

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 808 688**

51 Int. Cl.:

A01H 4/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.03.2015 PCT/EP2015/054963**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.09.2015 WO15135940**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2015 E 15708548 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2020 EP 3116302**

54 Título: **Producción de semillas de cereales híbridas**

30 Prioridad:

10.03.2014 EP 14305344

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

01.03.2021

73 Titular/es:

**Limagrain Europe (100.0%)
Rue Henri Mondor, Biopôle Clermont-Limagne
63360 Saint-Beauzire, FR**

72 Inventor/es:

**JOLLIFFE, THOMAS;
GLEW, MARK;
RUSLING, MARK;
MURIGNEUX, ALAIN y
VARENNE, PIERRICK**

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 808 688 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

Producción de semillas de cereales híbridas

- 5 **[0001]** La presente invención se refiere a un procedimiento para limitar la proporción de semillas de cereales macho autofecundadas en un surtido de semillas.

Antecedentes de la técnica

- 10 **[0002]** La producción de semillas híbridas a partir de cereales es un desafío importante para las empresas de semillas, en particular para todos los tipos de trigo, cebada y arroz, pero cualquier otro cultivo reproducido por semilla, incluidos cultivos como triticale, avena, mijo o centeno, también podría beneficiarse de esta invención.

- 15 **[0003]** El trigo híbrido puede obtenerse mediante el uso de un agente químico para la hibridación (CHA, por sus siglas en inglés). Las plantas macho y hembra se siembran en tiras, a menudo, pero no siempre, las plantas macho son más altas que las hembras para promover una mejor dispersión del polen. Un CHA se usa para prevenir la formación de polen en plantas hembras. El único CHA utilizado comercialmente es CROISOR® 100 de SAATEN-UNION.

- 20 **[0004]** El mismo sistema de producción de siembra en tiras o hileras se puede utilizar con plantas estériles (hembra) macho obtenidas a partir del uso de rasgos genéticos: esterilidad masculina nuclear o esterilidad masculina citoplásmica combinada con el uso de uno o más restauradores para obtener semillas híbridas fértiles. Estos rasgos pueden provenir de tecnologías nativas u GMO y de uno o varios genes.

- 25 **[0005]** Ambos tipos de sistemas implican el uso de siembra en tiras o hileras de plantas macho y hembra. Se pueden utilizar diferentes proporciones e incluso si el área de tiras o filas macho es menor que las tiras o filas hembra, la proporción de hembras típicamente no excederá los dos tercios del total de plantas. Además, la dispersión de polen puede no optimizarse, y la cosecha debe hacerse de modo de evitar que el donante de polen se coseche con la semilla híbrida.

30

- [0006]** En la cebada, Syngenta ha descrito un sistema de producción híbrido, con una mezcla simple del 95 % de semilla hembra y 5 % de semilla macho sembrada. La cosecha contiene suficiente semilla híbrida como para cumplir con las regulaciones de comercialización híbrida. Además, la siembra de un mayor porcentaje de machos debería mejorar el rendimiento de las semillas híbridas, pero hacerlo también aumentará la proporción de semillas macho en las semillas cosechadas. Además, el cultivo de semilla híbrida utilizando este sistema de rodales mixtos, donde el 95 % de las semillas son hembras, frente a un sistema de cultivo de tiras donde, por ejemplo, solo dos tercios son hembras, debería mejorar la productividad de las semillas híbridas por unidad de área.

35

- [0007]** Cuando se siembran hembras y machos en un rodal mixto, la cosecha incluye semillas producidas en la hembra estéril polinizada por las semillas autopolinizadas macho y macho. La eliminación de semillas del progenitor macho en la producción híbrida se puede lograr de varias maneras. Se puede utilizar un marcador fenotípico para eliminar todas o una fracción de las semillas macho autopolinizadas. El uso de un marcador de color en la producción de semillas híbridas utilizando esterilidad masculina citoplásmica se describe en el documento US 3.842.538. El uso de un marcador de semillas azul se describe en Zong-Jun Pu y col. (2005). Los estudios sobre la reproducción de líneas macho-estériles enanas nucleares dominantes con un marcador de semillas azules en trigo blando se describen en los Servicios de Información sobre Trigo número 99: 46-50. El documento WO 2012/038350 describe el uso de infrarrojos cercanos para seleccionar entre semillas de híbridos y semillas homocigotas con base en estas diferencias fenotípicas. El uso de un sistema como estos marcadores de semillas implica la introgresión del gen o genes marcadores fenotípicos correspondientes en el material genético utilizado.

45

- 50 **[0008]** El trigo enano macho-estéril se describe en el artículo de Yang y col., (2009): A revolutionary Breeding Approach to wheat, Q.Y. Shu (ed), Induced Mutation in the Genomics Era. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma, págs. 370 a 372, y su uso en la selección periódica de trigo. Este procedimiento se denomina "sistema técnico de trigo macho-estéril enano". En este procedimiento, se siembran mezclas de plantas macho-estériles enanas y plantas macho altas para tener una mejor polinización. Se dan estrategias similares en otros documentos, Cao W.y col., 2008, A molecular marker closely linked to the male sterile Ms2 gene in common wheat (*Triticum aestivum*) 11th international wheat genetic symposium proceeding p1-3, said if the Taigu male sterile gene Ms2 was cloned and linked closely to a gene for herbicide resistance, it could be used for the production of commercial hybrid wheat cultivars when a fertility restorer becomes available.

55

- 60 **[0009]** Persiste la necesidad de un procedimiento para producir eficientemente semillas híbridas, especialmente de cereales, incluidos el trigo y la cebada.

- [0010]** Un procedimiento que permita producir semillas híbridas dentro de los requisitos reglamentarios para el nivel de hibridez, en particular los del sistema europeo de certificación, que actualmente se fija en el 90 % para el trigo,

65

la cebada, la colza, el triticale y el arroz.

[0011] También se describe un procedimiento que permite producir semillas híbridas de modo eficiente, con un rendimiento bueno o mejorado por unidad de tierra utilizada.

5

[0012] Y un procedimiento que permite producir semillas híbridas utilizando una proporción mejorada de semillas macho, específicamente una proporción superior al 5 % con respecto a las semillas macho-estériles del total de semillas parentales.

10 **[0013]** Un objetivo de la invención es proponer un procedimiento que permita recuperar menos semillas macho en la cosecha que las perforadas, por ejemplo, para reducir la proporción de semillas macho en la cosecha en comparación con lo sembrado.

Resumen de la invención

15

[0014] El procedimiento según la descripción se basa en el uso de plantas macho-fértiles (que producen polen para la polinización de las plantas hembra (macho-estériles) más altas que la hembra (macho-estériles) que ofrece la posibilidad, después de que las plantas hembra han sido polinizadas, de destruir a gran escala las plantas macho-fértiles más altas mediante un procedimiento fácil de implementar basado en medios químicos. Además, el procedimiento afecta al cultivador principal y a los cultivadores secundarios más altos de las plantas macho que son más altos que las plantas hembra, pero los cultivadores más bajos o secundarios también pueden verse afectados por el tratamiento químico de las plantas macho incluso si estos cultivadores no han estado directamente en contacto con el producto químico.

20

25 **[0015]** El procedimiento se basa en el uso de una brecha de altura entre plantas macho-fértiles y hembra, mediante la selección de plantas macho que son más altas que las plantas hembra correspondientes, lo que incluye, por ejemplo, en el trigo, el uso de una o más mutaciones génicas *rht*, donde la planta hembra es más baja que la planta macho. Las plantas macho y hembra se pueden sembrar como una mezcla, o perforar en filas o líneas cercanas, y, después de la floración, las plantas macho se pueden destruir selectivamente, por ejemplo, mediante el uso de un limpiador de malezas o un dispositivo físico/mecánico equivalente asociado con el uso de un herbicida. Se puede realizar una selección adicional de semillas con el fin de eliminar semillas macho indeseables en el surtido de semillas producido. Por "surtido de semillas", se entiende en el contexto de la presente invención, el número de semillas cosechadas.

