

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 809 217**

51 Int. Cl.:

A01H 1/08

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.09.2006** **E 17183839 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2020** **EP 3300590**

54 Título: **Duplicación de cromosomas en embriones de maíz haploides**

30 Prioridad:

21.09.2005 US 718989 P

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

03.03.2021

73 Titular/es:

PIONEER HI-BRED INTERNATIONAL, INC.

(50.0%)

7100 N.W. 62nd Avenue, Box 1014

Johnston, IA 50131-1014, US y

E. I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY

(50.0%)

72 Inventor/es:

BARTON, JOANNE E;

MADDOCK, SHEILA E.;

WU, XINLI E.;

ZHAO, ZUO-YU;

HUSSAIN, TANVEER;

GORDON-KAMM, WILLIAM J. y

WILLIAMS, MARK E.

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 809 217 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

Duplicación de cromosomas en embriones de maíz haploides

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la mejora vegetal y la fabricación de plantas haploides duplicadas.

Antecedentes de la invención

10 Las plantas homocigotas son básicas para el desarrollo de productos y la comercialización de plantas. Para obtener plantas homocigotas se requieren varias generaciones de autopolinización y análisis de segregación. Este es un uso ineficaz de mano de obra y recursos de tiempo. Por lo tanto, sería útil desarrollar un método para reducir las etapas de polinización manual que normalmente se requieren para obtener una planta homocigótica y reducir la cantidad de tiempo requerido para obtener una población homocigota de plantas. Una forma de obtener plantas homocigotas sin la necesidad de autopolinizar varias generaciones es producir haploides y después duplicar los cromosomas para formar haploides duplicados. El documento WO02/085104 proporciona métodos para transformar plantas.

Compendio de la invención

20 Se proporcionan métodos para producir plantas, semillas y células vegetales haploides duplicadas. Los métodos presentados aumentan la eficacia del proceso de haploides duplicados al aumentar el número de haploides duplicados obtenidos y al disminuir la cantidad de tiempo requerido para producir los haploides duplicados.

25 La invención proporciona un método para obtener una planta de maíz haploide duplicada que comprende:

- (a) aislar un embrión haploide inmaduro obtenido polinizando sedas de una mazorca de maíz con una línea inductora de maíz;
- (b) poner en contacto dicho scutellum de embrión haploide aislado hacia arriba en un medio de cultivo de embriones que contiene un agente de duplicación cromosómica para producir al menos una célula embrionaria haploide duplicada;
- (c) cultivar dicho scutellum de embrión aislado hacia abajo en un medio de maduración de embrión que no contiene un agente de duplicación cromosómica para generar una planta de maíz haploide duplicada a partir de dicha célula embrionaria haploide duplicada;

35 en donde la etapa (b) se produce 4-21 días después de la polinización; y en donde la línea inductora contiene un gen marcador que se expresa en el tejido embrionario y dicho gen marcador se expresa 4 o más días después de la polinización.

40 Descripción detallada de la invención

Una planta haploide tiene un conjunto único (genoma) de cromosomas y el número reducido de cromosomas (n) en la planta haploide es igual al del gameto.

45 Una planta diploide tiene dos conjuntos (genomas) de cromosomas y el número de cromosomas (2n) es igual al del cigoto.

50 Un haploide duplicado o planta o célula haploide duplicada es aquella que se desarrolla por la duplicación de un conjunto haploide de cromosomas. Una planta o semilla que se obtiene de una planta haploide duplicada que se autosiembra cualquier número de generaciones aún puede identificarse como una planta haploide duplicada. Una planta haploide duplicada se considera una planta homocigota. Se considera que una planta es haploide duplicada si es fértil, incluso si toda la parte vegetativa de la planta no consiste en las células con el conjunto duplicado de cromosomas. Por ejemplo, una planta se considerará una planta haploide duplicada si contiene gametos viables, incluso si es quimérica.

55 Un "embrión inmaduro haploide" se define como el embrión formado después de que un núcleo de esperma a partir de un grano de polen se fusione con los núcleos polares en el saco embrionario para crear un endospermo triploide (3N) y antes de secarse.

60 Un "embrión haploide duplicado" es un embrión que tiene una o más células que contienen 2 juegos de cromosomas homocigotos.

"Callo" se refiere a una masa proliferativa desdiferenciada de células o tejidos.

65 Las frases "poner en contacto", "entra en contacto con" o "puesto en contacto con" pueden usarse para significar "contacto directo" o "contacto indirecto". Por ejemplo, el medio que comprende un agente de duplicación puede tener

contacto directo con la célula haploide o el medio que comprende el agente de duplicación puede estar separado de la célula haploide mediante papel de filtro, tejidos vegetales u otras células, por lo tanto, el agente de duplicación se transfiere a través del papel de filtro o las células a la célula haploide.

- 5 El término "medio" incluye compuestos en estado líquido, gaseoso o sólido.

Como se usa en el presente documento, el término "planta" incluye la referencia a plantas enteras, órganos de plantas (por ejemplo, hojas, tallos, raíces, etc.), semillas y células vegetales y descendencia de las mismas. "Célula vegetal", como se usa en el presente documento, incluye, sin limitación, semillas, cultivos en suspensión, embriones, regiones meristemáticas, tejido de callo, hojas, raíces, brotes, gametofitos, esporofitos, polen y microesporas. La clase de plantas que se pueden usar en los métodos proporcionados incluye tanto plantas monocotiledóneas como dicotiledóneas.

- 15 Se proporcionan métodos para 1) identificar embriones haploides en una etapa temprana con alta precisión, 2) protocolos de duplicación cromosómica en una etapa temprana del desarrollo embrionario, 3) generación de plantas a partir de embriones en etapa temprana. Los métodos son generalmente independientes del genotipo, extendiendo así el alcance de las plantas que pueden usarse para producir haploides duplicados. Los métodos generalmente producen una alta frecuencia de plantas haploides duplicadas que son fértiles.

