuado. El medio de crecimiento puede ser simplemente el mismo que el utilizado durante la exposición al compuesto de ácido hidroxámico o tetrapéptido cíclico, pero sin la presencia del compuesto de ácido hidroxámico o tetrapéptido cíclico.

20 Cada una de las etapas de división simétrica, masa globular multicelular se visualizan fácilmente en un microscopio por una persona experta en esta materia. Similarmente, una persona experta en esta materia visualiza fácilmente cada una de las etapas de embrión derivado de microsporas globulares (MDE), embrión en estado de corazón, embrión en estado torpedo y después embrión con cotiledón(es) en un microscopio de baja potencia.

25 Cuando una microspora se expone al compuesto de ácido hidroxámico o un tetrapéptido cíclico HDAC, como se definió en la presente, después puede formarse un callo y puede experimentar organogénesis para formar un embrión. Por lo tanto, la invención incluye un método para producir callos vegetales haploides, que comprende exponer material vegetal haploide al compuesto de ácido hidroxámico o un tetrapéptido cíclico HDAC, como se definió en la presente.

30 Sin desear estar atados a una teoría en particular, los inventores identifican dos vías esporofíticas posibles; una que produce embriones compactos que permanecen encerrados en la exina hasta aproximadamente los 5 a 7 días de cultivo. La otra produce células que emergen más temprano de la exina y muestran grados variables de conexión celular. Sin embargo, ambas vías expresan genes del programa embrionario. Por lo tanto, la invención incluye un método para producir una planta haploide que comprende exponer material vegetal haploide a un compuesto de ácido hidroxámico o un tetrapéptido cíclico HDAC, como se definió en la presente para formar un callo y regenerar una planta a partir del callo.

35 Sin desear estar atados por una teoría en particular, los inventores consideran que se forma un tipo diferente de callo después del tratamiento de las microsporas con el compuesto de ácido hidroxámico o un tetrapéptido cíclico HDAC, como se definió en la presente que el que se forma durante la organogénesis de brotes o raíces. Este tipo de callo no es de raíz y es embriogénico.

40 Como se describe en la presente, el término "planta" incluye un vástago. Una planta también puede ser una planta en cualquier etapa de crecimiento y desarrollo desde un vástago hasta una planta madura.

45 La planta y por lo tanto el gametofito vegetal pueden ser una angiosperma o una gimnosperma. Cuando es una angiosperma, entonces la planta puede ser monocotiledónea o dicotiledónea.

50 La exposición del material vegetal al compuesto de ácido hidroxámico o un tetrapéptido cíclico HDAC, como se definió en la presente preferentemente se lleva a cabo durante un periodo de tiempo suficiente para inducir la formación de embriones haploides. Cuando el material haploide inicial es una microspora, este periodo de tiempo puede determinarse por la etapa de desarrollo alcanzada, por ejemplo división simétrica, masa globular multicelular o embrión derivado de microsporas globulares (MDE), embrión en estado de corazón, embrión en estado torpedo y después embrión con cotiledón(es). La etapa alcanzada y, por lo tanto, el periodo de tiempo necesario puede depender de la especie de planta en cuestión y todo esto puede ser comprobado fácilmente por una persona experta en la técnica.

65

- 5 Cuando las microsporas y las etapas posteriores de desarrollo esporofítico se exponen a un HDACi de acuerdo con los métodos de la invención, después esto puede ocurrir durante un periodo de tiempo medido en horas. Por ejemplo, un número de horas en el intervalo de 1 - 24, o 2 - 24, o 3 - 24, o 4 - 24, o 5 - 24, o 6 - 24, o 7 - 24, u 8 - 24, o 9 - 24, o 10 - 24, u 11 - 24, o 12 - 24, o 13 - 24, o 14 - 24, o 15 - 24, o 16 - 24, o 17 - 24, o 18 - 24, o 19 - 24, o 20 - 24, o 21 - 24, o 22 - 24, o 23 - 24 horas. Alternativamente, un número de horas en el intervalo de 1 - 23, o 1 - 22, o 1 - 21, o 1 - 20, o 1 - 19, o 1 - 18, o 1 - 17, o 1 - 16, o 1 - 15, o 1 - 14, o 1 - 13, o 1 - 12, o 1 - 11, o 1 - 10, o 1 - 9, o 1 - 8, o 1 - 7, o 1 - 6, o 1 - 5, o 1 - 4, o 1 - 3, o 1 - 2 horas. Un intervalo preferido de exposición al HDACi es de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 horas; con mayor preferencia de aproximadamente 2 a aproximadamente 20 horas.
- 10 El periodo de exposición con el compuesto de ácido hidroxámico o un tetrapéptido cíclico HDAC, como se definió en la presente puede medirse en términos de días. Aunque una duración de más de aproximadamente un día no necesariamente resulta en mayor frecuencia de formación de embriones haploides, la cantidad de días puede estar en el intervalo de aproximadamente 1 día a aproximadamente 2 días, aproximadamente 1 día a aproximadamente 3 días, de aproximadamente 1 día a aproximadamente 4 días. Si se desea puede usarse una cantidad de días mayor que 4.
- 15 Una vez que los embriones haploides se forman y pueden observarse, en cualquier etapa deseada, entonces el embrión puede transferirse a un medio de crecimiento libre del compuesto de ácido hidroxámico o un tetrapéptido cíclico HDAC, como se definió en la presente. El medio de crecimiento puede ser un medio líquido o uno sólido. El medio de crecimiento contendrá todos los compuestos y factores necesarios para el mantenimiento y/o crecimiento adicional del embrión haploide. Generalmente, el medio de crecimiento puede basarse en medios de cultivo estándar que se usan para embriones diploides o para embriones haploides producidos/derivados de semillas o cultivo de tejidos, sujetos a una modificación/optimización de componentes para las especies vegetales particulares en cuestión. La modificación de la composición de los medios de cultivo es un tema que se incluye en la habilidad de una persona experta en la técnica.
- 20 La exposición del material vegetal haploide al compuesto de ácido hidroxámico o un tetrapéptido cíclico HDAC, como se definió en la presente puede ser a un solo compuesto o una mezcla de compuestos. Pueden usarse uno o más compuestos diferentes en combinación, ya sea simultánea, separada o secuencialmente.
- 25 Cuando se mantienen o cultivan embriones haploides de cualquier etapa, puede ocurrir una duplicación espontánea de los cromosomas, lo que conduce a la producción de un vástago haploide doble. La duplicación espontánea puede ocurrir por medio de una variedad de mecanismos.
- 30 A menudo, se puede producir un embrión haploide doble y una plántula resultante a partir de una microspora u otras etapas y/o células del gametofito usando un agente de duplicación cromosómica; opcionalmente en donde el agente de duplicación cromosómica está comprendido en un gas, solución o un sólido y la microspora, la etapa de microspora esporofítica, el embrión haploide, el callo haploide o la estructura se exponen durante un período al agente de duplicación de cromosomas. El agente de duplicación se puede usar en cualquier momento desde la embriogénesis en adelante, hasta la etapa de meiosis. Por tanto, los agentes de duplicación pueden usarse en partes completas de las plantas, como brotes o capullos, por ejemplo.
- 35 En algunas modalidades de la invención, un compuesto de ácido hidroxámico o un tetrapéptido cíclico HDAC, como se definió en la presente y un agente de duplicación cromosómica pueden estar presentes juntos cuando el material vegetal se expone a ellos. El tiempo y el protocolo específicos para duplicar los cromosomas en el material haploide de cada especie es algo que el experto en la técnica puede determinar fácilmente por prueba y error.
- 40 En determinados aspectos de la invención, se aplica un estrés físico al material vegetal haploide antes de su exposición al compuesto de ácido hidroxámico o un tetrapéptido cíclico HDAC, como se definió en la presente. El estrés físico puede ser cualquiera de temperatura, oscuridad, luz o radiación ionizante, por ejemplo. La luz puede ser luz solar de espectro completo, o una o más frecuencias seleccionadas del espectro visible, infrarrojo o ultravioleta. Se pueden usar uno o más factores de estrés físico o combinaciones de estrés antes de la exposición al compuesto de ácido hidroxámico o un tetrapéptido cíclico HDAC, como se definió en la presente. Los factores de estrés pueden ser continuos o discontinuos (periódicos); regulares o al azar en el tiempo. Cuando los factores de estrés se combinan en el tiempo pueden ser simultáneos (coincidentes o parcialmente superpuestos) o separados.
- 45 En métodos preferidos de la invención el estrés físico anterior se elimina antes de la exposición al compuesto de ácido hidroxámico o un tetrapéptido cíclico HDAC, como se definió en la presente.
- 50 En otros métodos de la invención el estrés físico puede continuar durante el tratamiento con el compuesto de ácido hidroxámico o un tetrapéptido cíclico HDAC, como se definió en la presente. Véase por ejemplo, el ejemplo 4 donde el cultivo de microsporas de *B. napus* se somete un tratamiento con HDACi simultáneamente con estrés por calor (véanse las figuras 4 A - C); y también sin estrés por calor (figuras 4 D - F).
- 55 El estrés físico puede ser calor, pero puede usarse cualquier otro tratamiento por estrés tal como privación o estrés osmótico (por ejemplo manitol). Otros tratamientos con estrés incluyen n-butanol o etanol. Una combinación de tratamientos con estrés pueden usarse ya sea separada o simultáneamente y en caso de ser separadamente entonces opcionalmente puede ser de manera secuencial. Por ejemplo cuando se usa un tratamiento con calor puede ser una
- 60
- 65

temperatura en el intervalo de 20 °C - 43 °C; posiblemente en el intervalo de 21 °C - 34 °C. En dependencia de las especies de plantas seleccionadas, el tratamiento con calor anterior puede ser a 20 °C, 21 °C, 22 °C, 23 °C, 24 °C, 25 °C, 26 °C, 27 °C, 28 °C, 29 °C, 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C, 37 °C, 38 °C, 39 °C, 40 °C, 41 °C, 42 °C, o 43 °C durante un periodo de tiempo.

Para cualquier tratamiento por un estrés determinado, el periodo de tiempo puede ser de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 5 días, o un periodo de tiempo seleccionado de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 4 días, de aproximadamente 20 minutos a aproximadamente 3 días, de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 2 días, de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 1 día, o de aproximadamente 2 horas a 12 horas.

Después de una primera exposición del material vegetal al compuesto de ácido hidroxámico o un tetrapéptido cíclico HDAC, como se definió en la presente, pueden añadirse una o más dosis adicionales en el tiempo. Pueden usarse una o más dosis adicionales para superar cualquier carencia de estabilidad o pérdida de eficacia del compuesto de ácido hidroxámico o del tetrapéptido cíclico HDAC, como se definió en la presente. Dichos compuestos pueden tener actividad de HDACi durante unas pocas horas, (véase "Kinetic analysis of histone acetylation turnover and Trichostatin A induced hyper- and hypoacetylation in alfalfa"; Waterborg, JH y Kapros, T. (2002) Biochem. Cell. Biol. 80: 279-293). Cualquiera de estas dosis adicionales puede o no implicar un tratamiento por estrés, y cualquier tratamiento por estrés puede realizarse separada o simultáneamente con una o más dosis adicionales de compuesto de ácido hidroxámico o un tetrapéptido cíclico HDAC, como se definió en la presente.

El material vegetal haploide que se va a someter a los métodos y usos de la invención es preferentemente un gametofito; preferentemente un gametofito masculino inmaduro (es decir, microsporas, o células vegetativas, generativas o espermáticas del grano de polen). El material del gametofito masculino puede estar comprendido en una antera y la antera se somete a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente de la invención.

La invención como se describe en la presente también se puede aplicar a un gametofito femenino inmaduro o maduro (es decir la megaspora y sus derivados, incluidos el óvulo, los núcleos polares, la célula central, las sinérgidas, las antípodas). El material del gametofito femenino puede estar comprendido en un óvulo y el óvulo se somete a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente de la invención.

Como se describe en la presente, un compuesto "inhibidor de histona desacetilasa" (HDACi) puede interactuar con una histona desacetilasa e inhibir su actividad enzimática, lo que reduce así la capacidad de una histona desacetilasa para eliminar un grupo acetilo de una histona. En algunas modalidades preferidas, esta reducción de la actividad de histona desacetilasa es al menos aproximadamente 50 %, con mayor preferencia al menos aproximadamente 75 %, y todavía con mayor preferencia al menos aproximadamente 90 %. En otras modalidades preferidas, la actividad de histona desacetilasa se reduce en al menos 95 % y con mayor preferencia en al menos 99 %.

Los compuestos adecuados de ácido hidroxámico y tetrapéptido cíclico para usar de acuerdo con cualquiera de los métodos mencionados anteriormente y usos de la invención en todos sus aspectos se conocen bien y generalmente están disponibles de fuentes comerciales.

En aspectos preferidos, el método y usos de la invención emplean un HDACi que es tricostatina A (TSA).

En determinados métodos y usos preferidos, el HDACi es ácido suberoilánilida hidroxámico (SAHA) y este ventajosamente mejora la conversión (es decir, la "germinación") de embriones haploides o embriones haploides dobles a plántulas.

Los métodos de la invención son particularmente adecuados para lograr una embriogénesis haploide mejorada que los métodos que solo implican estrés físico. Por ejemplo, sujeto a la especie en cuestión, cuando las microsporas se someten a un método de la invención y se comparan con un control en el que no hay compuesto de ácido hidroxámico o un tetrapéptido cíclico HDAC, como se define en la presente descripción, se forman al menos 10 % más de embriones haploides. En determinadas especies esto puede ser al menos 25 % más, al menos 50 % más, al menos 75 % más, al menos 100 % más, o al menos 200 % más. En algunas especies la cantidad de embriones haploides puede ser más de 25 % más, más de 50 % más, más de 75 % más, más de 100 % más o más de 200 % más. Las plantas donde el aumento de la formación de embriones haploides es de particular beneficio son sistemas modelo de colza (*Brassica napus*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), cebada (*Hordeum vulgare*) y trigo (*Triticum aestivum*).

Los métodos de la invención también son particularmente adecuados para producir embriones haploides donde esto no ha sido posible hasta el momento, ni científica ni comercialmente. Los métodos de la invención pueden aplicarse particularmente a estas especies recalcitrantes previamente tal como una especie o variedad de un género seleccionado de *Arabidopsis*, por ejemplo *A. thaliana*, o *Solanum*, por ejemplo *S. esculentum*.

La invención incluye además un compuesto de ácido hidroxámico o un tetrapéptido cíclico HDAC, según se define en la presente como se describió anteriormente, para usar en la embriogénesis de plantas haploides; es decir que genera embriones haploides a partir de material vegetal haploide al exponer el material vegetal haploide a un compuesto de ácido hidroxámico o un tetrapéptido cíclico HDAC, como se definió en la presente y/o cultivar el material vegetal haploide en presencia de un compuesto de ácido hidroxámico o un tetrapéptido cíclico HDAC, como se definió en la presente.

Además, la invención incluye el uso de un compuesto de ácido hidroxámico o un tetrapéptido cíclico HDAC, como se definió en la presente para producir material vegetal haploide doble; particularmente plántulas que son después cultivadas para formar plántulas o plantas. Dicho material vegetal haploide doble se genera en parte como resultado de un material vegetal haploide que experimenta un evento embriogénico debido a la exposición y/o el crecimiento en presencia de un compuesto de ácido hidroxámico o un tetrapéptido cíclico HDAC, como se definió en la presente.

La invención proporciona, además, un kit para llevar a cabo un método de embriogénesis haploide en plantas que comprende un primer receptor que incluye un compuesto de ácido hidroxámico o un tetrapéptido cíclico HDAC, como se definió en la presente y un segundo receptor que incluye un agente de duplicación cromosómica. Estos kits pueden incluir un conjunto de instrucciones para usar el compuesto de ácido hidroxámico o un tetrapéptido cíclico HDAC, como se definió en la presente y agentes de duplicación cromosómica. Cualquiera del compuesto de ácido hidroxámico o un tetrapéptido cíclico HDAC o ambos, como se definió en la presente y agentes de duplicación pueden estar en una forma concentrada y requieren dilución antes de usar. El kit puede comprender, además, soluciones para la dilución del compuesto de ácido hidroxámico o un tetrapéptido cíclico HDAC, como se definió en la presente y/o soluciones de reserva del agente de duplicación que proporciona el kit. El compuesto de ácido hidroxámico o un tetrapéptido cíclico HDAC, como se definió en la presente y/o los agentes de duplicación pueden proporcionarse en forma seca y pueden proporcionarse soluciones en el kit para preparar soluciones. El kit puede diseñarse para usar con un material particular de especie vegetal e incluir instrucciones específicas.

La invención se describirá ahora con más detalle a manera de ejemplo y con referencia a los dibujos en los cuales:

Breve descripción de las figuras

La figura 1 es un gráfico de barras de resultados que muestra el efecto de la duración del tratamiento de TSA sobre la división celular esporofítica (sin. embriogénica) en cultivo de microsporas DH 12075 de *B. napus*.

La figura 2, paneles A – F, son microfotografías de estructuras gametofíticas (A-C) y esporofíticas de cultivo de microsporas de *B. napus*, como se describe en el ejemplo 1. Los paneles G y H son gráficos de barras de datos que muestran el porcentaje de diferentes tipos celulares observados en el control (G) y en cultivos tratados con TSA (H) en diferentes tiempos, también como se describe en el ejemplo 1.