30

35 **[0016]** Por consiguiente, la invención se refiere a un procedimiento como se define en las reivindicaciones.

[0017] El procedimiento comprende limitar la proporción de semillas macho autofecundadas en el surtido de semillas producido final. Limitar la proporción de semillas macho autofecundadas comprende pasar, al menos una vez, una herramienta que se extiende por encima de la altura de las plantas hembra más bajas, pero por debajo del nivel de la altura de las plantas macho-fértiles más altas, entre la antesis, preferentemente el final de la antesis, y la cosecha. La herramienta está prevista para prevenir o reducir el desarrollo normal de estas plantas macho-fértiles que se encuentran por encima de esta altura. La herramienta entra en contacto con estas plantas macho-fértiles que se encuentran por encima de esta altura y provoca la prevención o la reducción del desarrollo normal de las mismas.

40

45 **[0018]** El procedimiento limita esta proporción de semillas macho autofecundadas en el surtido de semillas producido final, por debajo de un valor umbral, preferentemente por debajo de un valor que cumpla con un nivel de hibridez reguladora.

[0019] En particular, el procedimiento limita el desarrollo de semillas en plantas macho después de la polinización de las plantas hembra para reducir o eliminar la proporción de semillas macho autofecundadas en el surtido de semillas producido final. Las semillas macho autofecundadas que pueden producirse pueden eliminarse o reducirse adicionalmente en el momento de la cosecha. Además, una proporción de las plantas macho se puede eliminar con la paja en el momento de la cosecha, por ejemplo, cuando se utiliza una cosechadora.

50

55 **[0020]** La descripción comprende el uso de una herramienta, tal como un limpiador de malas hierbas, la aplicación de un herbicida, preferentemente un herbicida que es sistémico, para prevenir o reducir el desarrollo normal de las plantas fértiles más altas entre la antesis, preferentemente el extremo de la antesis, y la cosecha en un campo que comprende plantas hembra (macho-estériles) más bajas y plantas fértiles más altas para producir semillas híbridas, especialmente semillas de cereales híbridas, donde el herbicida se aplica, al menos una vez, a las plantas fértiles más altas que se extienden por encima de la altura de las plantas hembra más bajas entre la antesis y la cosecha. La herramienta se aplica después de la polinización.

60

[0021] El procedimiento describe la producción de trigo híbrido, pero no se limita a la producción de híbrido a partir de dos líneas parentales endogámicas, este procedimiento también debe utilizarse para la producción de híbridos complejos: híbrido de tres vías, híbrido doble...

65

Descripción detallada

- 5 **[0022]** La descripción describe que el cruce de plantas hembra (macho-estériles) y macho-fértiles comprende la primera siembra de semillas de ambas poblaciones en proximidad cercana para asegurar un alto nivel de polinización cruzada. Uno de los intereses de la invención es posibilitar una siembra mixta o una siembra en filas cercanas u otro procedimiento de siembra "cerca de la siembra mixta", permitiendo al mismo tiempo la limitación de semillas indeseables en la cosecha final, mientras que incluso se aumente la proporción de plantas fértiles y la disponibilidad de polen en el momento del cruce.
- 10 **[0023]** La descripción describe que el cruce de plantas hembra (macho-estériles) y macho-fértiles puede comprender sembrar las semillas como una mezcla. Se siembra una mezcla de semillas para plantas hembra (macho-estériles) y macho-fértiles en la proporción adecuada.
- 15 **[0024]** La descripción describe que el cruce de plantas fértiles hembra (macho-estériles) y macho puede comprender perforar semillas hembra (macho-estériles) y semillas de plantas macho-fértiles en filas o líneas separadas. Preferentemente, las semillas de plantas hembra (macho-estériles) y las semillas de plantas macho-fértiles se perforan en paralelo. Como alternativa, las semillas macho y hembra se siembran sucesivamente en la misma fila o fila "común". También es posible sembrar hembra y macho usando varias filas o líneas de un tipo, a continuación,
- 20 varias líneas o filas del otro tipo, y así sucesivamente, manteniéndose preferentemente varias a un nivel bajo para asegurar "proximidad cercana", en particular compuesta por 2 o más líneas del mismo tipo de semilla.
- [0025]** Limitar el surtido de semillas de plantas macho comprende pasar una herramienta que se extiende por encima de la altura de las plantas hembra más bajas, pero por debajo del nivel de la altura de las plantas macho-fértiles más altas.
- 25 **[0026]** La herramienta aplica o tiene un medio para aplicar un herbicida a las plantas macho más altas, preferentemente al entrar en contacto con las plantas que se extienden por encima de la altura de las plantas hembra más bajas. A modo de ejemplo, se utiliza un "limpiador de malas hierbas" que es un dispositivo que comprende una
- 30 barra horizontal o soporte que es móvil, preferentemente accionado por motor o sostenido por un vehículo accionado por motor. La altura a la que se coloca la barra es preferentemente ajustable para que el usuario ajuste su altura a la altura de las plantas, preferentemente capaz de ser alterada mientras viaja a través de un cultivo. La barra o soporte está diseñado para entregar un herbicida a las plantas que entran en contacto con la barra o soporte. Por ejemplo, la barra o dispositivo comprende un rodillo o cepillo o una cuerda o una esponja o una cuchilla y/o similares y un herbicida
- 35 se filtra o empapa en él. Los limpiadores de malas hierbas útiles en la invención o adaptables a la invención se describen en la bibliografía, por ejemplo: los documentos CA 2 313 068, GB 2 305 590, US 4 485 588, WO 95/21524, WO 83/00601, EP 058 612, US 4 332 107, US 4 208 835, AU 2006203431.
- [0027]** La descripción describe el uso de una herramienta de corte, por ejemplo, una máquina de cosecha con un nivel muy alto de corte para retirar específicamente las plantas macho más altas o, por ejemplo, con el uso de un
- 40 desmontador de maíz. La herramienta es móvil, preferentemente es accionada por motor o sostenida por un vehículo accionado por motor. La altura a la que se coloca la herramienta de corte es preferentemente ajustable para que el usuario ajuste su altura a la altura de las plantas, preferentemente capaz de alterarse mientras se desplaza a través de un cultivo.
- 45 **[0028]** En una realización, la herramienta, tal como el limpiador de malas hierbas, es accionada por motor y tiene medios para ajustar automáticamente su altura a la altura de las plantas mientras se desplaza a través de un cultivo. Estos medios comprenden sensores para detectar la altura de las plantas hembra y/o macho y para ajustar su altura en función de los datos recuperados por los sensores.
- 50 **[0029]** Las semillas en la presente descripción pueden haberse sembrado como una mezcla con 5 % o más de semillas macho, preferentemente alrededor de 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 15 %, 10 % o 5 %. También pueden haber sido perforadas en filas o líneas respetando esta proporción.
- 55 **[0030]** La relación en la siembra o cruzamiento de semillas o plantas macho-fértiles en contraposición a semillas o plantas hembra (macho-estériles) puede variar de alrededor de 5 % / alrededor de 95 % a alrededor de 50 % / alrededor de 50 %. Mediante el uso de las herramientas de agricultura de precisión, esta relación y otros parámetros como la densidad de siembra pueden adaptarse continuamente en el campo de la producción híbrida para asegurar el mejor rendimiento de semillas híbridas según el suelo y otros datos ambientales.
- 60 **[0031]** La presente invención se aplica a cereales, en particular avena, trigo, cebada, arroz, espelta, triticale, mijo o centeno. Se trata de los siguientes cereales híbridos autógamos: avena (*Avena sativa* que comprende bizantina; *Avena nuda*; *Avena strigosa*), cebada (*Hordeum vulgare*), arroz (*Oryza sativa*), trigo (*Triticum aestivum*), trigo duro (*Triticum durum*), espelta (*Triticum spelta*) y triticale (*Triticosecale*).
- 65

[0032] La herramienta se puede usar tan pronto como las plantas hembra hayan sido suficientemente polinizadas o tan pronto como las plantas hembra hayan terminado de florecer. Por lo tanto, la herramienta se puede utilizar después del inicio y preferentemente al final de la antesis o posantesis de las plantas macho-estériles. Se puede utilizar en cualquier momento entre la antesis y la cosecha de las semillas. Un tratamiento herbicida necesita algún tiempo para afectar las plantas, de modo que se determina que el tiempo de aplicación es eficiente antes de la cosecha dependiendo de la velocidad de acción del herbicida, el número de aplicaciones de herbicidas, las condiciones climáticas, etc., y una vez más, es preferible llevarlo a cabo lo antes posible después de la antesis para optimizar el desarrollo de las plantas macho-estériles en el cultivo. En términos generales, la eliminación (química) se aplicará preferentemente entre la antesis y hasta 30, 20 o 10 días después de la antesis.