- 20 Un método proporcionado consiste en obtener un embrión, semilla o planta haploides duplicados poniendo en contacto un embrión haploide con un agente de duplicación y obteniendo un embrión, semilla o planta haploides duplicados.

- 25 Otro método proporcionado es obtener una planta haploide duplicada que comprende las siguientes etapas: a) polinizar óvulos o estigmas, de una planta con polen de una línea inductora, en donde la línea inductora tiene un gen marcador que se expresa en embriones y/o tejido de endospermo; b) seleccionar un embrión haploide que no expresa un gen marcador; c) poner en contacto el embrión haploide con un gas, solución o sólido que comprende un agente de duplicación; y d) regenerar ese embrión en una planta haploide duplicada.

- 30 Otro método es obtener una planta haploide duplicada que comprende las siguientes etapas: a) obtener una semilla haploide polinizando un óvulo con una línea inductora en donde el óvulo comprende un conjunto de cromosomas maternos y en donde la línea inductora comprende un conjunto de cromosomas paternos; b) poner en contacto la semilla haploide con un medio que comprende un agente de duplicación; c) seleccionar una semilla haploide duplicada en donde la semilla haploide duplicada comprende un endospermo triploide y un embrión haploide duplicado. Se puede producir la semilla haploide duplicada producida por dicho método en donde el endospermo triploide comprende dos conjuntos de cromosomas maternos y un conjunto de cromosomas paternos, y en donde el embrión haploide duplicado tiene un primer y segundo conjunto de cromosomas maternos y en donde el primer conjunto de cromosomas maternos es homocigoto al segundo conjunto de cromosomas maternos. También se incluye un método para determinar el origen de los cromosomas con el uso de un marcador que se expresa durante el desarrollo temprano de la semilla.

- 40 Se proporciona un método para obtener una población de plantas de maíz haploides duplicadas que comprende las siguientes etapas: a) obtener un conjunto de granos haploides polinizando una mazorca con una línea inductora en donde la mazorca comprende un conjunto de cromosomas maternos y en donde la línea inductora comprende un conjunto de cromosomas paternos; b) poner en contacto dicho conjunto de granos haploides con un medio que comprende un agente de duplicación; c) elegir un conjunto de granos haploides duplicados en donde cada grano de dicho conjunto de granos haploides duplicados comprende un endospermo triploide y un embrión haploide duplicado; d) cultivar dicho conjunto de granos haploides duplicados en una población de plantas de maíz haploides duplicadas. El conjunto de granos haploides duplicados producidos tiene endospermo triploide y el endospermo triploide comprende dos conjuntos de cromosomas maternos y un conjunto de cromosomas paternos. El embrión haploide duplicado también tiene dos conjuntos de cromosomas maternos. Estos dos conjuntos de cromosomas son homocigotos. El primer conjunto de cromosomas se replica para formar el segundo conjunto de cromosomas. Los diversos conjuntos obtenidos a partir de estos métodos pueden incluir el conjunto de embriones en una mazorca de maíz, el conjunto de granos en una mazorca de maíz y el conjunto de plantas de maíz haploides duplicadas.

- 55 Otro aspecto del método es obtener una planta de maíz haploide duplicada que comprende: a) polinizar las sedas de una mazorca de maíz con una línea inductora; b) poner en contacto la mazorca de maíz con un medio que comprende un agente de duplicación; c) generar un embrión de la mazorca de maíz en una planta de maíz haploide duplicada. Otros aspectos del método incluyen quitar la mazorca de maíz de la planta con o sin el tallo o alguna parte del tallo adherido. La mazorca se puede quitar antes, durante o después de la polinización y colocar en una solución. La mazorca se puede colocar en una solución de 6 horas a 21 días después de la polinización y hasta 35 días después de la polinización. La solución puede comprender agua o agua y nutrientes. La solución puede entrar en contacto con la mazorca directa o indirectamente, por ejemplo a través de papel de filtro o algodón. El agente de duplicación puede entrar en contacto con la mazorca después de la polinización y antes o después de que la mazorca se quite de la planta. El agente de duplicación cromosómica puede entrar en contacto con la mazorca directa o indirectamente, por ejemplo a través de papel de filtro o algodón.

- 65 Otro método proporcionado es obtener un conjunto de embriones de maíz haploides duplicados que comprende las

siguientes etapas:

a) obtener un conjunto de embriones haploides polinizando una mazorca con una línea inductora; en donde la mazorca comprende un conjunto de cromosomas maternos de una planta de maíz F1; y en donde la línea inductora comprende un conjunto de cromosomas paternos; b) poner en contacto dicho conjunto de embriones haploides con un medio que comprende un agente de duplicación; c) seleccionar un conjunto de embriones de maíz haploides duplicados en donde cada embrión de maíz haploide duplicado de dicho conjunto de embriones de maíz haploides duplicados es genéticamente diferente de cada uno de los otros embriones de maíz haploides duplicados de dicho conjunto de embriones de maíz haploides duplicados; d) cultivar dicho conjunto de embriones de maíz haploides duplicados en una población de plantas de maíz haploides duplicadas. Este método desarrolla un conjunto único de embriones de maíz haploides duplicados. Este conjunto único de embriones deriva directamente de una mazorca de maíz, en donde "que deriva directamente" indica que no se produce una generación filial entre el desarrollo de los embriones haploides y el desarrollo del conjunto de embriones haploides duplicados.

Se proporciona un método de selección endogámica que comprende las siguientes etapas: a) polinización cruzada de dos plantas de maíz endogámicas; b) cultivar la semilla de F1; c) polinizar la planta F1 con una línea inductora para producir embriones haploides; d) poner en contacto los embriones haploides con un agente de duplicación cromosómica para producir embriones haploides duplicados; e) generar plantas haploides duplicadas; f) evaluar dichas plantas haploides duplicadas para determinar el rendimiento agronómico y la capacidad de combinación. El desarrollo de la etapa de los haploides también se puede hacer en generaciones posteriores, F2, F3, F4, etc. La producción de haploides de generaciones posteriores permite oportunidades adicionales para la recombinación.