La figura 3, panel A, es un gráfico de barras que muestra el efecto de la TSA sobre el crecimiento esporofítico en cultivo de microsporas de *B. napus* como se describe en el ejemplo 2. Los paneles B - G son microfotografías de estructuras esporofíticas de tipo I-IV después de cinco (B-E) y 15 (F-G) días de cultivo, como se describe en el ejemplo

La figura 4 muestra una serie de gráficos de barras (A - H) con datos que muestran el efecto de la TSA y la temperatura de cultivo sobre la división celular y la formación de embriones en cultivo de microsporas de *B. napus*, como se describe en el ejemplo 2.

La figura 5 muestra microfotografías de reporteros de GFP expresados en embriones en cultivo de microsporas de *B. napus*, como se describe en el ejemplo 3.

La figura 6 muestra microfotografías de cultivos de anteras de cinco días, como se describe en el ejemplo 4.

La figura 7 muestra gráficos de barras (A, D) y microfotografías (B, C) que muestran el comportamiento de los mutantes *hda* y *rbr* en un cultivo de anteras de *Arabidopsis*, como se describe en el ejemplo 5.

La figura 8 es una fotografía de transferencias Western como se describe en el ejemplo 6.

La figura 9 muestra datos de los efectos de diversos HDACi sobre la división celular esporofítica en cultivos de microsporas de *B. napus* DH 12075; a tres concentraciones diferentes en comparación con un control con DMSO.

La figura 10 muestra datos de los efectos de HDACi sobre el rendimiento de embriones en cultivos de microsporas de *B. napus* DH 12075.

La figura 11 muestra datos que demuestran cómo el HDACi mejora la calidad de embriones en etapas posteriores de polen donante.

La figura 12 muestra datos que demuestran cómo los embriones tratados con HDACi pueden convertirse fácilmente en plántulas.

La figura 13 muestra datos que ejemplifican cómo el genotipo influye en el grado de embriogénesis potenciada por TSA en *Brassica rapa*.

La figura 14 consiste en microfotografías que muestran el efecto del desarrollo embrionario de cultivos de microsporas tratados con TSA (ii) y control (i) en un genotipo recalcitrante (no sensible) del grupo de *Gongyloides* de *Brassica oleracea* (colinabo), (iii) es una ampliación de un embrión grande a los 18 días.

5 La figura 15 muestra datos sobre el porcentaje de microsporas embriogénicas en cultivos de microsporas de *Capsicum annuum* control y tratados con TSA de 10 días.

La figura 16 muestra datos de la cantidad de embriones obtenidos por cada brote usado en cultivos de microsporas de *Capsicum annuum* control y tratados con TSA, de 45 días.

10

Descripción detallada

15 Los inventores han encontrado que la inhibición química de la actividad de HDAC mediante el uso de tricostatina A (TSA) induce una proliferación celular masiva en el gametofito masculino inmaduro de *Brassica napus*, incluso en ausencia del tratamiento con estrés por calor que se usa normalmente para inducir embriogénesis haploide. Con el uso de marcadores del destino celular, los inventores han demostrado que las estructuras multicelulares que se desarrollan después del tratamiento de TSA son embriogénicas, pero que la mayoría de estas estructuras no forman embriones histodiferenciados. No obstante, puede obtenerse un mayor rendimiento de embriones después de un tratamiento con TSA en comparación con los controles no tratados. El tratamiento con TSA se asocia con aumento de la acetilación de histonas H3 y H4. El análisis de transcriptoma sugiere que la activación de las vías de expresión génica del embrión y del ciclo celular, de señalización de auxina y de movilización de la pared celular contribuye a los fenotipos observados.

20

25 Con el uso de un enfoque químico, los inventores han encontrado que el cambio a la embriogénesis haploide está controlado por la actividad de histona desacetilasas (HDAC). El bloqueo de la actividad de HDAC con inhibidores de HDAC, por ejemplo TSA, en gametofitos masculinos de *Brassica napus*, *B. rapa*, *Arabidopsis thaliana* y *Capsicum annuum* conduce a un gran aumento en la proporción de células que experimentan crecimiento embriogénico. En *B. napus*, el tratamiento con un HDACi específico (SAHA) mejora la conversión (es decir la germinación) de estos embriones en plántulas.

30

35 El descubrimiento de los inventores de la utilidad de los inhibidores de HDAC para la embriogénesis haploide puede usarse para producir y propagar nuevas variedades vegetales, pero no se incorporará directamente como rasgos *per se* en las plantas. Para variedades vegetales en las que la producción de DH es posible, pero ineficiente, la invención aumentará significativamente la eficiencia y disminuirá el costo de producción de DH, pero no tendrá un impacto importante sobre el costo de mejoramiento de plantas nuevas. El principal valor que estos cultivos deben obtener radica en el aumento del número de nuevas líneas DH o cruces de un programa de mejoramiento que se puede generar. Todas las especies analizadas hasta ahora reaccionan de la misma manera y, por lo tanto, la presente invención también puede aplicarse genéricamente, incluidas aquellas especies o variedades de plantas en las que aún no se ha logrado la producción de DH. Ventajosamente, esto evita tener que desarrollar enfoques personalizados para cada cultivo/variedad.

40

45 Los inventores han demostrado que la inhibición de la desacetilación de histonas es suficiente para inducir el desarrollo embrionario haploide en polen cultivado de *B. napus*, *B. rapa*, *B. oleracea*, *C. annuum* y *Arabidopsis*. Muchos factores estresantes diferentes pueden usarse para inducir embriogénesis haploide. Con respecto a esto, la desregulación de HDAC por estrés y los cambios acompañantes en el estado de acetilación de histonas proporciona un solo punto de regulación común para la inducción de embriogénesis haploide.

50

55 La etapa de desarrollo de la célula vegetativa juega un papel fundamental en su capacidad de respuesta al estrés y a la TSA. En la mayoría de las especies, el tratamiento por estrés es más eficaz para desencadenar una división celular sostenida en cultivo poco antes de o después de la PM I (Touraev y otros (1997) *más arriba*). La división esporofítica de las microsporas de *B. napus* tratadas con estrés por calor puede inducirse cuando están en la fase G1 a G2 del ciclo celular, mientras la célula vegetativa del polen binucleado es sensible, aunque a una frecuencia mucho menor, en G1 (Binarova, P., y otros (1993) *Theor. Appl. Genet.* 87: 9-16). Durante el desarrollo normal del polen la célula vegetativa no se divide después de PM I y se asume que se detiene en G1 (G0). Esta etapa de desarrollo del polen es mucho menos sensible para la inducción de embriones haploides. A diferencia del estrés por calor solo, la TSA, sola o en combinación con estrés por calor, es muy eficaz en esta etapa tardía de desarrollo del polen, y tiene un efecto mucho más fuerte que el estrés por calor solo con respecto a la proporción de células que se dividen esporofíticamente. La TSA es un inductor más potente del crecimiento esporofítico debido a su capacidad para inhibir más completamente las HDAC individuales o para inhibir una mayor variedad de HDAC que el estrés por calor solo. Los inventores han encontrado que una concentración relativamente alta de TSA en combinación con estrés por calor aumenta las divisiones que resultan principalmente en estructuras embriogénicas desorganizadas, mientras que una concentración relativamente baja de TSA en combinación con estrés por calor imita más cercanamente el efecto del estrés por calor solo porque se incrementa la formación de embriones histodiferenciados y estructuras embriogénicas desorganizadas no viables.

60

65 El cultivo a temperaturas más bajas amortigua el efecto de la TSA, de manera que se divide una menor cantidad de células, y se necesita una mayor concentración de TSA para inducir la formación de células embriogénicas y embriones que a 33 °C. En línea con esta observación, en *B. napus* se necesita un estrés por calor más severo de 41 °C para inducir divisiones esporofíticas y embriogénesis en la etapa bicelular tardía (Binarova, P., y otros (1997) *Sex. Plant Reprod.* 10:

200-208). Las HDAC (directa o indirectamente) median la inhibición de la progresión del ciclo celular que se impone gradualmente en la célula vegetativa, y esa liberación de la inhibición es necesaria para el crecimiento embriogénico en cultivo.

5 La invención proporciona herramientas que pueden ser aplicadas inmediata y fácilmente por los fitomejoradores de una manera libre de GMO. La capacidad de usar compuestos pequeños para mejorar las respuestas de los cultivos de tejidos elimina la necesidad de crear y comercializar plantas transgénicas, lo que permite una innovación rápida y rentable. Esto es importante en el sector alimentario, donde los consumidores dudan sobre el consumo de productos transgénicos. Un enfoque no transgénico también es importante cuando las empresas tienen cultivos/variedades con una pequeña participación en el mercado, por lo que los costos involucrados en el desarrollo y comercialización de plantas transgénicas son prohibitivos.

15 Una manera de determinar si un compuesto es un HDACi para su uso de acuerdo con cualquiera de los aspectos o modalidades de la invención es mediante el uso de ensayos enzimáticos estándar derivados de la medición de la capacidad de un agente para inhibir la conversión catalítica de una sustancia por la proteína objetivo. De esta manera, pueden identificarse inhibidores de la actividad enzimática de proteínas histona desacetilasas (véase Yoshida, y otros, J. Biol Chem. 265: 17174-17179 (1990)).

20 Más particularmente, un HDACi para su uso de acuerdo con cualquiera de los aspectos o modalidades de la invención descrita en la presente incluye: tricostatina A (TSA) y compuestos relacionados con TSA, tales como M344, que es un análogo amida de la TSA y análogos descritos en el documento US2011/0237832.

25 Los compuestos HDACi para estimular la embriogénesis haploide de acuerdo con la invención incluyen: ácido suberoil *bis*-hidroxámico (SBHA), vorinostat (ácido suberoilánilida hidroxámico (SAHA)); Scriptaid (hidroxiamida del ácido 6-(1,3-dioxo-1 H, 3H-benzo[de]isoquinolin-2-il)-hexanoico) (véase el documento US 6,544,957).

30 También, rocilinoestat (ACY-1215); belinostat (PXD101); dacinostat (LAQ824); droxinostat (CMH, 5809354); resminostat (RAS2410); panobinostat (LBH589); pracinostat (SB939); givinostat (ITF2357); quisinostat (JNJ-26481585); abexinostat (PCI-24781).

35 Adicionalmente, trapoxina; específicamente trapoxina A (ciclo((S)-fenilalanil-(S)-fenilalanil-(R)-pipercolinil-(2S,9S)-2-amino-8-oxo-9,10-epoxidecanoil) y compuestos de tetrapéptidos cíclicos relacionados con trapoxina A que tienen el ácido aminoácido-2-amino-8oxo-9,10-epoxi-decanoico en sus moléculas, por ejemplo clamidocina (Closse, y otros, Helv. Chim. Acta 57: 533-545 (1974)), HC-toxina (Liesch, y otros, Tetrahedron 38: 45-48 (1982)); Cyl-2; y WF-3161 (Umehara, K. J. Antibiot 36: 478-483 (1983). Puede usarse trapoxina B.

40 Los siguientes compuestos HDACi también son adecuados para usar de acuerdo con la invención: oxamflatina (ácido (2E)-5-[3-(fenilsulfonilamino)fenil]-pent-2-en-4-inohidroxámico); compuestos polares híbridos (HPC), tal como ácido suberoilánilida hidroxámico (SAHA) y ácido *m*-carboxicinnámico bishidroxamida (CBHA); tubacina; tubastatina A HCl; CUDC 101 (7-[[4-(3-etinilfenilamino)-7-metoxiquinazolin-6-il]oxil]-N-hidroxihexanamida); (bencil (S)-[1 -(4-metil-2-oxo-2H-cromen-7-ilcarbamoil)-5-propionilaminopentil]carbamato); MC1568; PCI-34051; CUDC-907; AR-42 (OSU-HDAC42); APHA Compuesto 8 (3-(1-metil-4-fenilacetil-1H-2-pirrolil)-N-hidroxi-2-propenamida); CHR-2845; CHR-3996.

45 Mientras el intervalo de concentración del HDACi que se usa variará y dependerá del inhibidor específico. El intervalo de concentración puede ser, por lo tanto, de aproximadamente 0.001 nM a aproximadamente 100 mM; preferentemente un intervalo seleccionado de uno de los siguientes: de aproximadamente 0.01 nM a aproximadamente 50 mM; de aproximadamente 0.05 nM a aproximadamente 10 mM; de aproximadamente 0.1 nM a aproximadamente 5 mM; de aproximadamente 0.5 nM a aproximadamente 1 mM; de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 500 μM; de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 250 μM; de aproximadamente 10 nM a aproximadamente 100 μM; de aproximadamente 25 nM a aproximadamente 50 μM.

50 Cuando se necesita duplicación cromosómica artificial de acuerdo con aspectos y modalidades de la invención, se enseñan métodos adecuados en Antoine-Michard, S. y otros, (1997) Plant Cell, Tissue Organ Cult., Dordrecht, Países Bajos, Kluwer Academic Publishers, 48(3): 203-207; Kato, A., Maize Genetics Cooperation Newsletter (1997) 36-37; y Wan, Y. y otros, TAG (1989) 77: 889-892; y Wan, Y. y otros, TAG (1991) 81: 205-211. Otra guía técnica para la duplicación cromosómica se proporciona en Seguí-Simarro J. M., y Nuez F. (2008) Cytogenet. Genome Res. 120: 358 - 369. Muchos procedimientos implican el contacto de las células vegetales con colchicina, agentes anti-microtúbulos o herbicidas anti-microtúbulos tales como pronamida, óxido nitroso, o cualquier inhibidor mitótico. El resultado es células haploides dobles homocigotas.

60 Cuando se usa colchicina, la concentración en el medio puede ser generalmente 0.01 %-0.2 % o aproximadamente 0.05 % o APM (5-225 μM). El intervalo de la concentración de colchicina puede ser de aproximadamente 400 - 600 mg/l o aproximadamente 500 mg/l.

Cuando se usa pronamida la concentración del medio puede ser aproximadamente 0.5-20 µM. Más adelante se mencionan ejemplos de inhibidores mitóticos conocidos. Otros agentes tales como DMSO, adyuvantes o tensoactivos pueden usarse con los inhibidores mitóticos para mejorar la eficiencia de la duplicación.

5 Los nombres comunes o comerciales de los agentes de duplicación cromosómica adecuados incluyen: colchicina, derivados del ácido acetiltrimetilcolchicínico, carbetamida, cloroprotham, protham, pronamida/propizamida tebutam, clortal dimetilo (DCPA), Dicamba/dianat/disugran (dicamba-metil) (BANVEL, CLARITY), benfluralina/benefina/(BALAN), butralina, cloralina, dinitramina, etalfuralina (Sonalan), flucloralina, isopropalina, metalpropalina, nitalina, orizalina (SURFLAN), pendimetalina, (PROWL), prodiamina, profluralina, trifluralina (TREFLAN, TRIFIC, TRILLIN), AMP (Amiprofos metil); amiprofos-metil Butamifos, Dithiopyr y Thiazopyr.

10 El agente de duplicación cromosómica puede ponerse en contacto con un embrión haploide varias veces. Si el embrión se aísla el agente de duplicación puede entrar en contacto inmediatamente después del aislamiento. La duración del contacto con el agente de duplicación cromosómica puede variar. El contacto puede ser desde menos de 24 horas, por ejemplo 4-12 horas, a aproximadamente una semana. La duración del contacto es generalmente de aproximadamente 24 horas a 2 días.

La invención es aplicable a cualquier especie vegetal de angiosperma, ya sea monocotiledónea o dicotiledónea.

20 Preferentemente, las plantas que pueden someterse a los métodos y usos de la presente invención son plantas de cultivo tales como cereales y legumbres, maíz, trigo, papa, tapioca, arroz, sorgo, mijo, yuca, cebada, guisantes y otros cultivos de raíces, tubérculos o semillas. Los cultivos de semilla importantes son la colza, la remolacha azucarera, el maíz, el girasol, la soya y el sorgo. Otras plantas a las que se puede aplicar la presente invención pueden incluir lechugas, endibias y brassicas vegetales que incluyen repollo, brócoli y coliflor, y claveles, geranios, tabaco, cucurbitáceas, zanahoria, fresa, girasol, tomate, pimienta, crisantemo.

25 Las plantas de granos que proporcionan semillas de interés y a las cuales se pueden aplicar los métodos y usos de la invención incluyen plantas de semillas oleaginosas y plantas leguminosas. Estas incluyen semillas de grano, como maíz, trigo, cebada, arroz, sorgo, centeno, etcétera. Las plantas de semillas oleaginosas incluyen algodón, soya, cártamo, girasol, Brassica, maíz, alfalfa, palma, coco, etcétera. Las plantas leguminosas incluyen frijoles y guisantes. Los frijoles incluyen guar, algarrobo, fenogreco, soya, frijoles de jardín, caupí, frijol mungo, frijol lima, frijol fava, lentejas y garbanzos.