[0033] El herbicida utilizado es cualquier herbicida o cualquier otro producto químico que pueda comprometer o detener el crecimiento vegetal y el desarrollo de semillas de cereales mediante una aplicación realizada o eficaz después del inicio de la antesis o en la posantesis y en las condiciones anteriores. Preferentemente, el herbicida es un herbicida sistémico que entra en la planta por acción de contacto con la planta. Preferentemente, este herbicida es capaz de matar plantas en esta etapa de desarrollo. A modo de ejemplo, el herbicida es glifosato o glufosinato, preferentemente es glifosato. El herbicida puede aplicarse una vez o en varias aplicaciones (al menos dos, por ejemplo, 2 o 3). Se puede agregar un adyuvante al herbicida para mejorar su eficiencia, por ejemplo, mejorando el contacto del herbicida con la planta, y puede ser beneficioso. Por lo tanto, se puede añadir un componente para mejorar la permeabilidad y difusión del herbicida en la planta para que la acción sistémica ocurra de manera más eficiente.

[0034] Se podrían usar otros componentes capaces de destruir la planta más alta, por ejemplo, desecantes. Cuando se ha utilizado la herramienta, una o más veces, se puede realizar una eliminación manual adicional de las plantas macho sobrevivientes.

[0035] La descripción describe que limitar la proporción de semillas de plantas macho autofecundadas puede comprender además, después de la cosecha de las semillas, una selección de las semillas para eliminar semillas macho autofecundadas, por ejemplo, selección usando un criterio morfológico o carácter, tal como el tamaño o densidad o forma o composición y/o el algún otro aspecto de las semillas (en particular semillas desecadas o arrugadas prematuramente) y/o usando un carácter fenotípico, por ejemplo, color. Estas semillas prematuras o arrugadas pueden provenir de la acción del herbicida, en particular, de modo no taxativo, de las espigas que brotan del cultivador que se ven afectadas por el herbicida, pero no totalmente destruidas. Los cultivadores secundarios de machos también deben dar semillas si su madurez está lo suficientemente retrasada con respecto al cultivador principal, pero estas semillas deben ser inmaduras en la cosecha: más pequeñas y/o más verdes. Esta eliminación de semillas macho se puede realizar utilizando cualquier procedimiento conocido. La forma más fácil puede ser ordenar por tamaño o densidad siempre que haya una diferencia significativa de tamaño u otro aspecto y esto puede permitir eliminar semillas pequeñas o semillas arrugadas.

[0036] La reivindicación 1 proporciona la clasificación de las semillas por tamaño o densidad para eliminar semillas macho autofecundadas arrugadas no deseadas. Por lo tanto, en una realización preferida, después de la cosecha, se realiza una selección de las semillas por su tamaño o densidad para seleccionar la semilla más grande por su tamaño o semilla más densa por su densidad. Esto permite mejorar la proporción de semillas híbridas en la semilla cosechada en comparación con la semilla establecida en el cultivo.

[0037] Según una característica, limitar las semillas macho autofecundadas comprende también usar un marcador fenotípico asociado con el conjunto macho de plantas y/o con el conjunto hembra de plantas, y este marcador se utiliza, respectivamente, ya sea por separado o con el tamaño u otro aspecto para desechar o retener las semillas que provienen de la autofecundación del conjunto macho de plantas de las semillas híbridas producidas en el conjunto de plantas macho-estériles.

[0038] Un marcador fenotípico se asocia preferentemente al conjunto de plantas macho-estériles, y este marcador se utiliza para desechar adicionalmente las semillas que provienen del conjunto de plantas macho polinizadas autofecundadas de las semillas híbridas.

[0039] La descripción describe que el cruce se puede realizar con una planta macho que es una planta híbrida seleccionada para una mejor capacidad de fertilización cruzada.

[0040] La certificación de semillas híbridas requiere que al menos un porcentaje dado de las semillas cosechadas provenga de la fertilización cruzada y no de la autofecundación. Así, el límite de hibridez de la comercialización híbrida para la certificación europea es actualmente del 90 % para el trigo, la cebada, la colza, el triticale y el arroz. Si asumimos que, en un sistema clásico de producción mixta permanente, la autofecundación del macho es dos veces más frecuente que la polinización cruzada de la hembra, las semillas macho no deben exceder aproximadamente el 5 % del total de semillas parentales sembradas para que las semillas cosechadas permanezcan por encima del umbral de hibridez del 90 %. Esta proporción de semillas macho sembradas con respecto a las hembras puede aumentar debido a la eliminación de las plantas macho después de la antesis y antes de la cosecha y la posible eliminación de las semillas que se emiten de la polinización autofecundada del conjunto macho de plantas. El presente

procedimiento es versátil y permite obtener una cosecha con un porcentaje deseado de semillas macho no deseadas, y este valor puede ser por ejemplo de alrededor de 15, 10, 5, 4, 3, 2 o 1 % con respecto al total de semillas cosechadas después del tratamiento de semillas cosechadas según la invención.

5 **[0041]** La descripción describe que es posible optimizar la relación de plantas macho/hembra sembradas para esta producción híbrida en una combinación particular de líneas endogámicas macho y hembra en un cultivo particular, en una región particular o más generalmente con una consecuencia esperada sobre la fertilización y la producción y el rendimiento de semillas híbridas; tener un mejor conjunto de semillas debido a la estrecha proximidad entre macho y hembra y a la buena dispersión del polen debido a una proporción más favorable entre plantas macho y hembra;

10 que se mejore la densidad de polen de cualquier cultivo, con un efecto positivo en la prevención de la polinización accidental a partir de polen exterior y una consecuencia en la pureza del surtido de semillas cosechadas; obtener un protocolo de siembra más fácil, ya que la siembra de una mezcla de semillas macho y hembra es posible y esto es más fácil y rentable que las tiras de perforación; que los híbridos producidos produzcan más porque contienen más semillas híbridas que responden más que los machos.

15 **[0042]** Las líneas de cereales utilizadas para el procedimiento de la invención son plantas enanas, semienanas o doblemente enanas. La diferencia de altura entre los dos conjuntos de plantas permite una optimización de la difusión del polen de plantas más altas al conjunto de plantas más bajas.

20 **[0043]** En términos generales, la diferencia de altura debe cumplir con las exigencias técnicas de la propia aplicación y se puede estimar que está potencialmente comprendida entre 1 metro y 10 o 20 centímetros o incluso menos. Cuanto más uniforme sea la altura de las plantas o de un cultivo, menor será la diferencia de altura requerida. Esta es la razón por la que una altura diferente de 5 a 20 cm o incluso menor también debe cumplir con la invención. Por otra parte, puede ser desventajoso haber creado una gran diferencia de altura, y utilizar plantas macho demasiado

25 altas, debido al riesgo de alojamiento. Por lo tanto, la diferencia media de altura puede variar de alrededor de 5 cm a alrededor de 1 m, en particular de alrededor de 10 cm a alrededor de 60 cm, preferentemente de alrededor de 20 cm a alrededor de 50 cm.

[0044] Muchos genes enanos y semienanos se conocen en el trigo, por ejemplo:

30

- Rht1 ahora llamado Rht-B1b (4BS), y Rht2 ahora llamado RHT-D1b (4DS) de la variedad japonesa "Norin 10", Rht1 Pearce Stephen (2011), Molecular Characterization of Rht-1 Dwarfing Genes in Hexaploid Wheat. Plant Physiol, Vol 157, págs. 1820-1831.