Los métodos proporcionados pueden incluir el uso de rescate de embriones. El rescate de embriones se realiza poniendo en contacto un embrión con un medio que contiene nutrientes y generando una planta. Las fitohormonas pueden o no estar incluidas en el medio de rescate de embriones.

Otro método para obtener un embrión haploide duplicado transgénico puede comprender aislar un embrión haploide, transformar el embrión haploide, colocar el embrión haploide en un medio que comprende un agente de duplicación cromosómica y seleccionar un embrión haploide duplicado transgénico.

En cualquiera de estos métodos, se pueden usar marcadores en este proceso para distinguir los embriones haploides de los embriones obtenidos de la polinización normal (2N).

En cualquiera de estos métodos, los cromosomas pueden duplicarse en la etapa de embrión inmaduro, en la etapa de semilla madura, o en cualquier momento entre la polinización de la planta y antes de la germinación de la semilla haploide.

En cualquiera de estos métodos, se puede aislar el embrión haploide que se somete a duplicación cromosómica, puede estar en la semilla o en el grano, puede estar en el grano en un corte de mazorca, puede estar en la mazorca o en la espiga, o el embrión haploide puede estar en el grano que está en la mazorca y en la planta. El agente de duplicación puede alcanzar el embrión haploide mientras la mazorca está en la planta y la planta está intacta. Por ejemplo, el agente de duplicación puede ponerse en contacto directa o indirectamente con el embrión haploide. En algunos casos, el agente de duplicación puede ser transportado por la planta. La planta se puede cultivar hidropónicamente y el agente de duplicación se puede captar a través de las raíces de la planta y transportar al embrión haploide. La planta puede comenzar a crecer en el suelo o en un medio de crecimiento y después transferirse a una solución hidropónica donde se puede añadir el agente de duplicación. En otro aspecto del método, la planta puede cultivarse en el suelo o en un medio de crecimiento y después el agente de duplicación se añade al suelo o medio de crecimiento para que pueda transportarse al embrión haploide.

Se proporcionan métodos para obtener plantas, células vegetales y semillas homocigotas. También se proporcionan métodos para obtener embriones y semillas haploides y métodos para aumentar la duplicación cromosómica. Los métodos comprenden poner en contacto células haploides con un agente de duplicación cromosómica. Los métodos también comprenden cruzar una planta seleccionada y una línea inductora para producir embriones o semillas haploides. Otros métodos comprenden cruzar una planta seleccionada y una línea inductora para producir una célula haploide y tratar la célula haploide con un agente de duplicación cromosómica. Los métodos proporcionan células vegetales haploides duplicadas que pueden generarse en una planta que contiene genes homocigotos.

Los métodos evitan los métodos de autosiembra y cruce que requieren mucho tiempo para obtener un rasgo de interés homocigoto o una planta esencialmente homocigota. Los métodos presentados se pueden usar para producir poblaciones haploides duplicadas que no contienen la heterocigosidad residual de las endogámicas obtenidas a través del método tradicional de autopolinización. Los métodos pueden ser útiles para la genómica funcional, como el análisis de desactivación génica, análisis funcional de genes recesivos, reemplazo de genes, recombinación homóloga, direccionamiento génico, apilamiento transgénico y evaluación de análisis de genes letales frente a no letales. Con los sistemas diploides previamente conocidos, estos análisis son muy complicados y costosos.

Se han desarrollado sistemas de inducción de haploides para diversas plantas para producir tejidos, plantas y semillas haploides. El sistema de inducción de haploides puede producir plantas haploides de cualquier genotipo cruzando una

línea seleccionada (como famenina) con una línea inductora. Tales líneas inductoras para el maíz incluyen Stock 6 (Coe, 1959, Am. Nat. 93:381-382; Sharkar y Coe, 1966, Genetics 54:453-464) RWS (Roeber y Geiger 2001, presentado a Crop Science), KEMS (Deimling, Roeber y Geiger, 1997, Vortr. Pflanzenzuchtg 38:203-224), o KMS y ZMS (Chalyk, Bylich y Chebotar, 1994, MNL 68:47; Chalyk y Chebotar, 2000, Plant Breeding 119:363-364) y mutación indeterminada de gametofitos (lg) (Kermicle 1969 Science 166:1422-1424).

También se pueden usar cruces de hibridación amplios para producir haploides. Este método a veces se denomina método bulbosum (Kasha y Kao, 1970, Nature 226:874-876). Este método de producción de haploides se produce debido a la eliminación de los cromosomas del progenitor polinizador.