30 En particular, la invención es aplicable a plantas de cultivo tales como las que incluyen: maíz (*Zea mays*), canola (*Brassica napus*, *Brassica rapa* ssp.), alfalfa (*Medicago sativa*), arroz (*Oryza sativa*), centeno (*Secale cereale*), sorgo (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*), girasol (*Helianthus annua*), trigo (*Triticum aestivum*), soya (*Glycine máx*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), papa (*Solanum tuberosum*), maní (*Arachis hypogaea*), algodón (*Gossypium hirsutum*), batata (*Ipomoea batatas*), yuca (*Manihot esculenta*), café (*Coffea* spp.), coco (*Cocos nucifera*), piña (*Ananas comosus*), árbol de cítrico (*Citrus* spp.) cacao (*Theobroma cacao*), té (*Camellia sinensis*), plátano (*Musa* spp.), aguacate (*Persea americana*), higo (*Ficus casica*), guayaba (*Psidium guajava*), mango (*Mangifer indica*), olivo (*Olea europaea*), papaya (*Carica papaya*), anacardo (*Anacardium occidentale*), macadamia (*Macadamia intergrifolia*), almendra (*Prunus amygdalus*), remolacha azucarera (*Beta vulgaris*), avena, cebada, vegetales y plantas ornamentales.

40 De manera similar, la invención puede aplicarse a plantas herbáceas y leñosas perennes de crecimiento rápido, por ejemplo, árboles, arbustos y pastos. Una lista no exhaustiva de ejemplos de tipos de árboles que pueden someterse a los métodos y usos de la invención incluye álamo, álamo híbrido, sauce, arce plateado, falsa acacia, sicómoro, goma dulce y eucalipto. Los arbustos incluyen tabaco. Los pastos perennes incluyen pasto de hierba, hierba canaria de caña, espartina de pradera, hierbas tropicales, *Brachypodium distachyon* y *Miscanthes*.

45 La producción de DH es una herramienta fundamental para el descubrimiento de rasgos y el mejoramiento, como se describió anteriormente. Los compuestos HDACi pueden usarse para superar dos cuellos de botella principales en el cultivo de embriones haploides: inducción de divisiones embriogénicas/embriones y conversión de embriones a plántulas.

50 El mejor modo actual de la invención es un uso de SAHA en microsporas de *Brassica napus* para lograr un aumento de la embriogénesis haploide y mejor conversión de embriones a plántulas haploides dobles.

55 Los inventores también han logrado aumentar las divisiones embriogénicas en gametofitos masculinos inmaduros de *Brassica rapa* y *Capsicum annuum* cuando se exponen a la TSA.

60 En la descripción de los ejemplos experimentales de la invención a continuación, se emplearon los siguientes materiales y métodos.

Material vegetal y cultivo

65 Se usó *Brassica napus* L. DH12075 como planta donante para el cultivo de microsporas para embriones. El crecimiento vegetal de *B. napus* y los procedimientos de aislamiento de microsporas se realizaron como se describe en Custers, J.B.M. (2003) "Microspore culture in rapeseed (*Brassica napus* L.)" en: Doubled haploid production in crop plants: a

manual, M. Maluszynski, K.J. Kasha, B.P. Forster, e I. Szarejko, eds (Dordrecht: Kluwer Academic Publishers), pp. 185-193. Los capullos de flores para el cultivo de microsporas se agruparon por tamaño (medido desde la punta del capullo hasta la parte inferior del sépalo), que varió de 3.0 a 3.5 mm para DH4079 y de 2.6 a 4.0 mm para DH12075. Las microsporas se aislaron y cultivaron en medio NLN-13 (véase Lichter, R. (1982) Mol. Plant 3: 594-602. Para la inducción de embriogénesis, las microsporas se cultivaron en la oscuridad a 33 °C durante 20 horas, y posteriormente se transfirieron a 25 °C. Los cultivos de microsporas no inducidos se cultivaron continuamente a 25 °C o 18 °C. La tricostatina A (TSA, Sigma-Aldrich) se preparó en DMSO. Se inocularon microsporas recién aisladas en medio que contenía TSA o el mismo volumen de DMSO como un control, y se cultivaron durante 20 horas a la temperatura indicada para cada experimento. Después de este periodo los cultivos se centrifugaron a 200 g durante 3 min, se resuspendieron en medio fresco NLN-13 sin TSA, y se transfirieron a 25 °C.

Los capullos de flores de Arabidopsis en la etapa 11 se recolectaron para los cultivos de anteras. Se esterilizó la superficie de los capullos de flores en lejía al 2 % durante 10 minutos, después se enjuagaron tres veces en agua destilada. Las anteras (sin filamento) se colocaron en medio NLN-13 líquido que contenía TSA 0.5 µM o el mismo volumen de DMSO, y después se cortaron a la mitad transversalmente en el medio para liberar las microsporas. Los cultivos se colocaron a 25 °C durante 20 horas en la oscuridad. El medio se reemplazó después con medio NLN-13 fresco mediante pipeteo suave, y los cultivos se incubaron a 25 °C durante unos cuatro días adicionales. Las microsporas libres y unidas ligeramente se recolectaron y tiñeron con DAPI. Se obtuvieron líneas de inserción de T-ADN de hda de Arabidopsis del centro Nottingham Arabidopsis Stock. Se contaron al menos 300 microsporas por muestra.

Líneas reporteras

Se generaron líneas reporteras basadas en GFP para los genes expresados en embriones de Arabidopsis, *LEC1* (At1g21970; *LEC1:LEC1-GFP*) y *GRP* (At2g30560; *GRP:GFP-GUS*) y el gen *ENODL4* de *B. napus* (AB836663; *ENODL4:GFP*). Para la fusión de traducción *LEC1:LEC1-GFP*, un fragmento de ADN de 3110 pb que comprendía 1292 pb hacia el extremo 5' del sitio de inicio de la traducción y toda la región codificante se amplificó mediante PCR y se recombinó en pGKGWG mediante el uso del sistema de clonación Gateway (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El gen *GRP* de Arabidopsis codifica una proteína EGG APPARATUS1-LIKE (EAL) (véase Gray-Mitsumune, M., y Matton, D.P. (2006) Planta 223: 618-625) y es muy similar a un gen rico en glicina/prolina de *B. napus* aislado a partir de cultivos de microsporas embriogénicas (sonda 563; véase Joosen, R., y otros (2007) Plant Physiol. 144: 155-172). La fusión transcripcional *GRP:GFP-GUS* de Arabidopsis se obtuvo mediante amplificación por PCR de un fragmento que comprendía 861 pb hacia el extremo 5' del codón de iniciación y recombinación Gateway en pBGWFS7.0. El *BnENODL4* se identificó como un gen expresado en la embriogénesis temprana del cultivo de microsporas de *B. napus* (patente japonesa núm. 35935650). Un fragmento de 1035 pb del promotor del gen *BnENODL4* (núm. de registro del GenBank. AB098076) se clonó mediante PCR inversa, se ligó al extremo 5' de un fragmento terminador sGFP: nos y se insertó en pBinKH, que es una versión modificada de un vector binario pGPTV-KAN (véase Becker, D., y otros (1992) Plant Mol. Biol. 20: 1195-1197). Las construcciones reporteras se transformaron en la cepa C58C1 de *Agrobacterium tumefaciens* que porta el plásmido Ti pMP90 y después en DH12075 de *B. napus* (véase Moloney, M.M. y otros (1989) Plant Cell Rep. 8: 238-242) y/o CoLo de Arabidopsis (véase Clough, S.J., y Bent, A.F. (1998) Plant J. 16: 735-743).

Microscopía

La etapa de desarrollo y la identidad de las células en el cultivo de microsporas y anteras se visualizaron con la tinción nuclear 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, 1.25 µg/ml de acuerdo con Custers (2003) *más arriba* mediante el uso de un microscopio de epifluorescencia Axioskop de Zeiss con conjunto de filtros no. 02. Aproximadamente doscientas microsporas o grupos multicelulares se contaron para cada muestra. Se obtuvieron imágenes de GFP mediante el uso de microscopía de barrido láser confocal (CLSM; Leica DM5500 Q). La GFP se excitó con una línea láser de argón a 488 nm y se detectó con un filtro de emisión de 505-530 nm. Las muestras se contratiñeron con DAPI o yoduro de propidio (10 mg/ml; Sigma-Aldrich). El yoduro de propidio y la autofluorescencia roja se excitaron a 532 nm y se detectaron con un filtro de emisión de 620-660 nm. GFP y DAPI se covisualizaron con CLSM. Para CLSM, DAPI se excitó a 405 nm y se detectó con un filtro de emisión de 440-500 nm. Las secciones para óptica se filtraron por mediana con el programa informático LAS AF de Leica. Las anteras de Arabidopsis se obtuvieron en solución HCG (agua: hidrato de cloral: glicerol; 3:8:1) durante 10 min, después se observaron en microscopía DIC con un microscopio OPTIPHOT de Nikon.

Análisis moleculares

El aislamiento de ARN total y la digestión con DNasa en columna se realizaron mediante el uso del mini Kit para ARN de plantas Spin InviTrap (Invitex) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la RT-PCR semi-cuantitativa, se usaron 250 ng de ARN total para la síntesis de ADNc de la primera cadena con el kit de reactivos para Transcripción inversa Taqman (Applied Biosystems). Los parámetros de los ciclos fueron: un ciclo a 98 °C durante 30 s, 30 ciclos que comprenden 98 °C durante 5 s, 60 °C durante 30 s, seguido por 72 °C durante 1 min. Los cebadores para la RT-PCR semicuantitativa son de Malik y otros (2007) Plant Physiol. 144: 134-154. Los cebadores para la RT-PCR cuantitativa para la validación por micromatrices se diseñaron en base a sondas de oligonucleótidos de la matriz Brassica Exon 1.0ST GeneChip® de Affymetrix (véase Malik y otros (2007) *más arriba* y Love, C.G., y otros (2010) PloS one 5: e12812). Las líneas de inserción de T-ADN de hda de Arabidopsis se genotiparon con los cebadores de PCR. Los cultivos de microsporas para el análisis en micromatrices se cultivaron a 33 °C durante ocho horas con TSA, cicloheximida (CHX,

Sigma-Aldrich) disuelta en DMSO, DMSO o cicloheximida, o con TSA y cicloheximida juntos. Las muestras se cosecharon mediante centrifugación para el aislamiento del ARN total, como se describió anteriormente. Se envió un microgramo de ARN total de cada muestra al Servicio de Affymetrix NASC (<http://affymetrix.arabidopsis.info/>) para la hibridación al chip Affymetrix Brassica Exon 1.0 ST GeneChip. Las anotaciones de las sondas se descargaron del Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). El identificador para la anotación es GPL10733. Los datos de expresión se normalizaron mediante el uso del método RMA del paquete Bioconductor 'affy'. Los valores de expresión con transformación log2 se identificaron como expresados diferencialmente mediante el uso de una prueba t de Student. Se realizó la corrección de múltiples pruebas de hipótesis mediante el uso del método de Holm (Holm, S. (1979) Scandinavian Journal of Statistics 6: 65-70) implementado en el paquete Bioconductor *multtest*'s. Se usó Mapman (véase Thimm, O., y otros (2004) Plant J. 37: 914-939 para identificar categorías funcionales de los genes expresados diferencialmente. Los datos de micromatrices se depositaron en la base de datos Gene Expression Omnibus (GEO) (GSE49070).

Inmunoquímica

Las microsporas recién aisladas y las microsporas cultivadas durante 8 horas en diferentes condiciones experimentales se cosecharon mediante centrifugación. Las proteínas se extrajeron hirviendo en tampón de muestra-SDS (30 µl por ml de cultivo) y se sometieron a electroforesis en un gel de SDS-PAGE al 12.5 % de Midget en condiciones reductoras. Después de transferir las proteínas a una membrana PVDF y bloquear con leche en polvo al 5 % en PBS, Tween 20 al 0.1 %, las transferencias se incubaron durante 2 horas con anticuerpo primario (dilución 1:2000). Los anticuerpos primarios usados en este estudio son los siguientes: anti-acetil-Lisina (ICP0380; ImmuneChem Pharmaceuticals), anti-Histona H3 (ab1791; Abcam), anti-Histona H4 (clon 62-141-13; Millipore), y anti-acetil-Histona H3 y anti-acetil-Histona H4 (Millipore). Se usó anticuerpo secundario de cabra anti-HRP de conejo (Sigma) en una dilución 1:2000 y las señales se detectaron mediante el uso de quimioluminiscencia aumentada (Sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Femto, Pierce).

Ejemplo 1 – La TSA induce hiperproliferación en genotipo poco sensible de *B. napus*, DH12075

Las microsporas cultivadas y el polen del genotipo de *B. napus*, DH12075 se trataron con el inhibidor de HDAC, TSA. Examinamos el desarrollo de los cultivos de microsporas mediante tinción de los gametofitos masculinos inmaduros tratados con estrés por calor (de aquí en adelante referido como control) y con estrés por calor más tratados con TSA en diferentes etapas del desarrollo con el colorante nuclear, DAPI. Se usaron experimentos de dosificación iniciales para establecer el tiempo de exposición mínima (20 horas) en relación a los fenotipos específicos analizados más adelante.

Figura 1. Efecto de la duración del tratamiento de TSA sobre la división celular esporofítica en el cultivo de microsporas de *B. napus* DH12075. Gametofitos masculinos inmaduros de dos tamaños de capullos diferentes (barras negras y barras blancas) se cultivaron en presencia de TSA 0.5 µM o con el volumen equivalente de DMSO (control) a 33 °C. Las divisiones celulares esporofíticas se contaron después de la tinción con DAPI después de cinco días de cultivo. Los tratamientos de más de 20 horas no aumentaron o redujeron adicionalmente la proporción de divisiones esporofíticas.

La figura 2 muestra el efecto de la TSA sobre los patrones de división celular temprana en cultivo de microsporas de *B. napus*. Las estructuras gametofíticas (A-C) y esporofíticas (D-F) teñidas con DAPI están presentes en los primeros dos días de cultivo de microsporas. (A) = microspora, (B) = polen binucleado, (C) = polen trinucleado, (D) = célula dividida esporofíticamente con dos núcleos de tipo vegetativo teñidos difusamente. (E) = estructura esporofítica con tres núcleos de tipo vegetativo y un núcleo de tipo generativo, condensado. (F) = estructura esporofítica multinucleada con cuatro núcleos de tipo vegetativo y dos núcleos de tipo generativo, (G-H) = el porcentaje de diferentes tipos celulares observados en el control (G) y cultivos tratados con TSA (H). Los tipos celulares se agruparon en las siguientes categorías: gametofitos muertos (barras blancas); estructuras gametofíticas en las microsporas (barras de color gris claro); etapas binucleada (barras de color gris medio) y trinucleada (barras de color gris oscuro); y estructuras divididas esporofíticamente (barras negras). Control, muestra tratada con DMSO. Los gametofitos masculinos inmaduros se obtuvieron a partir de capullos de flores donantes que se agruparon por tamaño. Las muestras se clasifican de la más joven a la más antigua (1-6) sobre la base de las etapas del desarrollo de los gametofitos masculinos encontrados en cada grupo por tamaño de capullos donantes. V = núcleo (de tipo) vegetativo; g = núcleo (de tipo) generativo; s = núcleo espermático. Barra de escala = 10 µm.

Después de dos días de estrés por calor, los gametofitos masculinos inmaduros en los cultivos de control se detienen, continúan el desarrollo del polen, o se dividen esporofíticamente. El desarrollo de gametofitos masculinos en cultivo sigue el mismo curso de desarrollo que en la antera (véanse las figuras 1A - C). La microspora unicelular se divide asimétricamente (mitosis del polen I, PM I) para generar un grano de polen con una célula vegetativa grande que contiene un núcleo difuso y una célula generativa más pequeña con un núcleo más compacto. La célula vegetativa se detiene en G1/G0, mientras que la célula generativa se divide una vez más (mitosis del polen II, PM II) para producir los dos gametos, los gametos masculinos, que participan en la fertilización doble. Las microsporas que se dividen esporofíticamente contienen dos núcleos grandes teñidos difusamente, en lugar del núcleo vegetativo grande, teñido difusamente, y el núcleo generativo pequeño y condensado que se produce después de PM I (Figura 2D). Los gametofitos inmaduros que se dividen esporofíticamente después de PM I, lo cual se observa raramente (< 1 %) en los cultivos de control de este genotipo, contienen una célula pequeña de tipo generativo además de las células esporofíticas más grandes (Figura 2E). Después del tratamiento con estrés por calor, la mayoría de las células en el cultivo de control fueron del tipo gametofítico o murieron, como se evidenció por la ausencia de tinción por DAPI (Figura 2G). Aproximadamente el 6 % de la población

se dividió esporofíticamente en los primeros dos días de los cultivos, lo que produjo grupos celulares con dos a seis núcleos. La etapa de desarrollo de la población inicial en los cultivos de control no influyó en la proporción inicial de células que se dividieron esporofíticamente.

5 El efecto combinado de estrés por calor y TSA 0.5 μ M sobre la división celular esporofítica después de dos días de cultivo fue drástico, donde hasta un 80 % de la población se dividió esporofíticamente (Figura 2H). El mayor aumento en la proporción de estructuras divididas esporofíticamente se observó en cultivos que contenían inicialmente polen binucleado. La mayoría de los cultivos con células divididas esporofíticamente contenían dos a seis núcleos teñidos difusamente, como en los cultivos de control. A diferencia de los cultivos de control, aproximadamente el 10 % de las células divididas esporofíticamente también contenían uno o más núcleos de tipo generativo (Figura 2F). La baja frecuencia de células con núcleos de tipo generativo es sorprendente si se considera el 40 a 60 % de polen binucleado que estaba presente al inicio del cultivo. El núcleo generativo puede degradarse, o puede asumir una morfología más difusa, que quizás contribuye a las divisiones ectópicas observadas.