35

- Rht1s (Rht-B1d), de Saitama 27 Worland AJ y Petrovic S (1988), El gen enano insensible al ácido giberélico de la variedad Saitama 27. Euphytica 38:55-63. (alelo a Rht1).

- Rht3 llamado Rht-B1c (4BS - alelo a Rht-B1b) de Tom Thumb, (véase Kleijer y col. (1984), Euphytica 33: 107-112).

40

- Rht8 (2DS) de la variedad "Akakomugi", Gasperini y col. (2012), Genetic and physiological analysis of Rht8 in bread wheat an alternative source of semi-dwarfism with a reduced sensitivity to brassinosteroides. Journal of Experimental Botany. Vol 63 N.º 12 págs. 4419-4436.

45

- Rht9 (7BS), de la variedad "Akakomugi", Ellis M.H. y col., (2005) Molecular mapping of gibberellin-responsive dwarfing genes in bread wheat. Theoretical and Applied Genetics, 111:423-430.

- Rht10 llamado Rht-D1c (4DS), de la variedad "Taigu" Izumi N y col., Genetic analysis of dwarfness in Triticum aestivum L. Ai_Bian 1, 31, 38-48 (1983).

50

- Y otros RHT4 (2BL), RHT5, RHT7 (2A), RHT12 (5AL), RHT13 (7BS), RHT14, Rht12.

[0045] Pero las plantas enanas también se pueden obtener mediante una selección simple mediante la elección de plantas bajas en poblaciones de fitomejoramiento o a partir de una pirámide de estrategias QTL (Quantitative Trait Loci; en español, loci de rasgo cuantitativo) o GMO (Genetically Modified Organism; en español, organismo

55 genéticamente modificado) de altura.

[0046] En la cebada, también se conocen muchas mutaciones que influyen en la altura de la planta, véase Franckowiak y col., (1987), Coordinator 's report on the semi-dwarf barley collection, Barley Genet News 17:114-115. Los genes del enanismo más frecuentemente utilizados son:

60

- Ari-e GP; Uzu, Sdw1, Sdw3 (2HS) Gottwald y col., (2004) El gen del enanismo insensible al ácido giberélico sdw3 de la cebada se encuentra en el cromosoma 2HS en una región que muestra alta colinealidad con el cromosoma de arroz 7L, Mol Gen Genomics N.º 4, 271: 426-436.

Las plantas de cebada enana también se pueden obtener mediante selección simple a través de la elección de plantas bajas en poblaciones de fitomejoramiento o a partir de una pirámide de estrategias QTL (loci de rango cuantitativo) o GMO (organismo modificado genéticamente) de altura.

5 **[0047]** Las líneas utilizadas para este protocolo pueden ser bajas o altas o enanas o semienanas o plantas doble enanas, independientemente de cómo se produzcan y bajo cualquier modo de control genético. La invención puede comenzar con la creación de una línea baja estéril.

10 **[0048]** Básicamente, el procedimiento requiere una planta hembra (macho-estériles). Se han descrito varios procedimientos para producir tales plantas y son conocidos por el experto en la materia.

15 **[0049]** Algunos esquemas de uso de esterilidad masculina citoplasmática (CMS, por sus siglas en inglés) en trigo se describen en Maan y Lucken (1972), Interacting male sterility restoration Systems for hybrid wheat Research, Crop Science Vol. 12, Franckowiak y col., (1976), A proposal for Hybrid Wheat Utilizing Aegilops squarrosa L. Cytoplasm, Crop Science, Vol. 16, págs. 725-728. Para una revisión, véase Whitford y col., (2013), Hybrid breeding in wheat: technologies to improve hybrid wheat seed production, Journal of experimental Botany, en línea el 31 de octubre de 2013.

20 **[0050]** El uso de CMS has se ha usado para crear híbridos en la cebada: Ahokas H. (1998), Barley, Hybrid Cultivar development in: BANGA, S. S.-BANGA, S. K. (eds), Narosa Nueva Delhi, India., págs. 316-331. Este sistema utiliza los dos citoplasmas CMS conocidos *msm1* y *msm2*. Se conoce una restauración de la fertilidad para ambos genes de esterilidad *Rfm1a* (6H). Véase, respectivamente, Ahorás H. (1979) cytoplasmic male sterility in barley. III maintenance of sterility and restoration of fertility in the *msm1* cytoplasm, Euphytica 28, 409-419 ; Ahorás H. (1982), Cytoplasmic male sterility in barley XI the *msm2* cytoplasm, Genetics 102:285-295 ; Matsui K. (2001) Molecular mapping of a fertility restoration locus (*Rfm1*) for cytoplasmic male sterility in barley (*Hordeum vulgare* L.), Theor Appl Genet, 102:477-482.

30 **[0051]** La producción de cereales híbridos puede basarse en la esterilidad genética masculina (GMS, por sus siglas en inglés) y requiere el cruce de una planta macho-estéril homocigota para un alelo *gms* recesivo y una línea macho-fértil homocigota para un alelo GMS dominante (es decir, natural, normal, fértil) en el mismo gen.

35 **[0052]** En los cereales existen otras formas de producir plantas macho-estériles utilizando sistemas de GMS. La mayoría de estas estrategias se basan en el uso de lo que se llama una línea de mantenimiento, que cuando se autopoliniza da un porcentaje de plantas hembra (macho-estériles) utilizadas para la producción híbrida y un porcentaje de plantas de mantenimiento que se pueden utilizar para la producción adicional de plantas estériles.

[0053] El uso de GMS en el trigo puede implicar:

- 40 ○ *ms1* recesivo (4BS)
- *ms1a* de Pugsley, Suneson y col., Use of Pugsley 's Sterile wheat in Cross breeding, Crop Science 2(6): 534-535.,
- 45 ○ *ms1b* del mutante Probus (mutante de radiación ionizante), Driscoll CJ (1975) Cytogenetic analysis of two chromosomal male-sterility mutants in hexaploid wheat. Australian Journal of Biological Sciences 28:413-416,
- *ms1c* de Cornerstone (mutante de radiación ionizante), Barlow KK y Driscoll CJ (1981) Linkage studies involving two chromosomal male-sterility mutants in hexaploid wheat. Genetics 98: 791-799.
- 50 ○ *ms1d* (FS2, mutante EMS), *ms1e* (FS3), *ms1f* (FS24) mutantes EMS, de Klindworth y col., Chromosomal location of genetic male sterility genes in four mutants of hexaploid wheat, CROP SCIENCE, 2002, 42(5) : 1447-1450,
- *ms1g* de Lanzhou (Zhou KJ y col., (2008,) A new male sterile mutant LZ in wheat (*triticum aestivum* L. Euphytica 159(3): 403-410).

55 **[0054]** La compensación de los efectos de *ms1* en la fertilidad masculina puede implicar:

- 5r de *Secale cereal* L. (con un marcador visual dominante (pedúnculo peludo, *hp*),
- 60 - 2RS, compensación de la fertilidad de la esterilidad del macho Cornerstone del trigo por centeno. Hossain MA y Driscoll CJ Genetics. Mayo de 1983; 104(1): 181-189.
- 4E, véase la publicación de Zhou KJ (2006), The 4E-*ms* system of production hybrid wheat. Crop Science 46, 250-255.