Los métodos para obtener plantas haploides también se divulgan en Kobayashi, M. *et al.*, J. of Heredity 71(1):9-14, 1980, Pollacsek, M., Agronomie (París) 12(3):247-251, 1992; Cho-Un-Haing *et al.*, J. of Plant Biol., 1996, 39(3):185-186; Verdoodt, L., *et al.*, Fab. 1998, 96(2):294-300; Genetic Manipulation in Plant Breeding, Actas Simposio internacional organizado por EUCARPIA, 8-13 de septiembre de 1985, Berlín, Alemania; Chalyk *et al.*, 1994, Maize Genet Coop. Newsletter 68:47; Chalyk, S. T., 1999, Maize Genet. Coop. Newsletter 73:53-54; Coe, R.H., 1959, Am. Nat. 93:381-382; Deimling, S. *et al.*, 1997, Vortr. Pflanzenzuchtg 38:203-204; Kato, A., 1999, J. Hered. 90:276-280; Lashermes, P. *et al.*, 1988, Theor. Appl. Genet. 76:570-572 and 76:405-410; Tyrnov, V.S. *et al.*, 1984, Dokl. Akad. Nauk. SSSR 276:735-738; Zabirowa, E.R. *et al.*, 1996, Kukuruz I Sorgo N4, 17-19; Aman, M.A., 1978, Indian J. Genet Plant Breed 38:452-457; Chalyk S.T., 1994, Euphytica 79:13-18; Chase, S.S., 1952, Agron. J. 44:263-267; Coe, E.H., 1959, Am. Nat. 93:381-382; Coe, E.H. y Sarkar, K.R., 1964 J. Hered. 55:231-233; Greenblatt, I.M. y Bock, M., 1967, J. Hered. 58:9-13; Kato, A., 1990, Maize Genet. Coop. Newsletter 65:109-110; Kato, A., 1997, Sex, Plant Reprod. 10:96-100; Nanda, DK y Chase, S.S., 1966, Crop Sci. 6:213-215; Sarkar, KR y Coe, E.H., 1966, Genetics 64:463-464; Sarkar, KR y Coe, E.H., 1971, Crop Sci. 11:543-544; Sarkar, K.R. y Sachan J.K.S., 1972, Indian J. Agrlo. Sci. 42:781-786; Kermicle J.L., 1969, Mehta Yeshwant, M. R., Genetics and Molecular Biology, Septiembre de 2000, 23(3):617-622; Tahir, M.S. *et al.* Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research, Agosto de 2000, 43(4):258-261; Knox, R.E. *et al.* Plant Breeding, Agosto de 2000, 119(4):289-298; y el documento US 5.639.951.

Cuando se usa una línea inductora para polinizar una planta diploide, se obtienen embriones haploides. Un núcleo de esperma del polen se fusiona con los núcleos polares en el saco embrionario para crear un endospermo triploide (3N). El endospermo triploide contendrá 2 juegos de cromosomas de la femenina y 1 juego de cromosomas de la maculina, que en este caso es la línea inductora. El embrión haploide contiene un solo conjunto de cromosomas, que derivan de la planta femenina.

Se pueden tratar células haploides, embriones haploides, semillas haploides, plántulas haploides o plantas haploides con un agente de duplicación cromosómica. Las plantas homocigotas se pueden regenerar a partir de células haploides poniendo en contacto las células haploides, tal como las células embrionarias haploides, con agentes de duplicación cromosómica. Las células haploides pueden entrar en contacto con el agente de duplicación en el momento de la polinización, en cualquier momento después de la polinización, generalmente 6 horas a 21 días después de la polinización, 6 horas a 15 días después de la polinización, en la etapa de semilla madura, en la etapa de plántulas o en la etapa de planta. El embrión haploide puede entrar en contacto con el agente de duplicación cuando un núcleo de esperma de un grano de polen se fusiona con los núcleos polares en el saco embrionario para crear un endospermo triploide (3N) (cuando se forma el embrión haploide), en cualquier momento después de la polinización, generalmente 6 horas a 21 días después de la polinización, 6 horas a 15 días después de la polinización o en la etapa de semilla madura. El embrión haploide puede aislarse. Puede estar contenido dentro del grano, óvulo o semilla. También puede estar en la mazorca en el caso del maíz, o en la espiga como en el caso de otros granos tales como el trigo. La mazorca que comprende el embrión haploide puede estar en la planta o aislarse de la planta. La mazorca también puede estar seccionada. Después de duplicar los cromosomas, el embrión haploide duplicado contendrá 2 copias de cromosomas derivados de la madre. La eficacia del proceso para obtener plantas haploides duplicadas a partir de embriones haploides puede ser superior al 10 %, 20 %, 30 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 %.

Los métodos de duplicación cromosómica se describen en Antoine-Michard, S. *et al.*, Plant cell, tissue organ cult., Cordrecht, Países Bajos, Kluwer Academic Publishers, 1997, 48(3):203-207; Kato, A., Maize Genetics Cooperation Newsletter 1997, 36-37; y Wan, Y. *et al.*, TAG, 1989, 77: 889-892. Wan, Y. *et al.*, TAG, 1991, 81: 205-211.

Los métodos típicos implican poner en contacto las células con colchicina, agentes antimicrotúbulos o herbicidas antimicrotúbulos, pronamida, óxido nitroso o cualquier inhibidor mitótico para crear células haploides duplicadas homocigotas. La cantidad de colchicina utilizada en el medio es generalmente 0,01 % - 0,2 % o aproximadamente 0,05 % o APM (5-225 mM). La cantidad de colchicina puede variar de aproximadamente 400-600 mg/l o aproximadamente 500 mg/l. La cantidad de pronamida en el medio es de aproximadamente 0,5 - 20 mM. Se incluyen ejemplos de inhibidores mitóticos conocidos en la Tabla 1. Se pueden usar otros agentes con los inhibidores mitóticos para mejorar la eficacia de duplicación. Dichos agentes pueden ser dimetilsulfóxido (DMSO), adyuvantes y tensioactivos.