15 Las observaciones indican que la pérdida de actividad de HDAC en los gametofitos masculinos inmaduros cultivados induce una alta frecuencia de división celular esporofítica ectópica. Las proteínas HDAC parecen jugar un papel principal en el control de la progresión del ciclo celular durante el desarrollo del gametofito masculino. El efecto combinado del estrés por calor y el tratamiento de TSA es más potente que el estrés por calor solo, tanto en términos de las etapas de desarrollo como en la proporción de gametofitos inmaduros que son inducidos a dividirse esporofíticamente.

20 Ejemplo 2 – La TSA y el estrés por calor inducen cambios del desarrollo similares

El destino del desarrollo de los cultivos de control tratados con estrés por calor y los cultivos expuestos a estrés por calor y TSA se estudió al examinar cultivos más antiguos con más detalle. Los experimentos iniciales mostraron que la proporción de las células en división, así como su destino del desarrollo estuvo influenciado por la concentración de TSA que se aplicó al cultivo. Las microsporas y el polen con estrés por calor se trataron con un intervalo de concentraciones de TSA y los cultivos se examinaron después de cinco y 15 días mediante tinción con DAPI para caracterizar las diferentes estructuras multicelulares que se desarrollaron.

30 La figura 3 muestra el efecto de la TSA sobre el crecimiento esporofítico en cultivo de microsporas de *B. napus*. (A) = porcentaje de células que se dividieron gametofíticamente (barras blancas) o esporofíticamente (barras grises) después de cinco días del cultivo de microsporas. Las estructuras correspondientes se muestran en la figura 3 B-E (barra de escala de 20 μ m) donde la figura 3(B-G) muestra imágenes de estructuras esporofíticas de tipo I-IV después de cinco (B-E) y 15 (F-G) días de cultivo. Los grupos celulares esporofíticos se clasifican de la siguiente manera: Tipo I, estructuras clásicas formadoras de embriones (barras negras, Figura 3B); Tipo II, estructuras compactas parecidas a callos (barras de color gris oscuro, Figura 3C); Tipo III, estructuras esporofíticas extrudidas (gris medio, Figura 3D) y Tipo IV, estructuras sueltas parecidas a callos (barras de color gris claro, Figura 3E), estructura Tipo II (Figura 3F) y estructura Tipo IV (Figura 3G). Las microsporas y el polen muertos no se incluyeron. El control es una muestra tratada con DMSO. Los núcleos en las Figuras B-G están teñidos con DAPI. La flecha muestra una exina intacta (B) o rota (C, D, E, F). Las etapas del desarrollo del material de partida (1-8) se clasifican de la más joven a la más antigua.

45 Se distinguieron cuatro tipos de estructuras esporofíticas en cultivos de control de cinco días (Figura 3B-E), algunas de las cuales se han descrito previamente en cultivos de microsporas de otros genotipos de *Brassica*. Las estructuras Tipo I son las estructuras clásicas formadoras de embriones que se observan rutinariamente en un cultivo de microsporas. Después de cinco días de cultivo estas estructuras multicelulares contenían hasta 40 núcleos que todavía estaban encerrados en la pared del polen (exina; Figura 3B). Las paredes celulares se formaron en estructuras Tipo I, pero no eran claramente visibles. Estas estructuras embriogénicas multicelulares solo se observaron en cultivos de control que inicialmente contenían una mezcla de microsporas uninucleadas tardías y polen binucleado temprano, y solo comprendían una pequeña proporción de la población de células en división (0.5 %). Las estructuras Tipo II fueron las estructuras más abundantes presentes en los cultivos de control de cinco días. Son parecidas a callos, menos compactas que las estructuras Tipo I, y contienen hasta cinco células que ya habían comenzado a emerger de la exina (Figura 3C). Las estructuras Tipo III contenían de dos a tres núcleos grandes y teñidos difusamente y ya no estaban encerrados por la exina, que permaneció unida a los grupos celulares y frecuentemente se asoció con un núcleo de tipo generativo (Figura 3D). Las estructuras Tipo IV, que se observaron raramente en los cultivos de control, comprendieron grupos sueltos parecidos a callos con paredes celulares teñidas con DAPI (Figura 3E).

55 Las mismas estructuras esporofíticas que en el control se observaron en los cultivos de cinco días que recibieron una combinación de estrés por calor y tratamiento con TSA, pero en diferentes proporciones en dependencia de la concentración de TSA que se aplicó (Figura 3A).

60 La figura 4 muestra el efecto de la TSA y la temperatura de cultivo sobre la división celular y la formación de embriones en cultivo de microsporas de *B. napus*. Las microsporas y el polen inmaduro de diferentes tamaños de capullos se cultivaron en presencia de diferentes concentraciones de TSA en comparación con el volumen equivalente de DMSO (control) a tres temperaturas: A - D = 33 °C, D-F = 25 °C, G-H = 18 °C. Para cada tratamiento, las muestras se clasifican de izquierda a derecha a lo largo del eje z de acuerdo con la etapa de desarrollo de las microsporas y el polen. A, D, G muestra la etapa de desarrollo de las microsporas y el polen al inicio del cultivo en los experimentos en A = 33 °C, D = 25

°C y G = 18 °C. Las microsporas y el polen se categorizaron de la siguiente manera: etapas de microsporas uninucleadas medias (barras blancas); microsporas uninucleadas tardías (barras grises) y polen binucleado (barras negras). B, E, H muestran el efecto de TSA sobre la división celular en el cultivo de microsporas para embriones de *B. napus*. El porcentaje de células que se dividieron gametofíticamente o esporofíticamente después de cinco días de cultivo de microsporas a B = 33 °C, E = 25 °C, H = 18 °C. Los grupos celulares esporofíticos se examinaron después de cinco días de cultivo y se categorizaron de la siguiente manera: Estructuras embriogénicas clásicas de Tipo I (barras negras); estructura compacta parecida a callos de Tipo II (barras de color gris oscuro); estructuras esporofíticas extrudidas de Tipo III (barras de color gris medio) y estructura suelta parecida a callos de Tipo IV (barras de color gris claro). Los tipos celulares gametofíticos se indican por las barras blancas. Las microsporas muertas y el polen no se contaron. C, F muestran el rendimiento de embriones de las microsporas y el polen que se formaron en presencia de DMSO (control) o diferentes concentraciones de TSA a C = 33 °C o F = 25 °C. Los embriones histodiferenciados no se desarrollaron en el control ni en las muestras tratadas con TSA que se cultivaron a 18 °C (datos no mostrados).

El tratamiento con estrés por calor y TSA indujo principalmente la formación de estructuras de Tipo II (hasta 77 % frente a 7 % en los cultivos de control) y de Tipo IV (hasta 32 % frente a 0.5 % en los cultivos de control). Las estructuras embriogénicas clásicas de Tipo I se observaron a una baja frecuencia cuando se añadió TSA 0.5 µM al medio de cultivo (hasta 1 % frente a 0.5 % en los cultivos de control), pero fueron mucho más abundantes cuando se usó una concentración de TSA diez veces menor (véase la figura 4B).

Con la excepción de las estructuras Tipo III, todas las estructuras multicelulares esporofíticas observadas en el control y en los cultivos con estrés por calor más tratamiento con TSA todavía estaban presentes y habían aumentado en tamaño después de 15 días de cultivo, y todavía eran más abundantes en cultivos tratados con TSA (figura 3F, G). Los grupos celulares de tipos II y IV finalmente dejaron de crecer y murieron. Se observó un porcentaje muy pequeño de embriones en la etapa de corazón a cotiledón en los cultivos de control (hasta 0.3 %). Se produjo una menor cantidad de embriones en cultivos con estrés por calor tratados con TSA 0.5 µM (hasta 0.05 %), pero fue hasta cinco veces más abundante que en los cultivos de control cuando los cultivos con estrés por calor se trataron con la menor concentración (0.05 µM) de TSA (Figura 4C). Tanto los cultivos de control como con estrés por calor más tratamiento con TSA contenían estructuras embriogénicas clásicas de tipo I y sus números pueden explicar fácilmente todos los embriones formados; sin embargo, no se puede descartar que otros tipos de grupos celulares, como las estructuras parecidas a callos de Tipo II, también se desarrollen hacia embriones histodiferenciados.

Se determinó si el tratamiento de estrés por calor que se usó para inducir embriogénesis haploide es necesario para el fenotipo de proliferación celular por TSA. Los cultivos de microsporas que se incubaron a temperaturas menores que 33 °C se dividen esporofíticamente, donde la proporción de células en división está en dependencia de la temperatura de cultivo y la etapa de desarrollo del gametofito masculino, pero produce menor cantidad de embriones o ninguno en comparación con cultivos a 33 °C. Un aumento del porcentaje de divisiones esporofíticas apareció cuando la TSA se aplicó a los cultivos de microsporas cultivados lo mismo a 18 que a 25 °C (Figura 4D-H), así como un aumento correspondiente en la producción de embriones a 25 °C. Se observó una producción de embriones de hasta 0.2 % en los cultivos tratados con TSA en comparación con prácticamente ninguna producción de embriones en los controles no tratados con TSA (Figura 4F). Se necesitaron mayores concentraciones de TSA para inducir proliferación celular y producción de embriones a estas temperaturas menores en comparación con los cultivos a 33 °C.

Sin desear estar limitados por ninguna teoría en particular, los inventores consideran que la TSA y el estrés por calor median cambios del desarrollo similares en los cultivos de microsporas.

Ejemplo 3 – Los grupos celulares esporofíticos son embriogénicos

Los grupos celulares que se forman en los cultivos con estrés por calor, tratados con TSA, se parecen a los encontrados en los cultivos de control que solo se exponen a un tratamiento de estrés por calor. Incluyen estructuras embriogénicas clásicas, así como estructuras que se han clasificado como no embriogénicas sobre la base de su estructura no organizada, liberación temprana de la exina, y la carencia de un protodermo, que se considera un sello distintivo para el compromiso con el desarrollo embrionario en cultivo. Se usaron RT-PCR semi-cuantitativa y líneas reporteras de GFP para determinar si los diferentes tipos de estructuras esporofíticas que se desarrollan en los cultivos de control y tratados con TSA son embriogénicas.

Se conoce que la expresión de cuatro genes de factores de transcripción expresados en el embrión, *BABY BOOM (BBM)*; *LEAFY COTYLEDON1 (LEC1)*; *LEC2* y *FUSCA3* se correlacionan positivamente con el potencial embriogénico de cultivos de microsporas de *B. napus*. El análisis de RT-PCR semi-cuantitativa mostró que la expresión de estos cuatro genes aumentó cuando los cultivos de microsporas se trataron con TSA, independientemente de la temperatura de cultivo (datos no mostrados) lo que sugiere que el tratamiento con TSA es suficiente para activar la vía embrionaria en el cultivo de microsporas.

Las líneas reporteras de GFP de *B. napus* se desarrollaron después para dos genes expresados en embriones de *Arabidopsis*, *LEC1 (LEC1:LEC1-GFP)* y *PROTEÍNA RICA EN GLICINA (GRP, GRP:GFP-GUS)*, para identificar las estructuras específicas que contribuyen al aumento de la expresión de genes del embrión que se observó en cultivos tratados con TSA. La expresión embrionaria temprana de ambos reporteros de GFP se confirmó en ambos embriones

cigóticos de *B. napus*, donde la expresión de *LEC1* se detectó ya en la etapa temprana de 2 células y la expresión de GRP desde la etapa de cigoto en adelante (datos no mostrados). Ningún gen se expresó durante las etapas uni, bi o trinucleadas del desarrollo de gametofitos masculinos, ya sea en los cultivos de anteras o de microsporas cultivados a 18 ° C para promover el desarrollo del polen.

5 La localización predominantemente nuclear de la fusión *LEC1-GFP* se usó para dar seguimiento de manera más precisa la identidad de desarrollo de los diferentes tipos celulares encontrados en los cultivos de microsporas dentro de los primeros tres días de cultivo. La figura 5 muestra microfotografías de reporteros de GFP expresados en embriones en cultivo de microsporas de *B. napus* (g = núcleo de tipo generativo; barra de escala en (A-J) = 10 µm, (K-R) = 25 µm). Los paneles A-H muestran la expresión de *LEC1:LEC1-GFP* en cultivos control de dos días (A, C, E, G) y tratados con TSA (B, D, F, H, I, J). Los paneles (A, B) muestran una estructura del tipo de microspora; (C, D) estructura del tipo de polen binucleado; (E, F) estructura del tipo de polen trinucleado; (G, H) estructura dividida esporofíticamente; (I) estructura dividida esporofíticamente del tipo de polen binucleado que muestra GFP en los dos núcleos de tipo vegetativo, pero no en el núcleo de tipo generativo; (J) estructura del tipo de polen binucleado dividida esporofíticamente que muestra GFP tanto en los dos núcleos de tipo vegetativo como en el núcleo de tipo generativo; (K-R) expresión de *LEC1:LEC1-GFP* y *GRP:GFP-GUS* en cultivos de microsporas tratados con TSA, de cinco a ocho días, tratados con TSA; (K y L) estructuras embriogénicas Tipo I a los ocho días; (M y N) estructuras compactas parecidas a callos Tipo II a los ocho días; (O y P) estructuras esporofíticas extrudidas Tipo III a los cinco días; (Q y R) estructura suelta parecida a callos Tipo IV a los ocho días. Para cada panel, la imagen en el lado izquierdo de cada panel muestra la fluorescencia de GFP y la imagen en el lado derecho, la fluorescencia de la tinción con DAPI.

25 En los cultivos de microsporas de control (tratados con estrés por calor), *LEC1-GFP* se expresó en estructuras parecidas a microsporas, y en células que contenían dos núcleos grandes, teñidos difusamente, pero no en estructuras parecidas a polen bi- o trinucleado (figura 5A, C, E, G). Después del tratamiento con TSA de las microsporas tratadas con estrés por calor, también se observó *LEC1-GFP* en las mismas estructuras que en los cultivos de control, pero además en estructuras parecidas a polen bi- y trinucleado (Figura 5B, D, F, H). En estructuras parecidas al polen, se expresó *LEC1-GFP* en el núcleo de tipo vegetativo o tanto en los núcleos de tipo vegetativo como generativo, pero nunca en los núcleos de tipo generativo solamente (Figura 5I y J).

30 Ambos reporteros *LEC1* y *GRP* se expresaron en las estructuras embrionarias clásicas (Tipo I) en el mismo patrón espacial que en los embriones cigóticos (Figura 5K y L), así como en las estructuras esporofíticas de Tipo II y IV. En las estructuras Tipo III solo se detectó expresión de *LEC1*. Se observó el mismo patrón de expresión después del tratamiento con TSA en cultivos más antiguos (Figura 5M-R). Un resumen de los patrones de expresión de *LEC1* y *GRP* en los cultivos de control y tratados con TSA (datos no mostrados) sugiere que los cultivos de microsporas de control y tratados con TSA muestran cambios similares del desarrollo. Sorprendentemente, las microsporas pueden ser reprogramadas para el desarrollo embrionario después del estrés por calor/tratamiento con TSA en ausencia de división celular. La exposición simultánea a TSA y estrés por calor produce un efecto más fuerte que el estrés por calor solo, porque el programa embrionario también se activa en ambas células de tipo vegetativa y generativa del gametofito inmaduro.

40 Ejemplo 4 – La TSA induce totipotencia en gametofitos masculinos inmaduros de Arabidopsis

45 Las estructuras multicelulares que se parecen a las estructuras de Tipo II y IV observadas en el cultivo de microsporas de *Brassica* se producen cuando las anteras de Arabidopsis en etapa 11 se cultivan a 25 °C con TSA 0.5 µM. La figura 6 muestra microfotografías de cultivos de anteras de cinco días (barra de escala (A, B) = 50 µm, (C, D) = 10 µm). La TSA induce divisiones celulares embriogénicas en gametofitos masculinos inmaduros de Arabidopsis. Los paneles muestran: (A) = antera teñida con DAPI en cultivo tratado con TSA que muestra, estructuras esporofíticas multicelulares, derivadas de gametofitos masculinos inmaduros (flecha). El inserto muestra una estructura multicelular teñida con DAPI con cuatro núcleos. (B) = antera obtenida de un cultivo de control que muestra carencia de proliferación celular esporofítica. (C) = expresión de *LEC1:LEC1-GFP* y (D) = *ENOD4L:GFP* en una estructura compacta parecida a callos de Tipo II en anteras tratadas con TSA. La exina todavía rodea las estructuras esporofíticas (marcada por flechas).

55 El cultivo de plantas donantes a una temperatura baja y el cultivo *in vitro* a una temperatura mayor, como en *B. napus* no fue necesario, ni mejoró la producción de estructuras esporofíticas. El porcentaje de gametofitos masculinos inmaduros que se dividieron esporofíticamente en anteras ColO cultivadas fue muy variable (0-5 %), pero nunca se observó en anteras cultivadas sin TSA (Figura 6B). Se examinó la expresión de las líneas con marcadores *LEC1* y *GRP* en cultivos tratados con TSA, pero solo se detectó expresión de *LEC1* (figura 6C). Sin embargo, un tercer reportero embrionario *ENOD4-LIKE:GFP* (*ENOD4L:GFP*) se expresó en las estructuras multicelulares inducidas por TSA (Figura 6D). Por lo tanto, la TSA también induce crecimiento embriogénico en gametofitos masculinos inmaduros de Arabidopsis.