- 5 ◦ Dominant *Ms2* (4DS) *Ta1*, Deng and Gao, The use of a dominant male sterile gene in wheat breeding. Acta Agrom Sinica 6: 85-98(1980); Liu B. y col., A dominant gene for male sterility in wheat. Plant Breed 97: 204-209 (1986). Dominant *Ms3* (5AS) (male sterility EMS mutant KS87UP9) Maan SS y col., chromosome arm location and gene centromere distance of a dominant gene for male sterility in wheat. Crop Sci. 27:494-500 (1987);
- 10 ◦ Dominant *Ms4* (4DS), third dominant male sterility gene in common wheat, Maan SS, Kianian SF, Wheat Information Service, 93: 27-31;
- 10 ◦ Recessive *ms5* (3AL) (FS20, mutante EMS) de Klindworth y col., Chromosomal location of genetic male sterility genes in four mutants of hexaploid wheat, CROP SCIENCE, 2002, 42(5): 1447-1450.
- 15 **[0055]** Existen otros sistemas de esterilidad masculina, pero la esterilidad se basa en condiciones externas: *wptms1* (5B) y *wptms2* (5B) de Guo y col., 2006 (Theor Appl Genet 112:1271-1276) y *Wptms3* (1BS) de Chen y col., (Biomed & Biotechnol) son sensibles a fotoperíodos térmicos.
- 20 **[0056]** Se han identificado muchos genes de esterilidad masculina génicos o genéticos *msg* en la cebada, véase Ahokas H. (1998) Barley, Hybrid Cultivar development in: BANGA, S. S.-BANGA, S. K. (eds), Narosa Nueva Delhi, India., págs. 316-331.
- 25 **[0057]** Los marcadores genéticos de ADN están disponibles para la mayoría de estas mutaciones, si no todas, pero los marcadores fenotípicos (es decir, visibles) también se pueden usar para seguir, por ejemplo, alelos que compensan la presencia de un gen *gms*. Algunos marcadores asociados con el pericarpio azul o el color rojo existen y se pueden utilizar para facilitar la recuperación de semillas estériles o fértiles, por ejemplo.
- 30 a- Use of Chromosome Addition Lines to compensate for genic male sterility:
- 35 **[0058]** This way to create hybrids was the first developed in barley Ramage R. T. (1965, 1991), Balanced tertiary trisomics for use in hybrid seed production, Crop. Sci. 5, 177-178. Chromosome manipulation in barley breeding, cap. 18, Chromosome Engineering in Plants: Genetics, Breeding, Evolution, publicado por P.K. Gupta, T. Tsuchiya, págs. 385-400.
- 40 **[0059]** En el trigo, el primer ejemplo del uso de líneas de adición se describe en el sistema XYZ de Discroll (1972, 1985, 1986), XYZ system of producing hybrid wheat, Crop Sci. 12: 516-517 (1972), Modified XYZ system of producing hybrid wheat; Crop Science Vol. 25 págs. 1115-1116 (1985), Nuclear male sterility systems in seed production of hybrid varieties, CRC Critical Reviews in Plant Sciences, Vol. 3, número 3, págs. 227-256, y Driscoll (1986). Este sistema se basa en el uso de una mutación recesiva homóloga para la esterilidad masculina y el uso de una línea "restauradora" que contiene un cromosoma adicional que porta un gen "restaurador" en una o dos copias según la versión del sistema XYZ.
- 45 **[0060]** El cromosoma compensador también puede contener un marcador fenotípico, por ejemplo, el marcador de cuello peludo del cromosoma 5R de *Secale cereal* L. Discroll (1972), Hossain and Discroll (1983), Fertility compensation of Cornestone male sterility of wheat by rye Genetics 104:181-189. Otros orígenes del restaurador de la fertilidad han sido probados en Driscoll (1985). El isocromosoma de brazo alfa de *Triticum urartu*, Jakubz, cromosoma 4 o el isocromosoma de brazo largo de un cromosoma de cebada modificado 4HmL.
- 50 **[0061]** Se puede añadir un marcador genético de color fenotípico al sistema descrito anteriormente para seguir el gen compensador en la progenie; el marcador puede permitir la separación de semillas en la progenie como se describe en el documento WO 92/01366. El marcador de color fenotípico puede ser aleurona azul del cromosoma 4 de *Agropyron elongatum* (4g), véase Zeller y col., (1991), Theor Appl Genet. 81(4):551-8, y Zeven A.C., (1991), Wheats with purple and blue grains: a review, Euphytica 56: 243-258. Este marcador azul se transloca en el alelo 4 dominante - cromosoma de *Triticum thaoudar*, *Triticum monococcum* o *Triticum urartu*. Este cromosoma translocado se utiliza, además, como cromosoma adicional en el sistema XYZ.
- 55 **[0062]** El sistema 4E/MS descrito en Zhou KJ y col. (2006), El sistema 4E-ms de producción de trigo híbrido, Crop Science 46, 250-255, utiliza una línea de adición: 4E (*Agropyron elongatum*) que porta el color de aleurona azul del gen Ba de *Agropyron spp.* (Bolton EF (1968) Herencia de aleurona azul y pericarpio púrpura en trigo hexaploide. PhD diss. Colorado Stat Univ. Fort Colins CO) con un "efecto de dosificación génica" y el análogo natural dominante, MS1, que compensa la presencia de los alelos de esterilidad masculina *ms1*.
- 60 **[0063]** Un sistema similar ha sido desarrollado por Huang S.S. y col. (1991), The development of a blue marked nucleus male sterile line and its maintainer in bread wheat, Acta Agronomica Sinica. 17:81-87.
- 65 **[0064]** El marcador fenotípico asociado con la esterilidad también puede estar unido al gen del tamaño de la planta tal como una mutación *rht*. Por ejemplo, el marcador de semilla azul se puede agregar a un cromosoma que

contiene el gen Ms2 dominante para la esterilidad masculina y Rht-D1c (enanismo). Tian y Liu (2001). Development of dominant nuclear male-sterile lines with a blue seed marker in durum and common wheat, *Plant Breeding* 120, 79-81. El uso potencial de esta línea adicional se analiza en Zong-Jun Pu y col. (2005). Studies on breeding of dominant nuclear dwarf male sterile lines with a blue seed marker in common wheat, *Servicios de Información sobre Trigo* 5 número 99: 46-50.

b- Uso de línea de sustitución de adición.

10 **[0065]** Otra forma de obtener cereales híbridos se describe en el documento WO 92/01366. La línea restauradora homogénea para 4B que contiene la mutación recesiva para esterilidad y el cromosoma 4 translocado adicional, que contiene el marcador de color azul y el gen restaurador, se autopoliniza para obtener una línea de sustitución 2n heteróloga para 4B, que contiene un cromosoma que porta la mutación recesiva y ningún marcador de color, y el cromosoma que contiene la translocación.

15 **[0066]** King y col. (1991) describen un protocolo derivado. Induction of a mutation in the male fertility gene of the preferentially transmitted *Aegilops sharonensis* chromosome 4S and its application for hybrid wheat production, *Euphytica* 54: 33-39.

20 **[0067]** En el documento WO 93/13649, se describe otra línea restauradora de fertilidad que sale de la línea anterior después del cruce entre los dos cromosomas 4S. Esta translocación debe obtenerse con el uso de un mutante de trigo con apareamiento alterado de cromosomas homólogos, por ejemplo: (*ph1* o *ph2*), Sutton T. (2003), *The Plant Journal* 36, 443-456 Able J. (2006). *Trends in Plant Science*, vol. 11 N.º 6, y Choon-Lin Tiang y col. (2012). *Plant Physiol*, vol. 158, págs. 26-34.

25 **[0068]** Otras formas diferentes de crear híbridos de trigo se describen en el documento WO 03/057848.

[0069] Algunas estrategias de GMO para crear plantas macho-estériles o hembra se describen, por ejemplo, en el documento WO 2005/005641 (véase también Whitford y col., (2013) Hybrid breeding in wheat: technologies to improve hybrid wheat seed production, *Journal of Experimental Botany*, advances Access publicado el 31 de octubre).

30 **[0070]** La descripción también describe el uso de una planta macho que es más vigorosa, de modo que el híbrido pueda obtener una mejor polinización. El macho híbrido debe ser un restaurador completo de la hembra estéril. Por ejemplo, si la esterilidad femenina se basa en ms recesivos homocigotos (como en los 4E-ms), el macho necesita ser homocigoto natural.

35 **[0071]** Como se explicó anteriormente, las plantas macho pueden estar aún presentes en el momento de la cosecha y el surtido de semillas cosechadas aún puede contener semillas macho autofecundadas. Los marcadores fenotípicos o el procesamiento de semillas se pueden utilizar para ayudar a la eliminación de esas semillas indeseables después de la cosecha y para aumentar el nivel de las semillas híbridas en el producto comercial.