TABLA 1

Nombre común/Nombre comercial	CAS	IUPAC
Colchicina y Derivados de Colchicina		
colchicina/ácido acetiltrimetilcolchicínico		(S)-N-(5,6,7,9-tetrahidro-1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxobenzo (a) heptaten-7-il) acetamida
derivados de colchicina		
Carbamatos		
Carbetamida	(R)-1-(etilcarbamoil)etilcarbanilato	(2R)-N-etil-2-[[[fenilamino]carbonil]oxi]propanamida
clorprofam		
profam		
Benzamidas		
Pronamida/propizamida	3,5-dicloro-N-(1,1-dimetilpropinil) benzamida	3,5-dicloro-N-(1,1-dimetil-2-propinil) benzamida
Ácidos benzoicos		
Dimetil clortal (DCPA),		
Dicamba/dianat/disugran (dicambametil) (BANVEL,	ácido 3,6-dicloro-o-anísico	ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico
CLARITY) Agentes de duplicación cromosómica de dinitroanilina		
benfluralina/benefina/(BALA N)	N-butil-N-etil- α , α ; α -trifluoro-2,6-dinitro-p-toluidina	N-butil-N-etil-2,6-dinitro-4-(trifluorometil)benzenamina
butralina	(RS)-N-sec-butyl-4- <i>terc</i> -butyl-2,6-dinitroanilina	4-(1,1-dimetiletil)-N-(1-metilpropil)-2,6-dinitrobenzenamina
cloralina		
dinitramina	N1,N1-dietil-2,6-dinitro-4-trifluorometil-m-fenilendiamina	N3,N3-dietil-2,4-dinitro-6-(trifluorometil)-1,3-bencendiamina
Etalfluralina (Sonalan)	N-etil- α , α ; α -trifluoro-N-(2-metilalil)-2,6-dinitro-p-toluidina	N-etil-N-(2-metil-2-propenil)-2,6-dinitro-4-(trifluorometil)benzenamina
flucloralina	N-(2-cloroetil)-2,6-dinitro-N-propil-4-(trifluorometil)anilina o N-(2-cloroetil)- α , α , α -trifluoro-2,6-dinitro-N-propilo-p-toluidina	N-(2-cloroetil)-2,6-dinitro-N-propil-4-(trifluorometil) benzenamina
isopropalina	4-isopropil-2,6-dinitro-N,N-dipropil-anilina	4-(1-metiletil)-2,6-dinitro-N,N-dipropilbenzenamina
metalpropalina	α , α , α -trifluoro-N-(2-metilalil)-2,6-dinitro-N-propil-p-toluidina	N-(2-metil-2-propenil)-2,6-dinitro-N-propil-4-(trifluorometil)benzenamina
nitralina	4-metilsulfonyl-2,6-dinitro-N,N-dipropil-anilina	4-(metilsulfonyl)-2,6-dinitro-N,N-dipropilbenzenamina
orizalina (SURFLAN)	3,5-dinitro-N4,N4-dipropilsulfanilamida	4-(dipropilamino)-3,5-dinitrobenzenosulfonamida
Pendimetalina (PROWL)	N-(1-etilpropil)-2,6-dinitro-3,4-xilidina	N-(1-etilpropil)-3,4-dimetil-2,6-dinitrobenzenamina
prodiamina	5-dipropilamino- α , α , α -trifluoro-4,6-dinitro-otoluidina o 2,6-dinitro-N1,N1-dipropil-4-trifluorometil-m-fenilendiamina	2,4-dinitro-N3,N3-dipropil-6-(trifluorometil)-1,3-bencendiamina
profluralina	N-ciclopropilmetil- α , α , α -trifluoro-2,6-dinitro-N-propil-p-toluidina o N-ciclopropilmetil-2,6-dinitro-N-propil-4-trifluorometil-anilina	N-(ciclopropilmetil)-2,6-dinitro-N-propil-4-(trifluorometil)benzenamina
trifluralina (TREFLAN, TRIFIC, TRILLIN)	α , α , α -trifluoro-2,6-dinitro-N,N-dipropil-p-toluidina	2,6-dinitro-N,N-dipropil-4-(trifluorometil)benzenamina
Fosforamidatos		
AMP (Amiprofos metil); amiprofosmetilo		
Butamifós	O-etil O-6-nitro-m-tolil(RS)-sec-butilfosforamidotoato	O-etil O- (5-metil-2-nitrofenil)(1-metilpropil)fosforamidotoato
Piridinas		
Ditiopir		
Tiazopir	2-difluorometil-5-(4,5-dihidro-1,3-tiazol-2-il)-4-isobutil-6-trifluorometilnicotinato de metilo	2-(difluorometil)-5-(4,5-dihidro-2-tiazolil)-4-(2-metilpropil)-6-(trifluorometil)-3-piridincarboxilato de metilo

El agente de duplicación cromosómica puede entrar en contacto con el embrión en varios momentos. Si el embrión está aislado, el agente de duplicación puede entrar en contacto inmediatamente después del aislamiento y antes de la germinación. Si el embrión se encuentra dentro de la semilla, puede entrar en contacto con el agente de duplicación en cualquier momento después de la polinización y antes del secado. El embrión, ya sea aislado o no, puede entrar en contacto con el agente de duplicación en cualquier momento entre 6 horas después de la polinización y 21 días después de la polinización. La duración del contacto entre el agente de duplicación cromosómica puede variar. El contacto puede ser de 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.

Los métodos proporcionados pueden o no pasar por una etapa de formación de callos. Los embriones haploides pueden colocarse en un "medio no promotor de callos". La expresión "medio no promotor de callos" se refiere a un medio que no admite la proliferación de masas desdiferenciadas de células o tejidos. Se utiliza un "medio no promotor de callos" preferido para el rescate de embriones, que contiene formulaciones típicas de sal y vitaminas bien conocidas en la técnica. Los medios de dicho rescate de embriones, o cultivo de embriones, contienen poca o ninguna auxina [para revisión véase Raghaven, V., 1966. Biol. Rev. 41:1-58]. El medio de maduración de embriones también representa otro "medio no promotor de callos" preferido. El medio de maduración de embriones se utiliza para promover el desarrollo de embriones cultivados *in vitro*, previniendo la germinación precoz, y generalmente contienen formulaciones patrón de sales/vitaminas (dependiendo de la especie), niveles de azúcares aumentados y/o ácido abscísico agregado de manera exógena, con poca o sin auxina. Otro tipo de medio se utiliza para el cultivo de brotes o la proliferación de brotes múltiples. Este medio de brotes múltiples puede contener nuevamente poca auxina o reducida, pero en su lugar contiene niveles elevados de citocinina que promueven la proliferación y el crecimiento de los meristemas.