60 Ejemplo 5 - Comportamiento de los mutantes *hda* y *rbr* en cultivo de anteras de Arabidopsis

65 Arabidopsis contiene 18 genes de HDAC (referidos como *HDA1-18*) agrupados en las familias Rpd3/Hda1, HD-tuin y sirtuin. Este experimento determinó si las inserciones de T-ADN en genes de HDAC de Arabidopsis fenocopian las anteras tratadas con TSA. Se examinaron líneas con inserciones de T-ADN en genes de *HDA* de tipo Rpd3/HDA1 y HD-tuin para determinar las divisiones ectópicas del gametofito masculino durante el desarrollo normal de las anteras *in situ*, pero no mostró ningún cambio en el patrón de división celular del polen en estas líneas.

La figura 7 (barra de escala = 10 μm) muestra el comportamiento de los mutantes *hda* y *rbr* en cultivo de anteras de Arabidopsis. Los paneles son los siguientes: (A) = muestra la eficiencia de la división celular esporofítica en gametofitos masculinos inmaduros de anteras cultivadas a partir de líneas de inserción de T-ADN de *hda* tratadas con TSA 0.5 μM . Se realizó una comparación estadística (prueba t de Student) entre las anteras ColO tratadas con TSA y las anteras mutantes para *hda* tratadas con TSA. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; (B, C) = estructuras multicelulares esporofíticas observadas en anteras *rbr-3/+* cultivadas. Estructura multicelular del tipo *rbr* con tres células de tipo vegetativo y una célula de tipo generativo (B) y estructura multicelular de Tipo II con ocho núcleos (C); (D) = proporción relativa de los diferentes tipos de células observadas en los cultivos de anteras *rbr3/+* tratados con TSA 0.5 μM o DMSO (cultivos de control). Las muestras se analizaron cinco días después de iniciar el cultivo. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la respuesta de las anteras *rbr-3* no tratadas y tratadas con TSA (*, $p < 0.05$; prueba t de Student) y las anteras ColO y *rbr-3* tratadas con TSA (+, $p < 0.05$; prueba t de Student).

Actualmente es difícil analizar las respuestas independientes de TSA o hipersensibles a TSA en las únicas líneas de inserción de *hda* debido a la respuesta baja y variable del sistema de cultivo. Dadas estas limitaciones, ninguna de las líneas de inserción de *hda* mostró divisiones esporofíticas en polen cultivado en ausencia de TSA; sin embargo, cuando las mismas anteras se cultivaron en presencia de TSA, la línea de inserción de T-ADN de *hda17* mostró un aumento pequeño pero significativo en el porcentaje de divisiones celulares esporofíticas respecto al control (Figura 7A). Estos datos sugieren que se necesita la actividad de al menos una HDAC, HDA17, para suprimir las divisiones celulares ectópicas en el polen de Arabidopsis.

Se realizaron experimentos para analizar si RBR juega un papel en la totipotencia celular mediada por TSA. Los mutantes homocigotos para *rbr* son letales para los gametofitos, por lo tanto los experimentos se realizaron en anteras heterocigotas para *rbr* (*rbr-3/+*), que contenían 50 % de polen *rbr*. Las estructuras en desarrollo se evaluaron como muertas, gametofíticas, del tipo *rbr* o del tipo TSA. El fenotipo *rbr* es más penetrante durante la etapa bicelular de desarrollo del polen y se caracteriza por estructuras con múltiples células vegetativas, y en menor medida, células adicionales del tipo generativo (Figura 7B). El fenotipo de TSA difiere del de *rbr* en que las células del tipo TSA son más grandes, contienen más células de tipo vegetativo, y tienen una exina estirada o rota (Figura 7C). Si se necesita una interacción RBR-HDAC para prevenir divisiones celulares esporofíticas en cultivo, entonces el cultivo de polen mutante para *rbr* sin TSA puede inducir divisiones del tipo TSA. El cultivo de anteras *rbr-3* con TSA no debe tener un efecto aditivo sobre el porcentaje de divisiones esporofíticas, excepto cuando la inhibición de la TSA de la actividad de HDAC es incompleta. La proliferación celular ectópica de los gametofitos masculinos inmaduros se observó cuando las anteras *rbr-3/+* se cultivaron en ausencia de TSA. Se observaron estructuras típicas compactas del tipo *rbr* con hasta 6 núcleos que se desarrollaron *in planta* (Figura 7D). Sorprendentemente, las anteras *rbr-3/+* cultivadas en ausencia de TSA también produjeron un bajo porcentaje (0.5 %) de estructuras multicelulares de Tipo II agrandadas y conectadas libremente (Figura 7D), que nunca se observó en las anteras control cultivadas de plantas de tipo silvestre. No se observaron diferencias entre las anteras *rbr-3/+* tratadas con TSA y de tipo silvestre tratadas con TSA, aparte de las divisiones del tipo *rbr* típicas que se observan en la línea *rbr3*; sin embargo, en comparación con las anteras *rbr-3/+* no tratadas, las anteras *rbr-3/+* tratadas con TSA mostraron una disminución en la frecuencia de divisiones del tipo *rbr*.

Estos experimentos con anteras *rbr3/+* cultivadas muestran que una pérdida de la función de RBR es suficiente para inducir la formación de grupos de células embriogénicas en cultivo de anteras de Arabidopsis en ausencia de TSA. La disminución en la frecuencia de divisiones del tipo *rbr* después del tratamiento con TSA puede reflejar un requisito para la actividad de HDAC para promover la progresión típica del ciclo celular del tipo *rbr*.

Ejemplo 6 – La TSA promueve la acetilación de histonas

Un anticuerpo para lisina acetilada se usó en combinación con transferencia en gel de proteínas para identificar las proteínas cuyo estado de acetilación cambia en los cultivos de microsporas de *B. napus* con estrés por calor más tratamiento con TSA, de 8 horas, en comparación con cultivos control con estrés por calor.

La figura 8 muestra que la TSA aumenta la acetilación de histonas. Los paneles muestran: (A) = transferencia Western de las proteínas acetiladas totales en cultivos de microsporas tratados durante ocho horas con DMSO (control) o TSA - proteínas en el intervalo de 10-25 kDa se acetilan diferencialmente después del tratamiento de TSA en comparación con el control; (B) = transferencia Western de histona total y acetilada (Ac) H3 y H4 en cultivos de microsporas tratados durante ocho horas con DMSO (control) o TSA. Los porcentajes de divisiones esporofíticas en los diferentes cultivos en el día 5 se muestran en cada muestra.

El aumento de la acetilación de proteínas se observó en proteínas de bajo peso molecular en el intervalo de 10-25 kDa en los cultivos tratados con TSA en comparación con los cultivos control (véase la figura 8A). El estado de acetilación de las histonas H3 y H4 se determinó durante el cultivo de microsporas mediante el uso de anticuerpos para las histonas acetiladas H3 (Ac-H3) y H4 (Ac-H4). Los cultivos de microsporas se iniciaron a partir de capullos que contenían mayoritariamente polen binucleado y se colocaron durante ocho horas a 18 °C o 33 °C con o sin TSA 0.5 μM . Como se esperaba, la TSA aumentó grandemente las divisiones esporofíticas a 18 °C y 33 °C en comparación con los controles no tratados (Figura 8B). Aunque este aumento en la división celular no tuvo un efecto claro sobre la cantidad total de histona H3 y H4 detectada en el control y los cultivos tratados con TSA, el nivel de acetilación de las histonas H3 y H4 aumentó drásticamente en los cultivos tratados con TSA respecto a los cultivos control, tanto a 18 °C como a 33 °C (Figura 8B).

El efecto principal de una actividad disminuida de HDAC después del tratamiento con TSA en un cultivo de microsporas parece ser aumentar la acetilación de histonas.

Ejemplo 7 - Efecto de inhibidores de HDAC sobre la división celular esporofítica en cultivos de microsporas de *B. napus* DH 12075

La figura 9 muestra datos de divisiones celulares esporofíticas de microsporas y polen en presencia de DMSO (control) o diferentes concentraciones de inhibidores de HDAC después de 5 días de cultivo de microsporas. Siete poblaciones diferentes de microsporas/polen se analizaron y se clasificaron de (izquierda a derecha) las etapas más tempranas del desarrollo a las más tardías del desarrollo.

Como se muestra en la figura 9, I = estructuras clásicas formadoras de embriones, Tipo I (barras negras); II = estructuras compactas parecidas a callos, Tipo II (barras de color gris oscuro) III = estructuras esporofíticas extrudidas, Tipo III (barras de color gris medio), IV = estructuras sueltas de tipo callo, Tipo IV (barras de color gris claro) y V = polen (barras blancas, F). Las microsporas y el polen muertos no se incluyeron. El control es una muestra tratada con DMSO. Las estructuras correspondientes (I-V) se muestran en el panel lateral.

Ejemplo 8 - Efecto de inhibidores de HDAC sobre el rendimiento de embriones en cultivos de microsporas de *B. napus* DH 12075

La figura 10 muestra el rendimiento de embriones a partir de microsporas y polen formados en presencia de DMSO (control) o diferentes concentraciones de inhibidores de HDAC después de 15 días de cultivo de microsporas. Siete poblaciones diferentes de microsporas/polen se analizaron y se clasifican (izquierda a derecha) a partir de las etapas más tempranas del desarrollo a las más tardías del desarrollo.

Ejemplo 9 – Los HDACi mejoran la calidad de embriones en las etapas tardías del polen donante

La figura 11 muestra datos de cultivos de microsporas de cuatro etapas del desarrollo tratados con DMSO (control) o HDACi y calificados según el tipo morfológico de embrión que se formó, así como el rendimiento de embriones. Los cuatro cultivos diferentes (1 - 4) se clasifican de (izquierda a derecha) a partir de las etapas más tempranas del desarrollo a las más tardías del desarrollo. La figura 11A muestra la representación esquemática de los diferentes tipos de embrión que se encuentran en los cuatro cultivos diferentes y en cada concentración. Cada embrión representa un rendimiento de 0.1 %. Cada uno de los diferentes tipos de embrión se formó casi exclusivamente en la etapa/concentración indicada. La figura 11B muestra que los tipos de embrión son: normal (i, v), áspero (ii, vi), comprimido (iii), en forma de balón (iv), cotiledones en forma de copa (vii) y cotiledones reducidos (viii). Para cualquier etapa determinada, a una concentración óptima un tratamiento con HDACi mejora el rendimiento y la calidad de los embriones que se forman respecto al control.

Ejemplo 10 – Los embriones tratados con HDACi pueden convertirse fácilmente en plántulas

La figura 12A muestra que los diferentes tipos morfológicos de embriones producidos en cultivo, ya sea de los cultivos control o los tratados con HDACi pudieron producir raíces cuando se transfirieron a un medio de germinación, con la excepción del tipo de embrión en forma de balón. Todos los embriones que produjeron raíces, excepto el tipo de embrión corto, iniciaron el desarrollo de raíces a partir del meristemo de la raíz, como lo evidencia el desarrollo de las raíces en unos pocos días de crecimiento en el medio de germinación. Sin embargo, los embriones cortos todavía produjeron raíces, pero mucho más tarde, lo que indica que las raíces se produjeron indirectamente a través de una fase de callo. En particular, el crecimiento de las raíces en los embriones tratados con HDACi fue más vigoroso que en el tipo similar de embriones de control (compárense los dos primeros paneles).

En la figura 12B, diferentes tipos de embriones derivados de diferentes poblaciones de microsporas/polen tratados con DMSO (control) o diferentes concentraciones de HDACi se transfirieron al medio de regeneración y se evaluó su capacidad para producir brotes (medida de conversión). Los embriones derivados de cultivos tratados con HDACi mostraron una germinación similar o mejorada (SAHA) en comparación con el control.

Ejemplo 11 - La TSA aumenta las divisiones celulares embrionarias en genotipos de *Brassica rapa*

Los siguientes genotipos de *B. rapa* se analizaron en un experimento que midió la actividad embriogénica de la TSA 0.5 μ m en cultivo de microsporas contra los controles respectivos en ausencia de TSA:

Barra en la figura 13	Código	Genotipo
1	BRO025	bimi
2	BRO028	bimi
3	BRO127	bimi
4	YS143	mostaza amarilla
5	PC180	col china
6	100S	ciclo rápido (semillas oleaginosas)

Las microsporas se obtuvieron de capullos donantes. Los capullos donantes se clasificaron de la etapa de desarrollo más joven (1) a la más antigua (3), de manera que (2) es una etapa intermedia. Los datos indican que la TSA aumenta grandemente el número total de células embriogénicas por tamaño de capullo en comparación con el control. Los datos también indican cómo el genotipo y/o la etapa del capullo donante pueden influir en el nivel de divisiones celulares embriogénicas provocadas por el aumento con tratamiento de TSA en comparación con los controles en *B napus*. Esta dependencia de la etapa es una observación normal en este sistema de cultivo de tejidos. El efecto de la TSA amplía el intervalo de etapas de respuesta.

Ejemplo 12 – La TSA aumenta la producción de embriones haploides dobles en el grupo Gonaylodes de *Brassica oleracea* (colinabo)

Las microsporas de diferentes etapas del desarrollo se aislaron mediante un método estándar (Lichter 1982, Journal of Plant Physiology 105:427-434). Para demostrar que el tratamiento con TSA es superior al método estándar, cantidades iguales de microsporas aisladas se sometieron a choque térmico a una temperatura que permite la formación de embriones (control) o no se sometieron a choque térmico y se suplementaron con Tricostatina A (TSA) 0.5 µM.

Como se muestra en la tabla 1 más adelante, la adición de TSA a los cultivos reemplaza el tratamiento por choque térmico y permite la producción de embriones en condiciones no permisivas (25 °C).

Tabla 1: Efecto de la TSA sobre la producción general de embriones

Experimento	Control	TSA
1	186	509
2	14	3
3	1	287
4	0	22
5	1	2
6	2	18
Suma	204	841

La figura 14 muestra el efecto de la TSA sobre el desarrollo embrionario en un genotipo recalcitrante (no sensible). Los grupos embriogénicos (cabezas de flecha) se encuentran en un punto de tiempo temprano en el cultivo tratado con TSA (ii), pero no en el cultivo de control (i). Los embriones grandes están presentes en el cultivo tratado con TSA a los 18 días (iii), pero no en el control.

Ejemplo 13 – La TSA aumenta las divisiones celulares embriogénicas en *Capsicum annuum*

La figura 15 muestra que la TSA aumenta la cantidad de células embriogénicas en un cultivo de microsporas de *C. annuum* en comparación con el control. Los cultivos de microsporas se realizaron de acuerdo con Kim M, Jang I-C, Kim J-A, Park E-J, Yoon M, Lee Y (2008) "Embryogenesis and plant regeneration of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) through isolated microspore culture": Plant Cell Rep 27 (3):425-434. Los capullos de flores que contienen microsporas vacuoladas se seleccionaron de acuerdo con Parra-Vega V, Gonzalez-García B, Seguí-Simarro JM (2013) " Morphological markers to correlate bud and anther development with microsporogenesis and microgametogenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.)": Acta Physiol Plant 35 (2):627-633. Excepto para el "Control" y "DMSO", las microsporas se expusieron a TSA (diluido en DMSO) durante las primeras 20 horas de cultivo.

Ejemplo 14 - Efecto de la cantidad de embriones obtenidos por capullo usado en cultivos de microsporas de *Capsicum annuum* control y tratados con TSA, de 45 días.