40 **[0072]** Por ejemplo, se puede utilizar un equipo de limpieza de semillas, tamizado de semillas, un clasificador de semillas, una mesa de gravedad, aspiración, un clasificador alveolar, un clasificador óptico de semillas. Por ejemplo, se pueden usar líneas parentales con una diferencia apreciable en TGW (peso de miles de granos) y la selección se puede hacer en un dispositivo separador "Petkus" (el documento US 8.502.019).

45 **[0073]** Otro ejemplo es el uso de genes de color de grano rojo/blanco (Sherman J.D. y col. (2008): *Microsatellite markers for kernel colour genes in wheat. Crop Science*, 48: 1419-1424): The red colour of wheat seeds is controlled by dominant alleles at one or more of three genes: namely R-A1b (on chromosome 3AL), R-B1b (on 3BL) and R-D1b (on 3DL) (Sherman y col., 2008). Hay un "efecto dosificador" de estos alelos rojos: cuantos más alelos rojos lleva una semilla, más intenso es el color rojo. El color blanco se puede obtener en ausencia de los alelos rojos en el locus 3 (r-a1b, r-b1b y r-d1b).

50 **[0074]** El color rojo se expresa maternalmente con la coloración de los tejidos diploides del pericarpio. Esto significa que cualquiera que sea el cruce, las semillas F1 serán del mismo color que la progenitora hembra. Dependiendo del color de la semilla y de la dureza del grano, el grano de trigo producido y la consiguiente harina molida a partir de él pueden clasificarse en diferentes clases de mercado: el trigo rojo y el trigo blanco granulado son preferidos por determinados mercados.

60 **[0075]** Por lo tanto, es posible clasificar, si no todas, la mayoría de las semillas macho de un lote de semillas híbridas mediante el uso de una diferencia de color entre las semillas macho y las semillas híbridas, por ejemplo:

• con una línea macho de semilla blanca (r-a1b, r-b1b y r-d1b homocigotas) y una línea hembra de semilla roja (R-A1b, r-b1b y r-d1b/ r-a1b, R-B1b y R-D1b OR R-A1b, R-B1b y R-D1b homocigotas), las semillas híbridas serán rojas y las semillas macho de autopolinización serán blancas.

• con una línea macho de semillas rojas (R-A1b, r-b1b y r-d1b/ r-a1b, R-B1b y r-d1b/ r-a1b, r-b1b y R-D1b/ R-A1b, R-B1b y r-d1b/ R-A1b, r-b1b y R-D1b/r-a1b, R-B1b y R-D1b OR R-A1b, R-B1b y R-D1b homocigotas) y una línea hembra de semillas blancas (r-a1b, r-b1b y r-d1b homocigotas), las semillas híbridas serán blancas y las semillas macho de autopolinización serán rojas.

• con una línea macho sembrada de color rojo claro (R-A1b, r-b1b y r-d1b/ r-a1b, R-B1b y r-d1b/ r-a1b, r-b1b y R-D1b homocigotas) y con una línea hembra sembrada de color rojo oscuro (R-A1b, R-B1b y R-D1b homocigotas), las semillas híbridas serán de color rojo oscuro y las semillas macho autopolinizadas serán de color rojo claro.

• con una línea macho sembrada de color rojo oscuro (R-A1b, R-B1b y R-D1b homocigotas) y una línea hembra sembrada de rojo claro (R-A1b, r-b1b y r-d1b/ r-a1b, R-B1b y r-d1b/r-a1b, r-b1b y R-D1b homocigotas), las semillas híbridas serán de color rojo claro y las semillas macho autopolinizadas serán de color rojo oscuro.

15 **[0076]** Las semillas de la próxima generación (F2) del primer híbrido serán rojas en cualquier situación ya que las plantas híbridas serían homocigotas para uno de los tres genes rojos.

[0077] La clasificación de semillas se puede lograr utilizando cualquier máquina de clasificación óptica convencional capaz de separar semillas blancas de semillas rojas o semillas rojas claras de semillas rojas oscuras. La clasificación de semillas para estos colores utilizando NIR se describe en Wang y col., (1999)., Single Wheat Kernel Colour Classification by Using Near-Infrared reflectance Spectra Cereal Chemistry, vol. 76, N.º 1.

[0078] Las semillas también se pueden clasificar por su tamaño en un tamiz específico (2,8 mm, por ejemplo) para eliminar semillas más pequeñas o arrugadas, que generalmente son de menor tamaño que los híbridos.

[0079] La presente invención se ilustrará ahora mediante ejemplos no limitantes

[0080] La figura 1 es un esquema de un experimento de campo no limitante.

30 Ejemplo 1: trigo

[0081] Para crear la diferencia de altura deseada, se utilizaron los genes enanos disponibles en trigo. Se utilizó un Rht-B1b/Rht-B1b hembra enana doble, Rht-D1b/Rht-D1b (alelos con efectos aditivos) en combinación con un Rht-B1a/Rht-B1a Rht-D1a/Rht-D1a macho natural. Preferentemente, el macho natural no es susceptible al alojamiento. Preferentemente, el híbrido Rht-B1b/Rht-B1a, Rht-D1b/Rht-D1a se elige para tener una altura intermedia, cercana a la de una línea comercial (principalmente Rht-B1b/Rht-B1b, Rht-D1a/Rht-D1a o Rht-B1a/Rht-B1a, Rht-D1b/ Rht-D1b).

Determinación de la reducción del surtido de semillas mediante la aplicación de glifosato posantesis

40 • Prueba de campo en diferentes genotipos

[0082] En la posantesis, las plantas de 5 líneas europeas de élite de trigo de invierno se trataron aplicando a mano a las espigas un cepillo empapado con una solución de glifosato a 120 g/l (recomendado para la limpieza de malas hierbas en el Reino Unido). En su plena madurez, se cosecharon las espigas de las plantas tratadas y no tratadas del tallo principal, así como de los cultivadores, y se determinó su fertilidad y se expresó como la proporción número de semillas/espiguilla. Se cosecharon de 7 a 12 repeticiones de plantas no tratadas y de 20 a 24 repeticiones de plantas tratadas para cada una de las 5 líneas élite.

Tabla 1: resultados de las pruebas de campo

		Semillas/Espiguilla			% de semillas no germinantes	
		Valor medio	Desviación estándar	Repeticiones	Total de semillas analizadas	%
Alixan	NO TRATADO	2,14	0,6	12	60	8,3 %
Alixan	TRATADO	2,36	0,5	22	120	90,0%
Allezy	NO TRATADO	1,70	0,5	7	60	5,0 %
Allezy	TRATADO	2,12	0,5	24	120	68,3v%
Altigo	NO TRATADO	1,94	0,4	10	60	31,7 %
Altigo	TRATADO	2,02	0,4	22	120	69,2%
Buster	NO TRATADO	2,09	0,9	10	60	16,7%

(continuación)

		Semillas/Espiguilla			% de semillas no germinantes	
		Valor medio	Desviación estándar	Repeticiones	Total de semillas analizadas	%
Buster	TRATADO	2,12	0,7	22	120	78,3 %
Charger	NO TRATADO	1,79	0,9	8	60	13,3%
Charger	TRATADO	2,04	0,7	20	120	85,0 %
MEDIA	NO TRATADO	1,93	0,66	9	60	15,0 %
MEDIA	TRATADO	2,13	0,58	22	120	78,2%

[0083] Como cabe concluir de la tabla anterior, el número medio de semillas por espiguillas (valor medio) de plantas no tratadas fue de 1,93 (desviación estándar de 0,66) y la fertilidad de las espigas de las plantas tratadas fue de 2,13 (desviación estándar de 0,58). El conjunto de semillas de plantas no tratadas y tratadas no fue estadísticamente diferente. Este experimento de tratamiento con herbicidas no redujo significativamente el número de semillas por espiga cosechada.