Una auxina se define como una hormona vegetal endógena tal como el ácido indol acético (IAA), derivados de IAA tal como el ácido indol-3-butérico, así como compuestos con actividad de tipo auxina tal como el 2,4-D, picloram, dicamba, 3,4-D, 2,4,5-T y ácido naftalenoacético (NAA).

Una citocinina se define como una hormona vegetal de origen natural, tal como la 2-isopentenil adenina (2iP), la zeatina y la hidrozeatina, o un compuesto sintético con actividad de tipo citocinina, tal como la cinetina y BAP (beinzilaminopurina).

Los polinucleótidos o polipéptidos implicados en la estimulación del crecimiento o en la estimulación del ciclo celular pueden usarse para aumentar la frecuencia de embriones haploides producidos por mazorca, aumentar la recuperación de plantas haploides y/o estimular la eficacia de la duplicación cromosómica. El polinucleótido de estimulación del crecimiento puede proporcionarse por el progenitor femenino o masculino. El polinucleótido o polipéptido de estimulación del crecimiento puede proporcionarse mediante transformación estable o transitoria. Los polinucleótidos cuya sobreexpresión ha demostrado estimular el ciclo celular incluyen Ciclina A, Ciclina B, Ciclina C, Ciclina D, Ciclina E, Ciclina F, Ciclina G y Ciclina H; Pin1; E2F; Cdc25; RepA y polinucleótidos de virus de plantas similares que codifican proteínas asociadas a la replicación. Véase la publicación de patente de EE. UU. N.º 2002/018B96S.

Después de la duplicación exitosa de los cromosomas haploides, puede ser deseable eliminar los polinucleótidos de estimulación del crecimiento anteriores. Esto se puede lograr mediante el uso de varios métodos de escisión génica, tal como con el uso de sitios de recombinación y recombinasas.

Se puede usar un gen marcador puntuable en los métodos, por ejemplo, se pueden utilizar marcadores coloreados en el endospermo o en el embrión. Dichos marcadores incluyen GUS (documentos US 5.599.670 y US 5.432.081), GFP (documentos US 6,146,826; US 5,491,084; y WO 97/41228), luciferasa (documento US 5.674.713 y Ow *et al.* 1986 Science 234 (4778) 856-859), YFP, CFP, CRC (Ludwig *et al.*, 1990), proteínas de los arrecifes de coral o genes de antocianinas tal como los alelos A, C, R-nj, R1-scm, R1-mb (aleurona veteada), R1-r:standard, R1-Randolph, R1-ch:Stadler, R1-d:Catspaw, R1-d:Arapaho, R1-nj, R1-nj:Cudu, R1-nj:Chase, R1-scm2, R1-so:124, R1-sup-R1-suppressible, R1 K10-II; R1 r1-X1, R1-ch, R1-g, R1-1sk, R1-, R1-sc122, R1-sc*5691, R1-sc:m122, R1-sc:m2, R1-scm:3, R1-sk:nc-2, R1-sk, R1-st. etc. y otros conocidos en la técnica.

Para que un marcador de antocianina funcione en el maíz, deben tenerse en cuenta varios alelos. La producción de pigmentos de antocianina en tejidos de maíz incluye los productos de genes tanto estructurales como reguladores. Genes estructurales, tales como A1, A2, Bz1, Bz2 y C1, codifican las enzimas biosintéticas de la vía. Los genes reguladores de antocianinas se dividen en dos clases de factores de transcripción, C1/Pl1 y R1/B1, que interactúan para activar la transcripción de los genes estructurales.

De manera más específica, la expresión de antocianinas en el grano requiere un alelo determinante del color en el locus C1, tal como C1 o C1-S. C1-S es dominante al alelo de tipo silvestre (C1) y muestra pigmentación potenciada (Cone, KC, *et al.* 1986. Molecular analysis of the maize anthocyanin regulatory locus C1. Proc. Natl. Acad. Sci. 83:9631-9635.; Scheffler, B., *et al.* 1994. Molecular analysis of C1 alleles in Zea mays defined regions involved in the expression of this regulatory gene. Mol. Gen. Genet. 242:40-48). La expresión de C1 a su vez depende del gen Vp1; Vp1 codifica

un factor de transcripción que está implicado en la expresión de genes durante la maduración de la semilla. La especificidad del grano de los resultados de la expresión de C1 debido a la expresión de Vp1 se limita al endospermo (aleurona) y al embrión (Hattori T, *et al.* 1992. The Viviparous-1 gene and abscisic acid activate the C1 regulatory gene for anthocyanin biosynthesis during seed maturation in maize. *Genes & Dev.* 6:609-618).

Además, la expresión de antocianinas en el grano de maíz (endospermo y/o embrión) requiere determinados alelos R1/B1. Para ser útil en la exploración de haploide/diploide, un alelo debe conferir color tanto en el endospermo (aleurona) como en el embrión. (Coe *et al.* 1988, The genetics of corn. págs. 81-258. En: Sprague GF, Dudley JW(eds) *Corn and Corn Improvement*, 3ª ed. Amer. Soc. Agronomy, Madison.) enumeraron tres tipos de alelos que confieren color tanto en la aleurona como en el scutellum (embrión): *R-nj*, *R-scm* y *B-peru*.

Rnj es el alelo más habitualmente utilizado para la exploración haploide/diploide de semillas maduras (Nanda y Chase, 1966. An embryo marker for detecting monoploids of maize (*Zea mays* L). *Crop Sci.* 6:213-215; Greenblatt y Bock, 1967. A commercially desirable procedure for detection of monoploids in maize. *J. Hered.* 58:9-13). Como se mencionó con respecto a C1, se ha demostrado que los niveles de expresión de *R-nj* están correlacionados con los parámetros de maduración del grano (Alexander y Cross, 1983. Grain fill characteristics of early maize (*Zea mays*) strains selected for variable *R-nj* expression. *Euphytica* 32:839-844.). Más recientemente, también se ha utilizado *R-scm2* (Kato A. 2002. Chromosome doubling of haploid maize seedlings using nitrous oxide gas at the flower primordial stage. *Plant breeding* 121:370-377; y Kato A. 2003. Chromosome doubling method. Solicitud de Patente de Estados Unidos 20030005479).