La figura 16 muestra que la TSA aumenta el rendimiento de embriones en cultivo de microsporas de *C. annuum* en comparación con el control. Los cultivos se realizaron de acuerdo con Kim M, Jang I-C, Kim J-A, Park E-J, Yoon M, Lee

5 Y (2008) "Embryogenesis and plant regeneration of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) through isolated microspore culture"; *Plant Cell Rep* 27 (3):425-434. Los capullos de flores que contenían 37 microsporas vacuoladas se seleccionaron de acuerdo con Parra-Vega V, Gonzalez-Garcia B, Seguí-Simarro JM (2013) "Morphological markers to correlate bud and anther development with microsporogenesis and microgametogenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.)": *Acta Physiol Plant* 35 (2):627-633. Excepto para el "Control" y "DMSO", las microsporas se expusieron a TSA (diluido en DMSO) durante las primeras 20 horas de cultivo.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para producir un embrión de planta haploide que comprende cultivar o sembrar material vegetal haploide en presencia de un compuesto de ácido hidroxámico o un tetrapéptido cíclico que tiene actividad de inhibidor de histona desacetilasa (HDACi) y actividad de embriogénesis de microsporas.
2. Un método como se reivindica en la reivindicación 1, que comprende, además, convertir el embrión haploide en un vástago; opcionalmente que comprende, además, sembrar el vástago hasta obtener una planta haploide.
- 10 3. Un método para producir una planta haploide doble que comprende cultivar o sembrar material vegetal haploide en presencia de un compuesto de ácido hidroxámico o un tetrapéptido cíclico que tiene actividad de inhibidor de histona desacetilasa (HDACi) y actividad de embriogénesis de microsporas durante un periodo, estimular o permitir una duplicación cromosómica espontánea, y sembrar el material vegetal haploide doble hasta obtener un vástago, plántula o planta.
- 15 4. Un método como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde después de la exposición al compuesto de ácido hidroxámico o tetrapéptido cíclico el material vegetal haploide se transfiere a un medio de crecimiento libre de compuesto de ácido hidroxámico o tetrapéptido cíclico.
- 20 5. Un método como se reivindica en la reivindicación 3 o la reivindicación 4, en donde la duplicación cromosómica se estimula mediante la exposición del material vegetal haploide a un agente de duplicación cromosómica; opcionalmente en donde el agente de duplicación cromosómica comprende un gas, una solución o un sólido.
- 25 6. Un método como se reivindica en cualquier reivindicación anterior, en donde antes de cultivar el material vegetal haploide con el compuesto de ácido hidroxámico o tetrapéptido cíclico, el material vegetal se somete a un estrés físico; preferentemente en donde el estrés físico se selecciona de uno o más de temperatura, estrés osmótico o privación.
- 30 7. Un método como se reivindica en cualquier reivindicación anterior, en donde el material vegetal haploide es un gametofito masculino inmaduro o una microspora.
8. Un método como se reivindica en cualquier reivindicación anterior, en donde el material vegetal se cultiva o siembra en presencia de más de un compuesto de ácido hidroxámico o tetrapéptido cíclico.
- 35 9. Un método como se reivindica en la reivindicación 8, en donde el compuesto de ácido hidroxámico se selecciona de tricostatina A (TSA), ácido suberoilánilida hidroxámico (SAHA), análogo de amida M344 de TSA y análogos descritos en el documento US2011/0237832, ácido suberoil bis-hidroxámico (SBHA), vorinostat (ácido suberoilánilida hidroxámico (SAHA)), scriptaid (hidroxiamida del ácido 6-(1,3-dioxo-1H, 3H-benzo[de]isoquinolin-2-il)-hexanoico), rocilinoestat (ACY-1215), belinostat (PXD101), dacinostat (LAQ824), droxinostat (CMH, 5809354), resminostat (RAS2410), panobinostat (LBH589), pracinostat (SB939), givinostat (ITF2357), quisinostat (JNJ-26481585) abexinostat (PCI-24781), oxamflatina (ácido (2E)-5-[3-(fenilsulfonilamino)fenil]-pent-2-en-4-inohidroxámico, bishidroxamida del ácido m-carboxicinnámico (CBHA), tubacina, tubastatina A HCl, CUDC 101 (7-[[4-(3-etinilfenilamino)-7-metoxiquinazolin-6-il]oxi]-N-hidroxiheptanamida), MC1568, PCI-34051, CUDC-907, AR-42 (OSU-HDAC42), APHA Compuesto 8 (3-(1-metil-4-fenilacetil-1H-2-pirrolil)-N-hidroxi-2-propenamida), CHR-2845, CHR-3996.
- 40 10. Un método como se reivindica en la reivindicación 9, en donde el compuesto de ácido hidroxámico se selecciona de tricostatina A (TSA), ácido suberoilánilida hidroxámico (SAHA), ácido suberoil bis-hidroxámico (SBHA), scriptaid (hidroxiamida del ácido 6-(1,3-dioxo-1H, 3H-benzo[de]isoquinolin-2-il)-hexanoico), oxamflatina (ácido (2E)-5-[3-(fenilsulfonilamino)fenil]-pent-2-en-4-inohidroxámico, tubacina, APHA Compuesto 8 (3-(1-metil-4-fenilacetil-1H-2-pirrolil)-N-hidroxi-2-propenamida.
- 50 11. Un método como se reivindica en la reivindicación 10, en donde el tetrapéptido cíclico se selecciona de trapoxina, trapoxina B, trapoxina A (ciclo((S)-fenilalanil-(S)-fenilalanil-(R)-pipercolinil-(2S,9S)-2-amino-8-oxo-9,10-epoxidecanoil), compuestos tetrapeptídicos relacionados con trapoxina A que tienen el ácido aminoácido-2-amino-8oxo-9,10-epoxi-decanoico en sus moléculas, clamidocina, HC-toxina, Cyl-2, WF-3161.
- 55 12. Un método como se reivindica en cualquier reivindicación anterior, en donde la planta es una especie o variedad de un género seleccionado de *Brassica* o *Capsicum*.
- 60 13. Un método como se reivindica en cualquier reivindicación anterior, en donde en comparación con un material vegetal haploide cultivado sin el ácido hidroxámico o tetrapéptido cíclico, el material vegetal cultivado con un tetrapéptido cíclico HDACi o ácido hidroxámico equivalente genera al menos 10 % más embriones haploides, plántulas haploides o plántulas haploides dobles.
- 65

14. Uso de un compuesto de ácido hidroxámico que tiene actividad de inhibidor de histona desacetilasa (HDACi) y actividad de embriogénesis de microsporas en la producción de embriones de plantas, vástagos o plantas haploides, o embriones, vástagos o plantas haploides dobles, al cultivar o sembrar material vegetal haploide en presencia del compuesto de ácido hidroxámico.
- 5 15. Uso de un tetrapéptido cíclico que tiene actividad de inhibidor de histona desacetilasa (HDACi) y actividad de embriogénesis de microsporas en la producción de embriones de plantas, vástagos o plantas haploides, o embriones de plantas, vástagos o plantas haploides dobles, al cultivar o sembrar material vegetal haploide en presencia del tetrapéptido cíclico.