[0084] Sin embargo, las semillas de las espigas tratadas se arrugaron en comparación con las semillas de las espigas no tratadas. Estas semillas arrugadas eran de menor tamaño y relativamente fáciles de eliminar durante el procesamiento de semillas poscosecha. Es poco probable que las semillas arrugadas se conviertan en una planta normal. En promedio, el 78,2 % de las semillas de las espigas tratadas (120 semillas analizadas por línea) fueron inviábiles (no germinan) en comparación con el 15,0 % de las semillas de las espigas no tratadas (60 semillas analizadas por línea).

- 15 • Prueba de invernadero de la periodicidad de la aplicación de herbicidas

[0085] Se realizó un experimento en nuestro invernadero aplicando una solución de glifosato a 120g/l a la espiga principal de las plantas del cultivar Apache con un cepillo antigotas empapado en las 4 etapas de desarrollo siguientes:

- 25 • Espiga principal en la antesis (tratamiento 1),
 • Espiga principal en la posantesis, sin cultivador secundario aún en la antesis (tratamiento 2),
 • Espiga principal en la posantesis, cultivador(es) secundario(s) en la antesis (tratamiento 3),
 • Espiga principal en la posantesis, cultivador(es) secundario(s) en la posantesis (tratamiento 4),

[0086] Se trataron al menos 10 espigas por tratamiento con glifosato. Se cosecharon y trillaron las espigas principales (denominadas adicionalmente "espigas del tallo principal"), así como las espigas de cultivadores (denominadas adicionalmente "espigas de tallos secundarios") para determinar el conjunto de semillas/espiga.

30

Tabla 2: resultados de la prueba de invernadero

Tratamientos	TALLO PRINCIPAL DE LAS ESPIGAS				TALLOS SECUNDARIOS DE LAS ESPIGAS			
	Número	CONJUNTO DE SEMILLAS			Número	CONJUNTO DE SEMILLAS		
		MEDIA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	arrugado		MEDIA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	arrugado
no tratado	19	34,2	10,7	2,9 %	28	25,9	9,1	5,8%
1	19	0			20	10,8	17,2	0%
2	18	6,7	11,9	60,0%	22	14,2	18,6	10,5%
3	15	30,3	6,4	100,0 %	25	22,8	15,3	42,3%
4	14	38,1	6,8	67,4%	18	34,7	13,7	11,8%

[0087] Como puede observarse en la tabla anterior 2, para las espigas no tratadas (control), el conjunto de semillas/espiga promedio en 19 espigas fue de 34,2 en los tallos principales y de 25,9 en 28 espigas en los tallos secundarios.

[0088] Para las espigas tratadas con el tratamiento 1, no se produjeron semillas en las espigas de los tallos principales y la semilla fijada en las espigas de los tallos secundarios se redujo en gran medida en comparación con

el control de tratamiento no tratado (en promedio 10,8 contra 25,9).

[0089] Para las espigas tratadas con el tratamiento 2, es decir, tratadas justo posantesis, las espigas de los tallos principales produjeron en promedio solo el 19,6 % del conjunto de semillas producido por las espigas no tratadas.

5 La mayoría de esas semillas estaban arrugadas (60 %). Las espigas en los cultivadores secundarios estuvieron lejos de producir conjuntos de semillas normales (14,2).

[0090] Para las espigas tratadas con el tratamiento 3, los conjuntos de semillas de las espigas principales tratadas mostraron una fertilidad cercana a la normal, pero produjeron solo semillas arrugadas. Las espigas en los cultivadores secundarios mostraron una fertilidad relativamente normal, pero el 42,3 % de las semillas producidas se arrugaron.

[0091] Para las espigas tratadas con el tratamiento 4, el tratamiento con glifosato realizado posantesis a nivel de planta no impidió la fecundidad, pero en la espiga principal tratada la mayoría de las semillas están arrugadas (67,4 %). El conjunto de semillas altas en cultivadores no tratados podría ser un efecto de la redistribución de nutrientes dentro de la planta.

[0092] La conclusión de este experimento es que cada espiga tratada en la posantesis fue capaz de fijar semillas, pero que la mayoría (67,4 %) de esas semillas se arrugaron y se habrían eliminado durante el procesamiento de las semillas. La difusión del glifosato dentro de la planta pareció afectar la fertilidad de una espiga no tratada en la misma planta a menos que las espigas no tratadas hubieran alcanzado la antesis. Dado que el tratamiento con glifosato solo se implementará cuando toda la planta haya terminado de florecer, cada espiga no alcanzada directamente por el tratamiento debería ser capaz de producir una mayoría de las semillas viables, pero estas semillas están principalmente arrugadas. Incluso si no se ofrece una eliminación completa de las semillas macho, un tratamiento posantesis con glifosato reducirá significativamente el surtido de semillas macho, permitiendo mejorar la proporción hembra/macho en el sistema de producción mixto.

[0093] La capacidad de producir plántulas viables se probará en el subconjunto de semillas de los tratamientos "no tratados" y "tratamiento 4".

30

[0094] El mismo experimento se ha repetido en la línea élite Alixan.

Ensayo de campo en una producción simulada de rodal mixto

35 **[0095]** Se implementó una prueba de simulación para producción híbrida. Una variedad comercial baja (Courtot, Rht-B1b - Rht-D1b homocigota), una línea enana fértil, simula la "hembra" y una variedad comercial alta natural (Alhambra, Rht-B1a - Rht-D1a homocigota), una línea media alta fértil, simula el "macho". Estas dos líneas tienen una precocidad similar y se mezclaron en la siembra con las siguientes tasas:

- 40 • 95 % de Courtot mezclado con 5 % de Alhambra,
- 90 % de Courtot mezclado con 10 % de Alhambra,
- 85% de Courtot mezclado con 15 % de Alhambra,
- 45 • 80% de Courtot mezclado con 20 % de Alhambra,

Se incluyeron dos controles, respectivamente, con 100 % de Courtot y 100 % de Alhambra.

50 **[0096]** La Figura 1 es un esquema del experimento de campo, cada caja representa un bloque o una parcela de 1,5 m x 6 m, con descripción de las especies sembradas: Courtot (siembra de semilla Courtot solamente), Alhambra (siembra de semillas Alhambra solamente), Courtot-AL-95/5 (siembra de una mezcla de 95 % de Courtot y 5 % de Alhambra), Courtot-AL-90/10 (siembra de una mezcla de 90 % de Courtot y 10 % de Alhambra), Courtot-AL-85/15 (siembra de una mezcla de 85 % de Courtot y 15 % de Alhambra), Courtot-AL-80/20 (siembra de una mezcla de 80 % de Courtot y 20 % de Alhambra).

[0097] Leyendas: la situación en el campo se da cruzando el número de parcelas a la izquierda en la Figura 1 y el número en la parte inferior de la Figura 1:

- 60 - Parcelas situadas en 13-18/2, 13-18/5, 7-12/3 y 1-6/4: sin tratamiento
- Parcelas situadas a 13-18/3, 7-12/4, 1-6/2 y 1-6/5: 1 tratamiento
- Parcelas situadas en 13-18/4, 7-12/2, 7-12/5 (parcelas no consideradas en los resultados) y 1-6/3: 2 tratamientos.

[0098] En la cosecha, el conjunto de semillas en la hembra se consideran semillas híbridas virtuales. En consecuencia, el experimento está un poco sesgado, ya que este conjunto de semillas híbridas virtuales es bastante

óptimo. El glifosato a 120 g/l se aplica después de la antesis en las plantas «macho» con una esponja empapada con una aplicación unidireccional (1 tratamiento) o una aplicación bidireccional (opuesta) (2 tratamientos). Se realizaron cuatro repeticiones para cada condición según el experimento de campo descrito en la figura 1.