Algunas líneas inductoras ya contienen un marcador de color. Por varias razones, puede ser deseable expresar el gen marcador en el embrión. En particular, puede ser deseable expresar el gen marcador en la etapa temprana de desarrollo, aproximadamente 10 horas-15 días después de la polinización. Si el marcador es un transgén, puede ser beneficioso usar un promotor apropiado tal como un promotor de oleosina o un *Lec1*. Los embriones haploides se pueden distinguir de los embriones polinizados de forma normal porque los embriones haploides no contendrán el gen marcador.

Se pueden usar en los métodos marcadores seleccionables, puntuables, negativos, positivos. Los marcadores pueden pasar a través de la planta femenina o masculina. El método preferido es hacer que los marcadores pasen a través de la planta masculina.

Se pueden identificar células haploides de embriones, semillas, plantas, etc. por varios métodos, tal como, por recuentos cromosómicos, midiendo la longitud de las celdas de protección, o mediante el uso de un citómetro de flujo.

Se pueden usar marcadores moleculares o PCR cuantitativa para determinar si un tejido o planta están formados por células haploides duplicadas o está formado por células diploides (células obtenidas mediante polinización normal).

La transformación del embrión haploide también se puede utilizar en los métodos. El tipo de transformación no es crucial para los métodos; actualmente hay varios métodos de transformación disponibles. Como los métodos más nuevos están disponibles para transformar las células hospedadoras, pueden aplicarse directamente. En consecuencia, se ha desarrollado una amplia variedad de métodos para insertar una secuencia de ADN en el genoma de una célula hospedadora para obtener la transcripción y/o traducción de la secuencia. De este modo, se puede emplear cualquier método que proporcione una transformación/transfección eficaz.

Los métodos para transformar varias células hospedadoras se divulgan en Klein *et al.* "Transformation of microbes, plants and animals by particle bombardment", Bio/Technol. Nueva York, N.Y., Nature Publishing Company, Marzo de 1992, 10(3):286-291. Las técnicas para transformar una amplia variedad de especies de plantas superiores son bien conocidas y se describen en la bibliografía técnica, científica y de patentes. Véase, por ejemplo, Weising *et al.*, *Ann. Rev. Genet.* 22:421-477 (1988).

Por ejemplo, la construcción de ADN puede introducirse directamente en el ADN genómico de la célula vegetal utilizando técnicas tales como electroporación, transfección inducida por PEG, bombardeo de partículas, suministro de fibra de silicio o microinyección de protoplastos de células vegetales o callo embriogénico. Véase, por ejemplo, Tomes *et al.*, Direct DNA Transfer into Intact Plant Cells Via Microprojectile Bombardment, págs. 197-213 en *Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Fundamental Methods*, eds. O. L. Gamborg y G.C. Phillips. Springer-Verlag Berlin Heidelberg Nueva York, 1995. La introducción de construcciones de ADN usando precipitación con polietilenglicol se describe en Paszkowski *et al.*, *Embo J.* 3:2717-2722 (1984). Las técnicas de electroporación se describen en Fromm *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82:5824 (1985). Las técnicas de transformación balística se describen en Klein. *et al.*, *Nature* 327:70-73 (1987).

De manera alternativa, las construcciones de ADN pueden combinarse con regiones flanqueantes de ADN-T adecuadas e introducirse en un vector del hospedador *Agrobacterium tumefaciens*. Las funciones de virulencia del hospedador *Agrobacterium tumefaciens* dirigirá la inserción de la construcción y el marcador adyacente en el ADN de la célula vegetal cuando la célula se infecte por la bacteria. Las técnicas de transformación mediadas por *Agrobacterium tumefaciens* están bien descritas en la bibliografía científica. Véanse, por ejemplo Horsch *et al.*, *Science*

233:496-498 (1984) y Fraley *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 80:4803 (1983). Por ejemplo, la transformación de maíz por *Agrobacterium* se describe en la Patente de Estados Unidos N.º 5.981.840. La transformación de monocotiledóneas por *Agrobacterium* se encuentra en la patente de Estados Unidos N.º 5.591.616. La transformación de soja por *Agrobacterium* se describe en la Patente de Estados Unidos N.º 5.563.055.

Otros métodos de transformación incluyen (1) transformación *Inducida por Agrobacterium rhizogenes* (véanse, por ejemplo, Lichtenstein y Fuller en: Genetic Engineering, vol. 6, PWJ Rigby, Ed., Londres, Academic Press, 1987; y Lichtenstein, CP y Draper, J., En: DNA Cloning, Vol. II, D. M. Glover, Ed., Oxford, IRI Press, 1985), La solicitud PCT/US87/02512 (documento WO 88/02405 publicado el 7 de abril de 1988) describe el uso de la cepa A4 de *A. rhizogenes* y su plásmido Ri junto con los vectores pARC8 o pARC16 de *A. tumefaciens* (2) captación de ADN inducida por liposomas (véase, por ejemplo, Freeman *et al.*, Plant Cell Physiol. 25:1353, 1984), (3) el método de agitación con formación de vórtice (véase, por ejemplo, Kindle, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 87:1228, (1990).