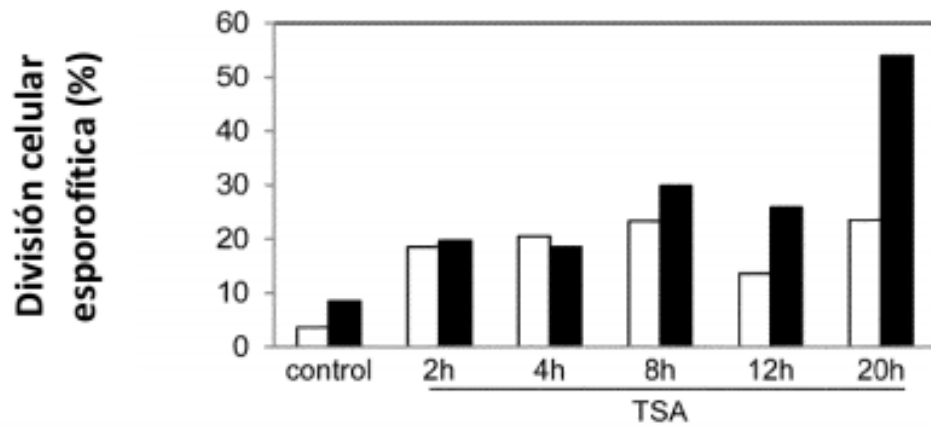


Figura 1

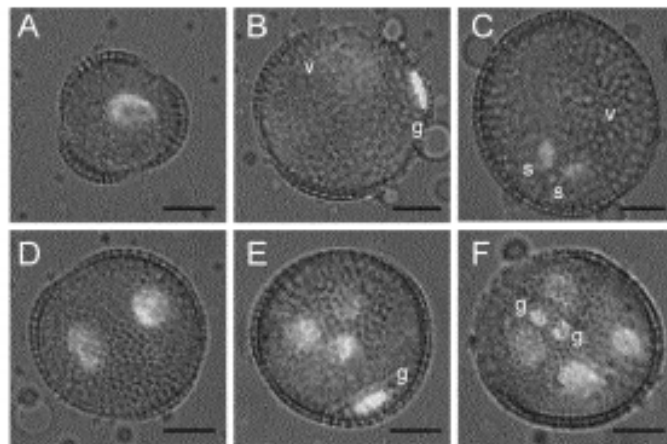


Figura 2

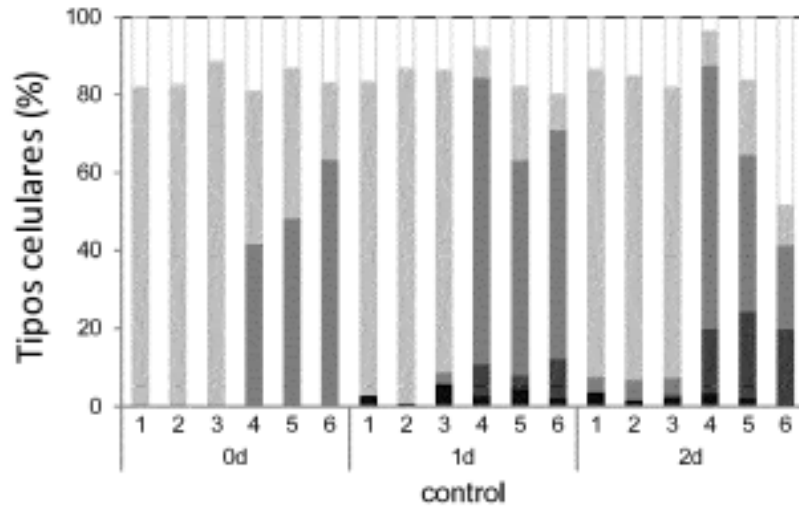


Figura 2G

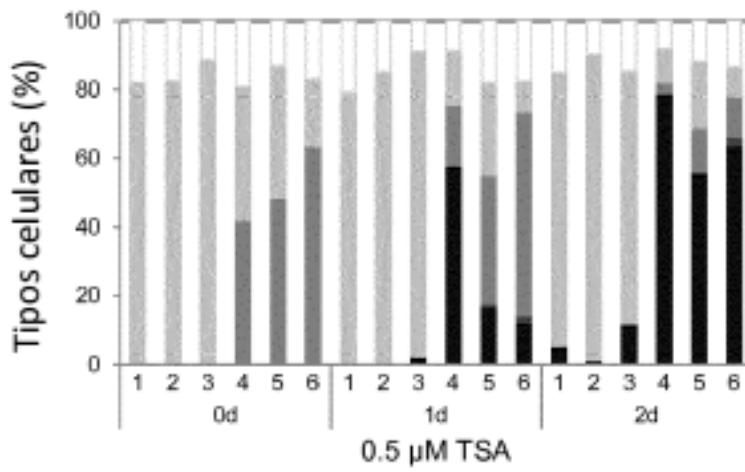


Figura 2H

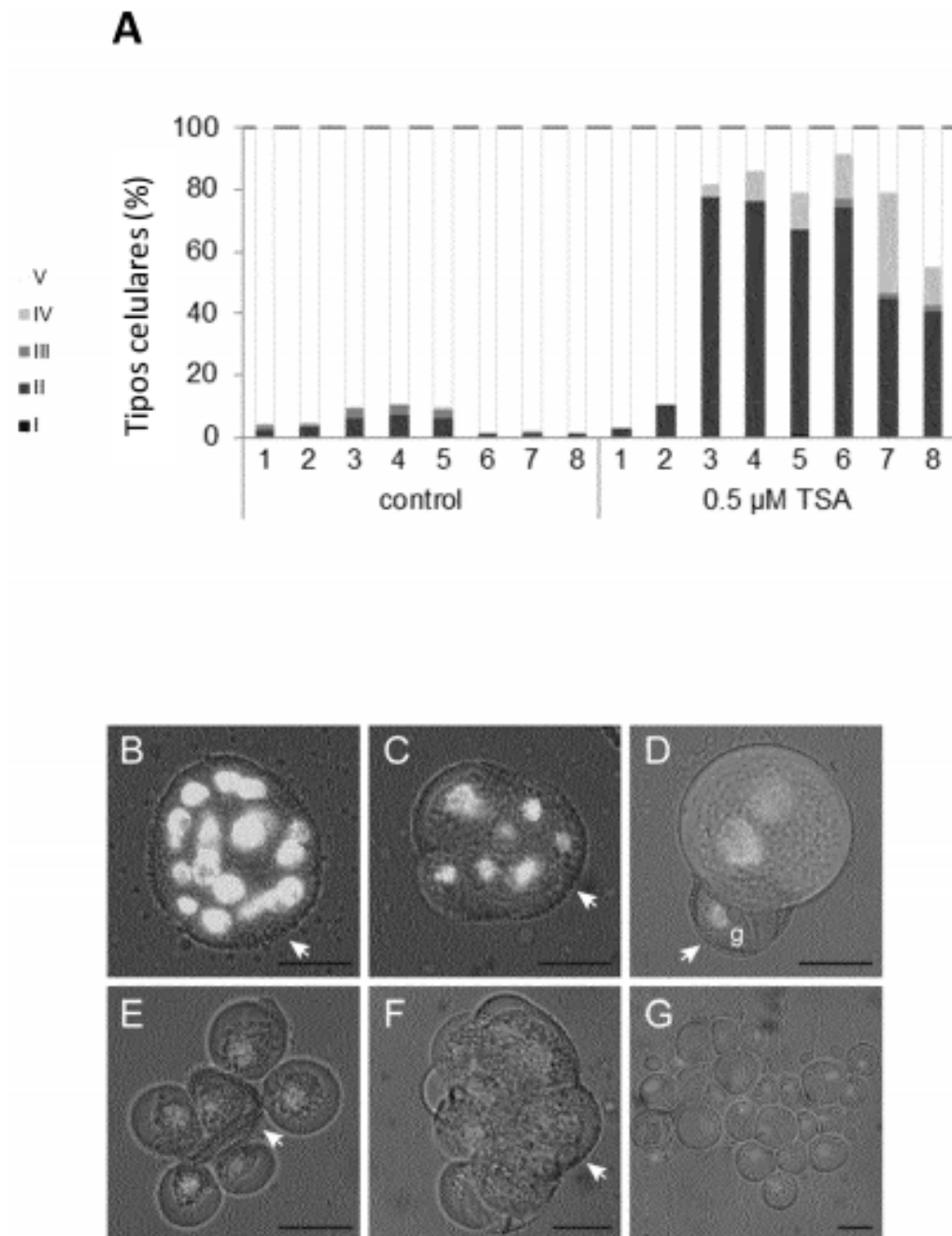


Figura 3

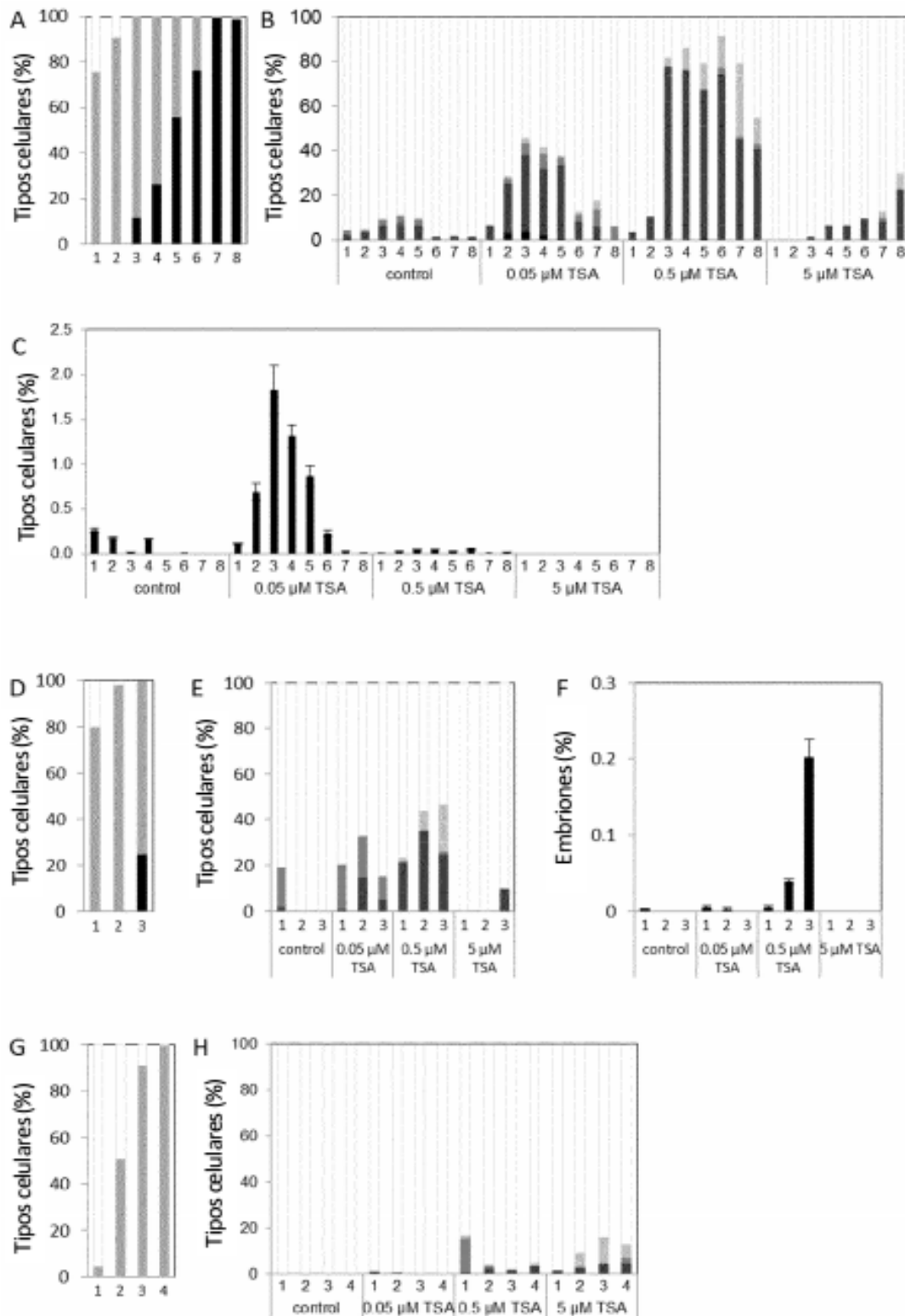


Figura 4

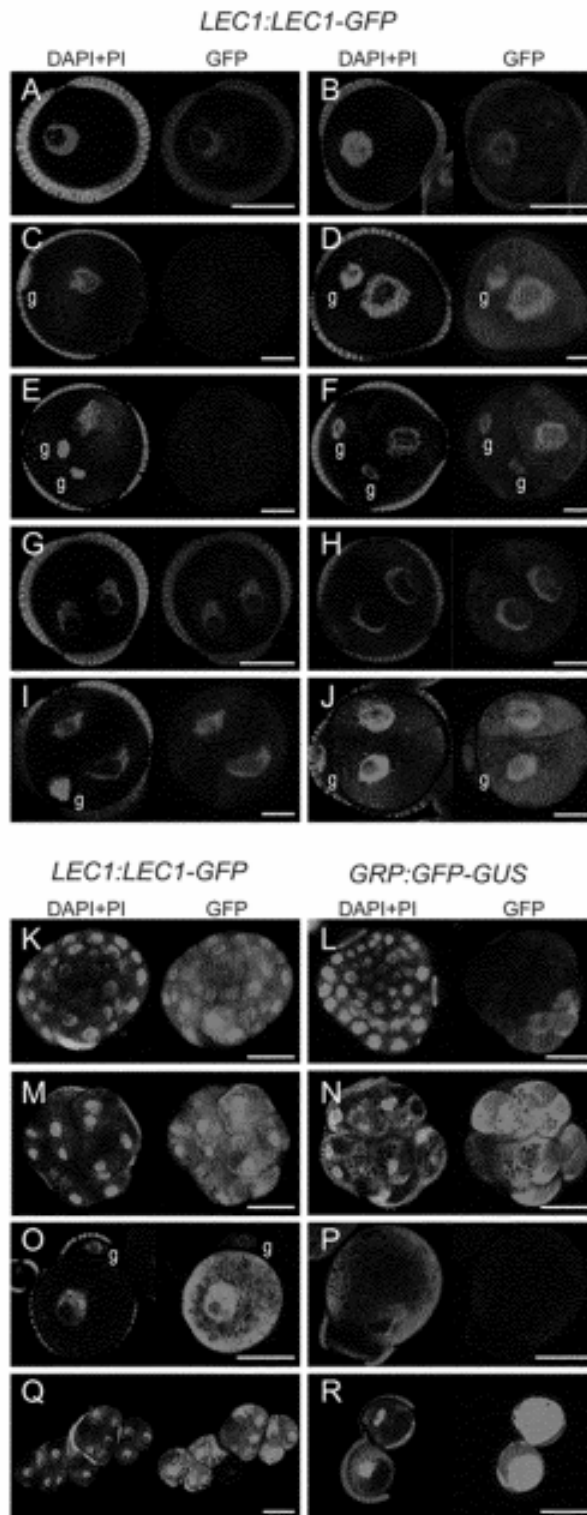


Figura 5

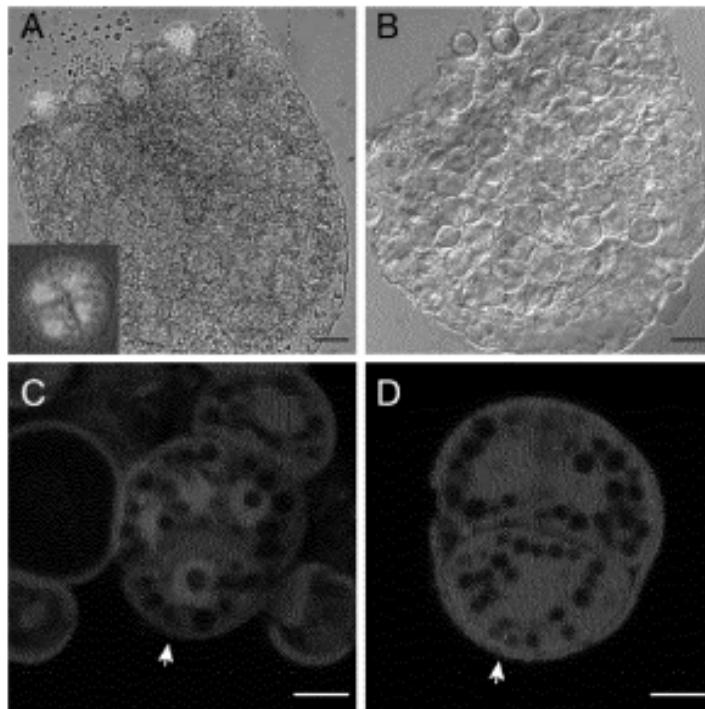


Figura 6

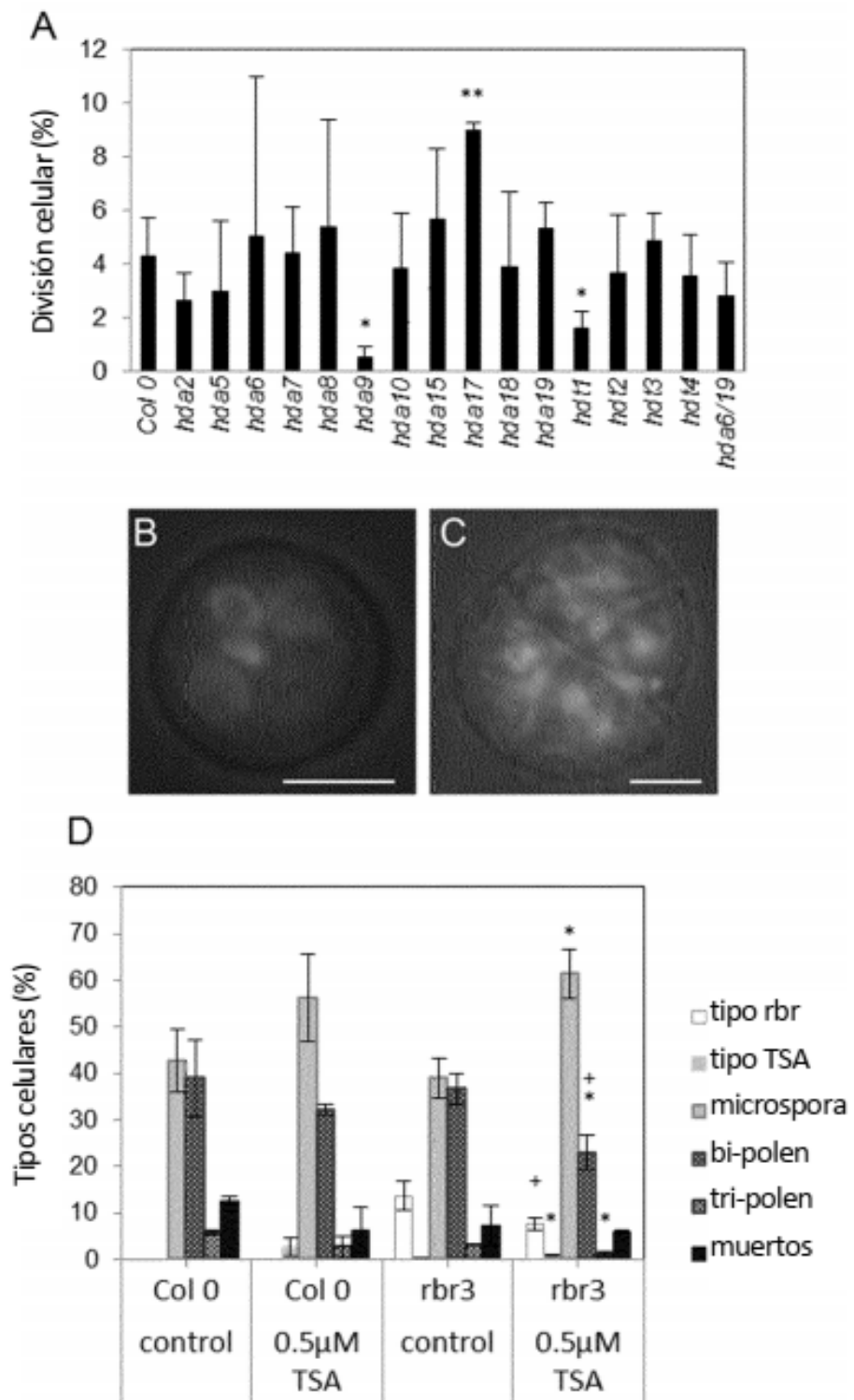


Figura 7

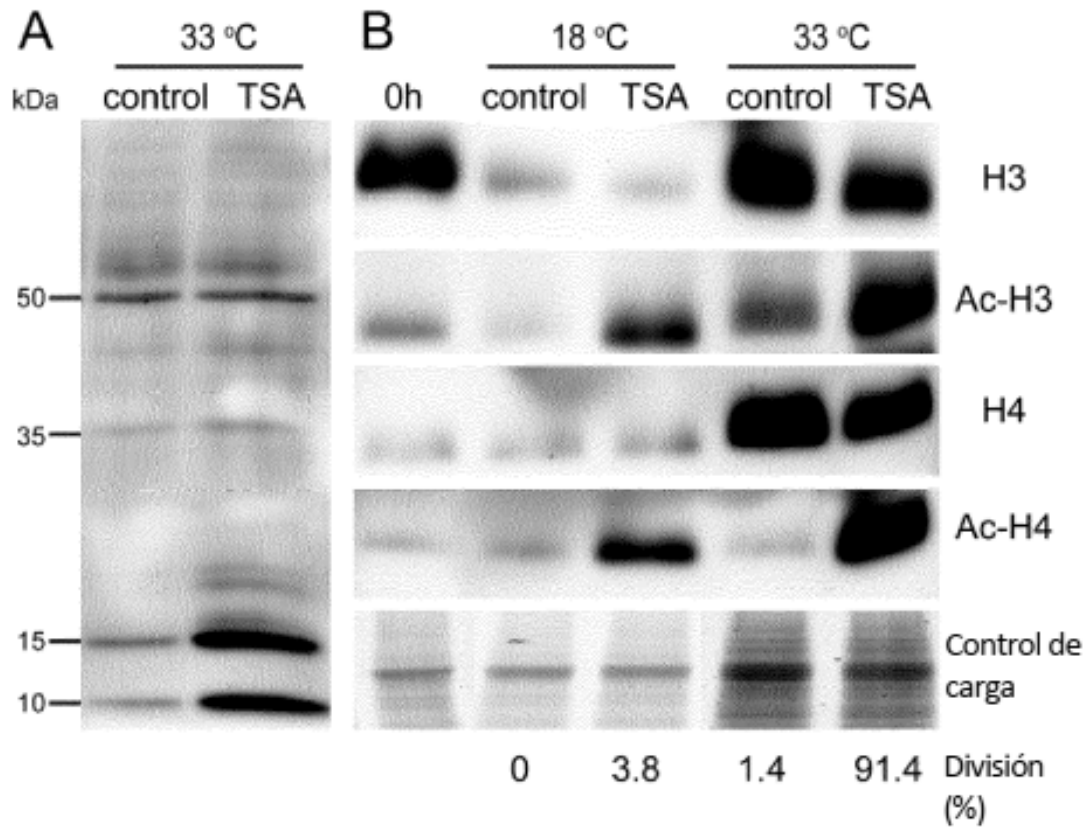


Figura 8

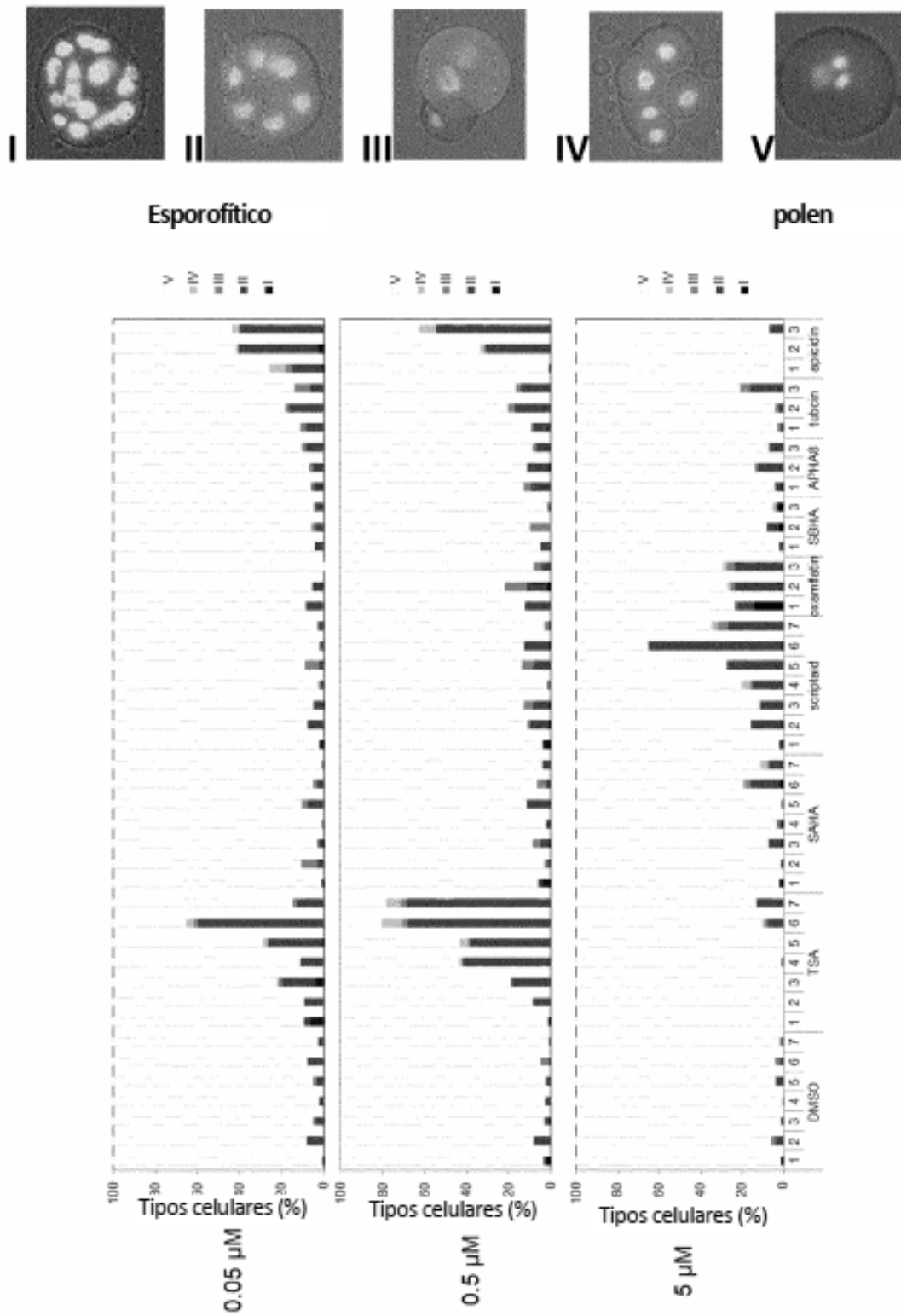


Figura 9

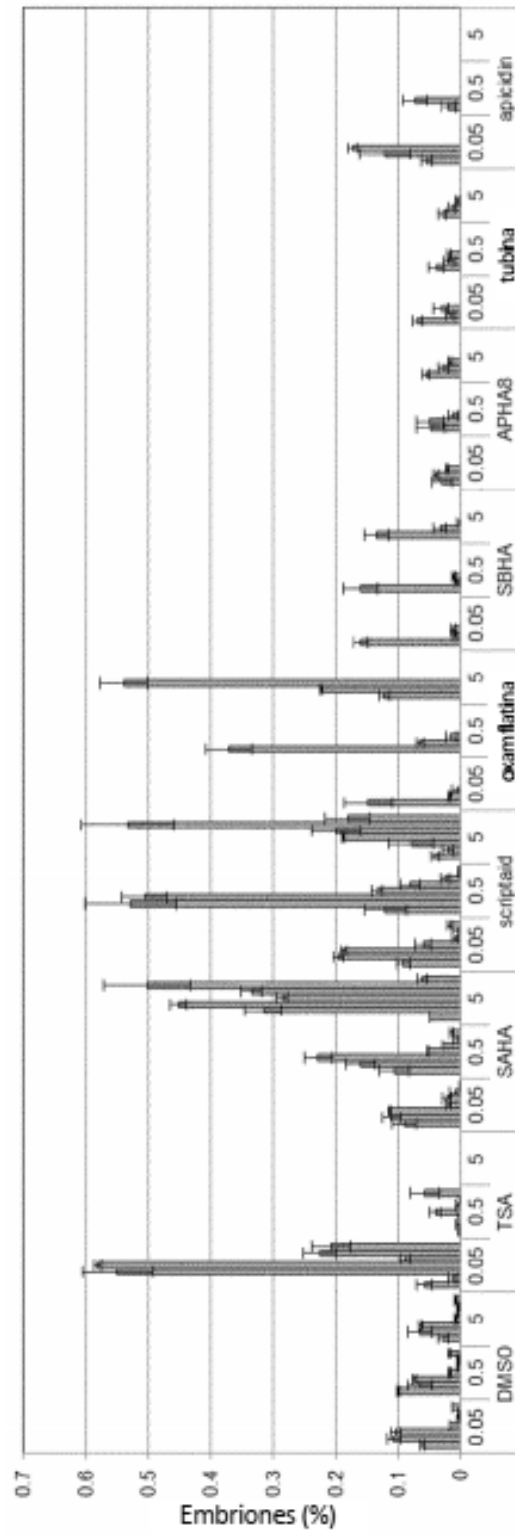


Figura 10

Compuestos	Concentración (μM)	Morfología de embriones			
		1	2	3	4
DMSO	0.05				
	0.5				
	5				
SAHA	0.05				
	0.5				
	5 ***				
TSA	0.05 ***				
	0.5	---	---		
	5	---	---	---	---
scriptaid	0.05				
	0.5 ***				
	5				