5 **[0099]** Los resultados se encuentran en la tabla 3: en las parcelas solo con Alhambra, observamos un alojamiento de moderado a fuerte, lo que explica el rendimiento reducido. Por contrato, no se observó alojamiento de Alhambra en las parcelas de Courtot-Alhambra: Courtot está actuando como soporte. En consecuencia, la susceptibilidad de alojamiento del macho podría reducirse significativamente en un sistema de producción de rodal mixto. El tratamiento en las espigas de Alhambra, cuya consecuencia es la reducción de sus conjuntos de semillas, limitó el rendimiento en las parcelas mixtas hasta el 51,8 % (Mix Courtot-AL-80/20, 2 tratamientos). Este resultado indica que el porcentaje de plantas macho en la producción híbrida tiene que restringirse para limitar el impacto en el rendimiento de la hembra.

15 Tabla 3: resultados de rendimiento para parcelas sembradas con Courtot o Alhambra sola o mezcla de semillas de Courtot y Alhambra. Resultados en toneladas/ha. El % de reducción es la reducción del rendimiento para una combinación de siembra Courtot y Alhambra con uno o dos tratamientos relacionados con la misma condición sin tratamiento.

	RENDIMIENTO en toneladas				
	0 tratamiento		1 tratamiento		2 tratamientos
	tonelada/ha	tonelada/ha	% de reducción	tonelada/ha	% de reducción
Alhambra	3,63	5,98		5,60	
Courtot	5,88	5,26		5,66	
Courtot-AL-80/20	5,53	3,44	37,7%	2,67	51,8%
Courtot-AL-85/15	5,19	3,17	38,8 %	3,17	38,8 %
Courtot-AL-90/10	5,76	3,95	31,4 %	3,67	36,3%
Courtot-AL-95/5	5,37	4,41	17,8 %	4,28	20,1%

20 **[0100]** Se utilizaron marcadores moleculares en los genes Rht-B1b y Rht-D1b para identificar semillas Courtot (que representan semillas híbridas en nuestro modelo) y semillas Alhambra que representan semillas macho en nuestro modelo. Se analizaron 24 semillas de cada parcela individual y los resultados se muestran en la tabla 4.

25 **[0101]** Debido a la confluencia de la planta macho alta sobre las plantas hembra bajas, la cantidad de semilla macho sobre la cantidad de semilla hembra se duplica aproximadamente en la cosecha frente a la cantidad en la siembra en la condición sin tratamiento. Por ejemplo, en la mezcla "Courtot-Alhambra-90 %/10 %", Alhambra representó el 10 % de las semillas en la siembra, pero su proporción aumentó al 19,7 % en la cosecha. Sin una destrucción o eliminación parcial masculina, una producción de rodal mixto con un macho alto no sería viable. Una aplicación de sentido doble/en ambos sentidos parece más eficaz que una sola aplicación. Por ejemplo, en la mezcla "Courtot-Alhambra-90 %/10 %" y con un tratamiento bidireccional, la proporción de semillas de Alhambra en la cosecha se redujo a 2,2 % lo que se traduce en una hibridez del 97,8 %. Con una aplicación doble/en ambos sentidos, la "hibridez" de los lotes cosechados está siempre por encima del 90 %.

35 Tabla 4: para cada mezcla de semillas y cada tratamiento, se indica el porcentaje de semillas "macho" (Alhambra) en la siembra y en la cosecha. La hibridez virtual se calcula como el porcentaje de "semillas hembra" (Courtot) en el lote cosechado. El tratamiento 0 corresponde a gráficas sin tratamiento, el tratamiento 1 a gráficas con un tratamiento con glifosato en una aplicación y el tratamiento 2 al tratamiento con glifosato con aplicaciones bidireccionales. La "siembra" corresponde al porcentaje de semillas de Alhambra en la siembra mixta y la "cosecha" al porcentaje de semillas de Alhambra en las semillas cosechadas.

	Tratamiento	% de ALHAMBRA		% de hibridez virtual
		SIEMBRA	COSECHA	
Courtot-Alhambra-80 %/20 %	0	20	35,8	64,2
	1	20	24,1	75,9
	2	20	5,1	94,9
Courtot-Alhambra-85 %/15 %	0	15	37,5	62,5
	1	15	10,1	89,9
	2	15	2,4	97,6

(continuación)

	Tratamiento	% de ALHAMBRA		% de hibridez virtual
		SIEMBRA	COSECHA	
Courtot-Alhambra- 90 %/10 %	0	10	19,7	80,3
	1	10	10,8	89,2
	2	10	2,2	97,8
Courtot-Alhambra- 95 %/5 %	0	5	11,6	88,4
	1	5	3,4	96,6
	2	5	0,0	100
Alhambra	0	100	100,0	
	1	100	98,9	
	2	100	96,7	
Courtot	0	0	0,0	100
	1	0	0,0	100
	2	0	0,0	100

Ejemplo 2: cebada

5

[0102] Las pruebas preliminares de aplicación de herbicidas se realizaron en el verano de 2013, cuando se aplicó glifosato, a la tasa recomendada por el proveedor, a plantas de cebada alta en parcelas de cebada más baja utilizando un limpiador de malas hierbas. Se observó que la cebada alta se puede destruir sin dañar las plantas semienanas de cebada presentes en las mismas parcelas.

10

[0103] El mismo experimento se realizó con una herramienta de corte en una mezcla de plantas altas y más bajas y las plantas altas se pueden cortar selectivamente.

15

[0104] También se realizó una producción híbrida entre dos líneas de cebada, designadas genotipos A y B. El conjunto de semillas cosechadas se abonó usando un dispositivo de clasificación de semillas. Se produjeron tres grados de semillas diferentes con tamaños de semillas grandes: superior a 2,8 mm, medio, es decir, superior a 2,5 mm y pequeño, es decir, inferior a 2,5 mm. Un análisis molecular de estos lotes de semillas mostró que las semillas híbridas se encuentran principalmente en el primer lote, con un tamaño de semilla mayor. La proporción de semillas híbridas que no se han clasificado fue del 72 %, mientras que la proporción de semillas híbridas en la submuestra superior de 2,8 mm fue del 96 %.

20

[0105] Este experimento demostró que el uso de un dispositivo de clasificación de semillas puede aumentar la proporción de semillas híbridas en lotes de semillas cosechadas.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para limitar la proporción de semillas de cereales autofecundadas macho en un surtido de semillas de un campo que contiene un rodal de plantas polinizadas hembra macho-estériles más bajas con un rodal de plantas macho-fértiles más altas, donde las plantas polinizadas macho-estériles hembra más bajas son plantas enanas, semienanas o doble enanas, el procedimiento comprende pasar una herramienta que se extiende por encima de la altura de las plantas hembra más bajas entre la antesis y la cosecha, la herramienta aplica un herbicida a las plantas macho-fértiles que se encuentran por encima de la altura de las plantas hembra más bajas, por medio del cual se previene o reduce el desarrollo de las plantas macho-fértiles que se encuentran por encima de esta altura y, después de cosechar las semillas, se clasifican las semillas por tamaño o densidad para eliminar semillas macho arrugadas autofecundadas no deseadas.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las plantas fértiles hembra macho-estériles y macho están en filas comunes o separadas.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que dicha herramienta es un limpiador de malas hierbas.
4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que el herbicida utilizado es sistémico, preferentemente el herbicida comprende glifosato.
5. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que, después de la cosecha, se realiza, además, una selección de las semillas para retirar semillas macho autofecundadas no deseadas, utilizando un carácter fenotípico.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que un marcador fenotípico se asocia con el conjunto fértil hembra macho-estéril y/o macho de plantas, y este marcador se utiliza para desechar, además, semillas que provienen de plantas macho autofecundadas de las semillas híbridas.
7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que el marcador fenotípico es color.
8. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el cereal es avena, trigo, cebada, arroz, espelta, triticale, mijo o centeno.
9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la herramienta comprende una barra horizontal que es móvil, accionada por motor o sostenida por un vehículo accionado por motor.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que la altura a la que se coloca la barra es ajustable.
11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que la altura de la barra se puede alterar mientras se desplaza a través de un cultivo.
12. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la aplicación del producto químico produce semillas macho desecadas o arrugadas prematuramente, y estas semillas se pueden eliminar mediante la clasificación de densidad.
13. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el producto químico se aplica entre la antesis y hasta 30, 20 o 10 días después de la antesis.