Embriones 0.1 %

Figura 11A

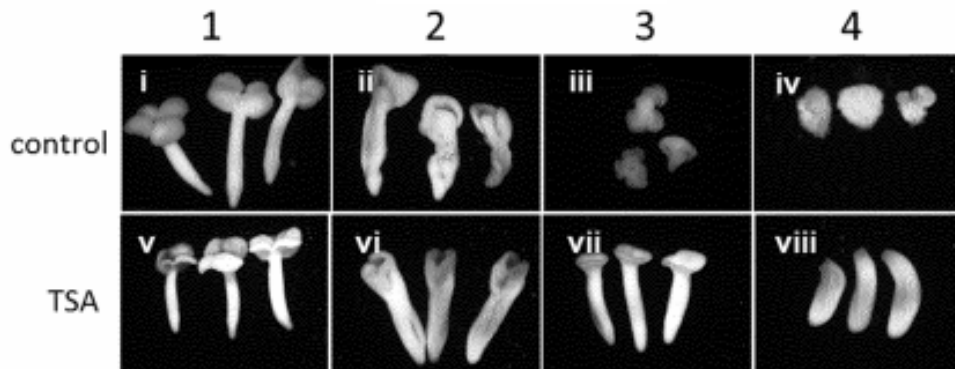


Figura 11B

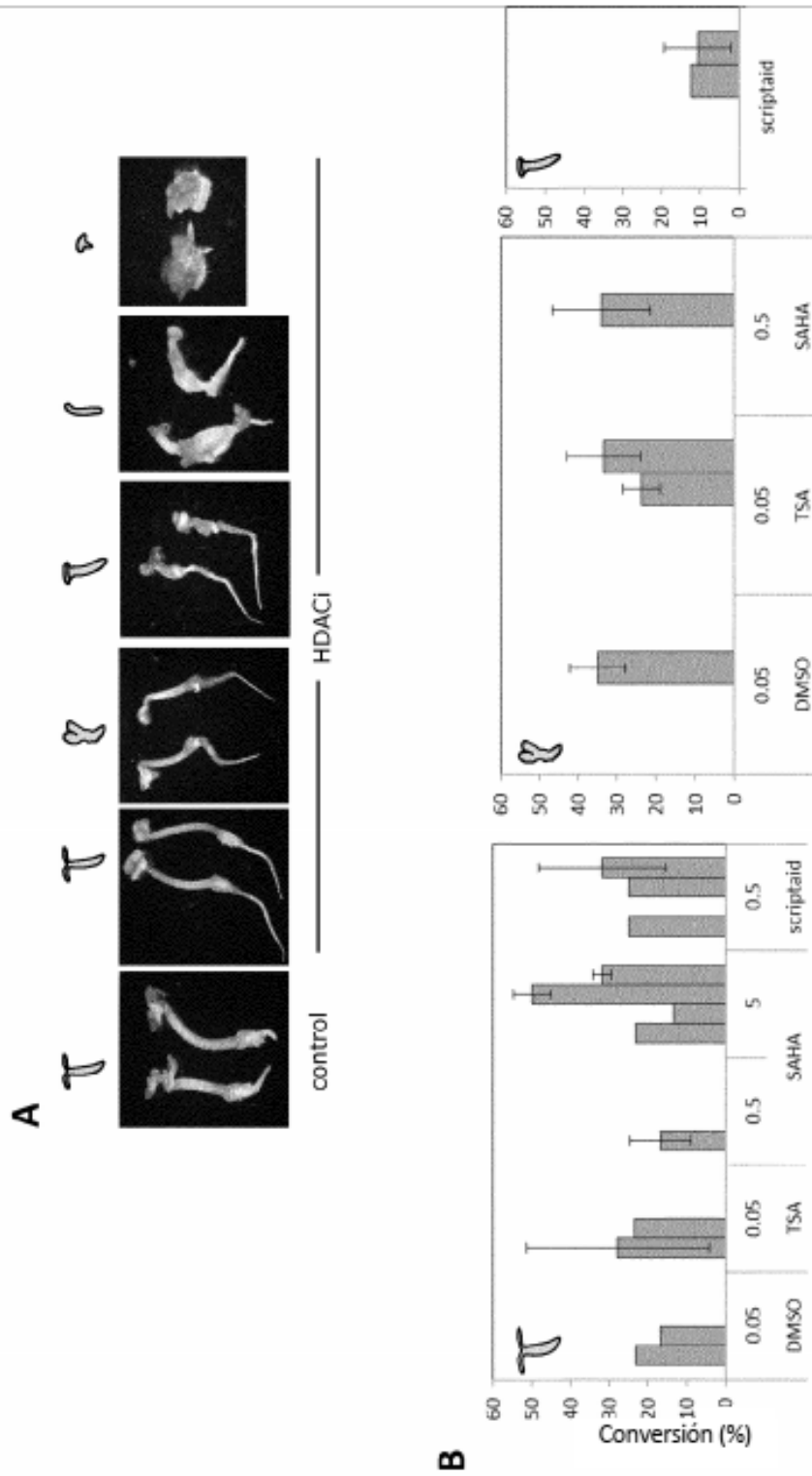


Figura 12

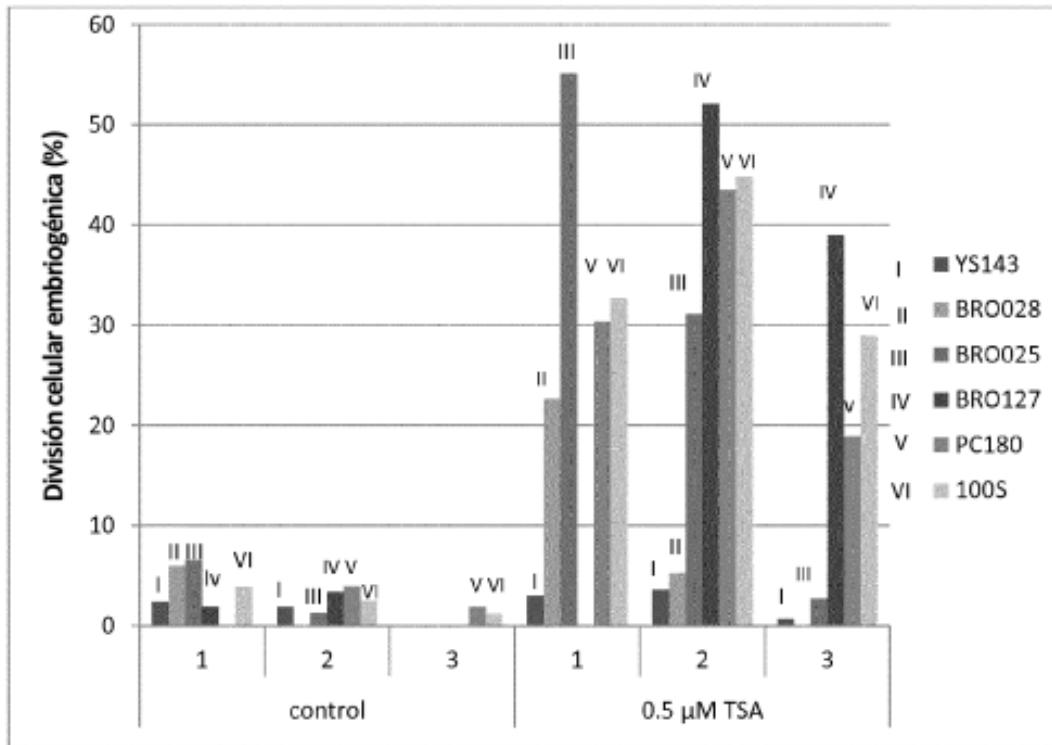


Figura 13

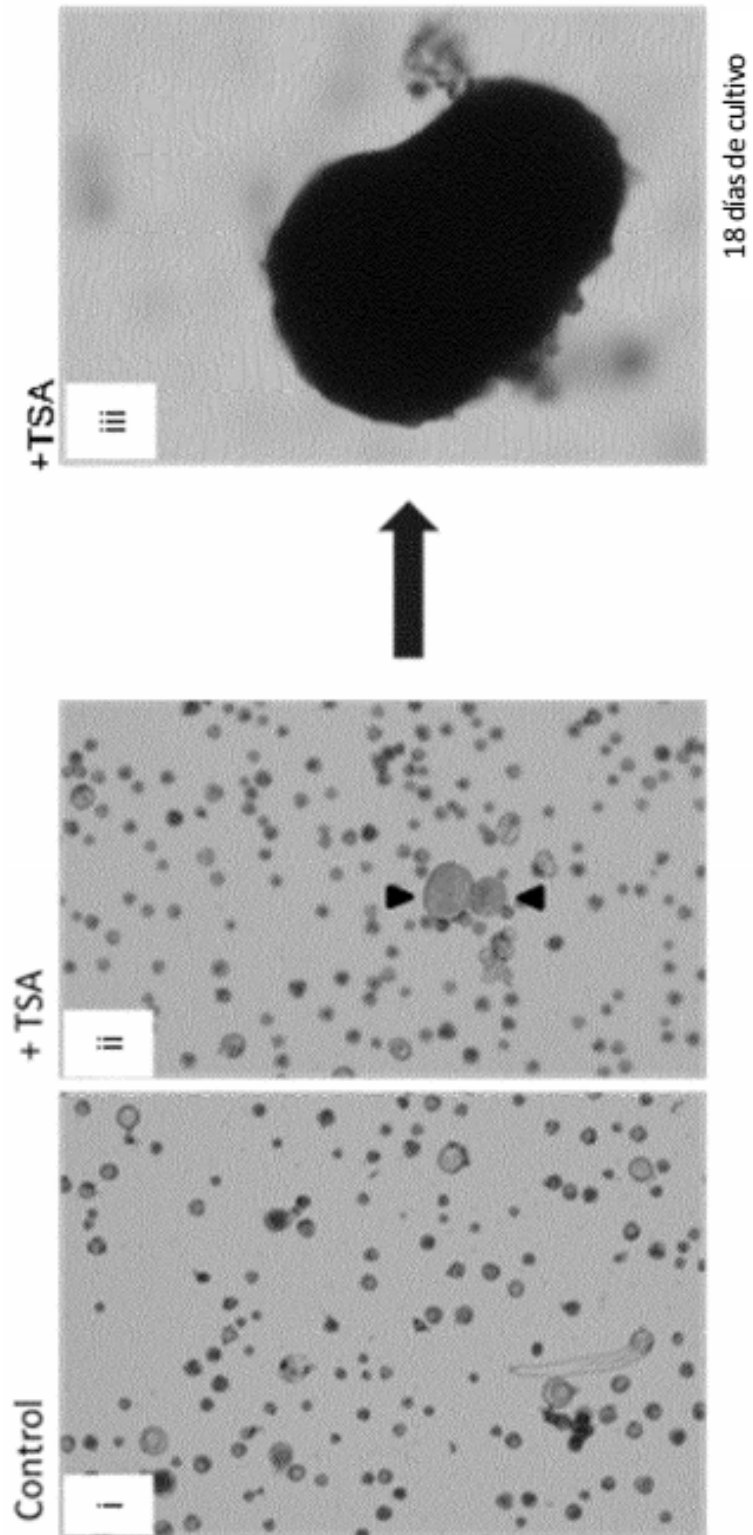


Figura 14

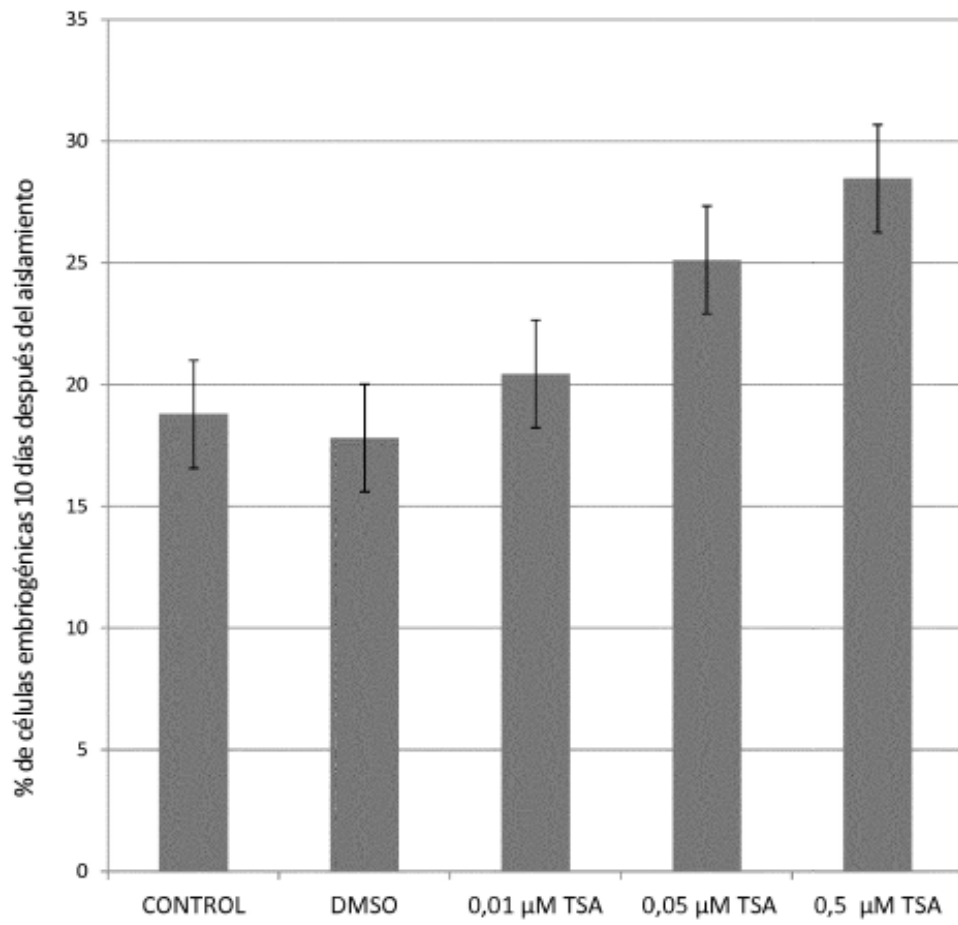


Figura 15

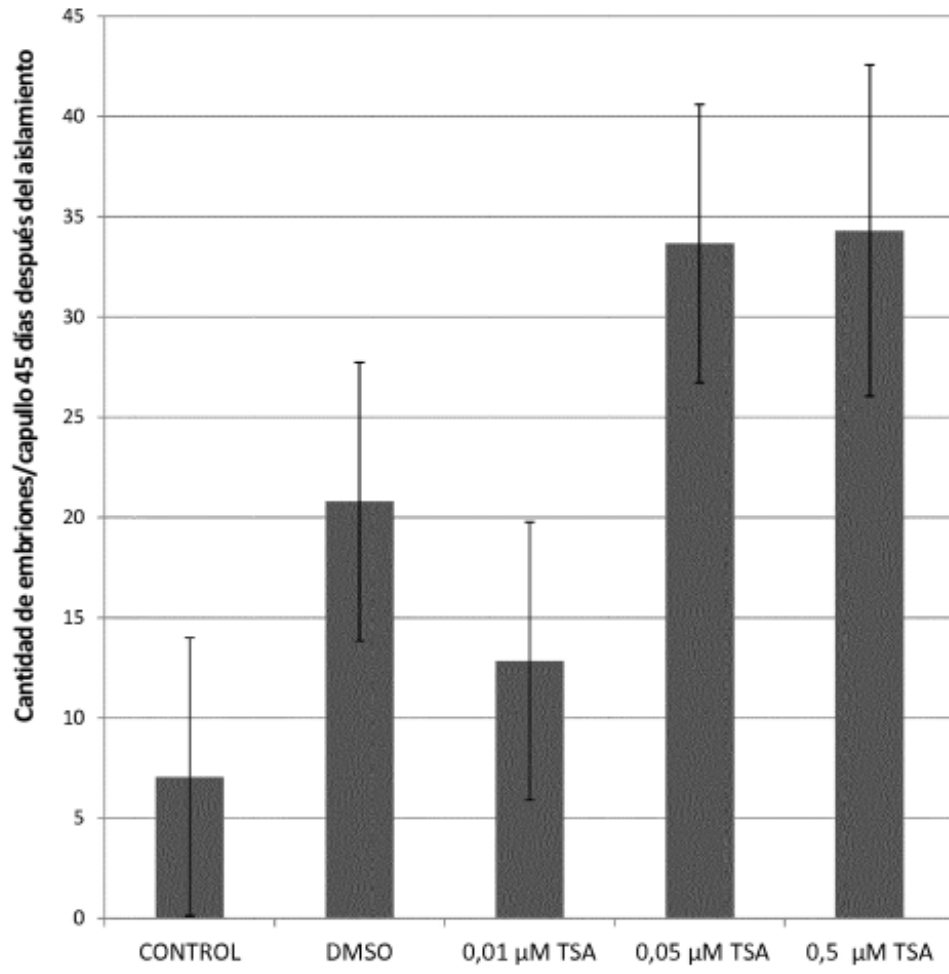


Figura 16