El ADN también se puede introducir en las plantas mediante transferencia directa de ADN al polen como se describe por Zhou *et al.*, Methods in Enzymology 101:433 (1983); D. Hess, Intern Rev. Cytol. 107:367 (1987); Luo *et al.*, Plant Mol. Biol. Reporter, 6:165 (1988). La expresión de los ácidos nucleicos que codifican el polipéptido puede obtenerse por inyección del ADN en los órganos reproductores de una planta como se describe por Pena *et al.*, Nature 325:274 (1987). La transformación también se puede lograr mediante la electroporación de ADN extraño en células de esperma y después microinyectando las células de esperma transformadas en sacos embrionarios aislados como se describe en la Patente de Estados Unidos 6.300.543 por Cass *et al.* El ADN también se puede inyectar directamente en las células de embriones inmaduros y la rehidratación de embriones desecados como se describe por Neuhaus *et al.*, Theor. Appl. Genet, 75:30 (1987); y Benbrook *et al.*, en Proceedings Bio Expo 1986, Butterworth, Stoneham, Mass., págs. 27-54 (1986).

Los embriones haploides transformados que derivan de cualquiera de las técnicas de transformación anteriores pueden cultivarse para regenerar una planta completa que posee el genotipo transformado. Dichas técnicas de regeneración se llaman rescate de embriones. Los medios de rescate de embriones pueden comprender determinadas fitohormonas y fuentes de energía o solo fuentes de energía. El medio de crecimiento también puede contener un agente de selección tal como un biocida y/o herbicida. Este agente de selección se puede usar para indicar un marcador que se ha introducido a través del proceso de transformación. Para la transformación y regeneración del maíz, véase, Gordon-Kamm *et al.*, The Plant Cell 2:603-618 (1990).

Los métodos proporcionados se pueden practicar con cualquier planta. Dichas plantas incluyen, pero sin limitación, *Zea mays* (también identificado como maíz o choclo), soja, semilla oleaginosa *Brassica*, alfalfa, arroz, centeno, sorgo, girasol, tabaco, patata, cacahuètes, algodón, batata, mandioca, remolacha azucarera, tomate, avena, cebada y trigo.

La generación de embriones en plantas es bien conocida en la técnica. Las técnicas de rescate de embriones se pueden utilizar para generar embriones haploides duplicados inmaduros en plantas (Recent Research Developments in Genetics & Breeding. Vol. 1, Parte II, 267-308 2004).

La temperatura a la que se pueden realizar los métodos puede variar. Los métodos proporcionados se pueden practicar a cualquier temperatura que no destruya una célula vegetal o planta o de aproximadamente 16 grados Celsius a 32 grados Celsius. Cualquiera o la totalidad o cualquier combinación de las diversas etapas de la invención: aislamiento de embriones, cultivo, duplicación de células embrionarias se puede realizar en la luz o en la oscuridad.

Los siguientes ejemplos se presentan como ilustración y no como limitación.

Ejemplos

Ejemplo 1: Obtención de una Población de Plantas de Maíz Haploides Duplicadas

Se siembran semillas de una planta de maíz F1 y las plantas resultantes se usan como plantas progenitoras femeninas (receptores de polen). Se siembran semillas de líneas inductoras haploides, tal como Stock 6, RWS, KEMS KMS o ZMS, y las plantas resultantes se usan como plantas progenitoras masculinas (donantes de polen). Las mazorcas de las plantas progenitoras femeninas se embolsan antes de la aparición de la seda. Las sedas de las mazorcas en las plantas de las plantas progenitoras femeninas se polinizan con granos de polen viables recogidos de las anteras de las plantas progenitoras masculinas (plantas inductoras haploides). Esta polinización se controla mediante el método utilizado regularmente en el programa de mejora de maíz para evitar la contaminación por polen extraño. El método de polinización da como resultado la producción de una frecuencia de aproximadamente 5-12 % de embriones haploides en cada mazorca. Aproximadamente 9-14 días después de la polinización, se cosechan las mazorcas inmaduras. Las mazorcas se esterilizan superficialmente en lejía Clorox al 30 % más detergente Micro al 0,5 % durante 20 minutos y se aclaran dos veces con agua estéril. Los embriones haploides se aíslan en función de la identificación del gen marcador visible en las líneas inductoras. Por ejemplo, si el inductor contiene un gen GFP o gen CRC impulsado por un promotor que permite la expresión del gen GFP o CRC en los embriones en la etapa temprana de desarrollo. Los promotores típicos que son útiles incluyen el promotor de oleosina de maíz o el promotor Lec1 de maíz, etc. El haploide producido por este sistema es un haploide materno que tiene solo un conjunto de cromosomas del

progenitor femenino en las células embrionarias y tiene 3 conjuntos de cromosomas en las células del endospermo, dos de ellos del progenitor femenino y uno del progenitor masculino. Si la línea Inductor tiene un gen marcador visible, tal como GFP o CRC, este gen marcador se incluirá solo en las células de endospermo, pero no en las células embrionarias en los granos haploides. Al usar este tipo de marcador visible, los embriones haploides sin expresión de GFP o CRC pueden identificarse fácilmente a partir de los embriones con expresión de GFP o CRC.

Los embriones haploides de maíz se aíslan usando un bisturí y se colocan en un medio que contiene colchicina. Después de aproximadamente 24 horas, los embriones se transfieren a un medio sin colchicina y se colocan en la oscuridad. Estos embriones haploides duplicados serán una población heterogénea de embriones homocigotos. Después de aproximadamente 6-10 días, las plántulas se pueden transferir a una sala de cultivo con luz. Aproximadamente 7-14 días después, las plántulas se transfieren a superficies planas que contienen tierra para macetas y se cultivan durante 1 semana en una cámara de crecimiento, se cultivan posteriormente durante 1-2 semanas adicionales en el invernadero, después se transfieren a macetas y se dejan crecer hasta la madurez. Estas plantas serán una población heterogénea de plantas haploides duplicadas. Estas plantas de maíz haploides duplicadas fértiles pueden autosembrarse y evaluarse para fines de mejora.

Ejemplo 2: Obtención de plantas de maíz haploides duplicadas a través de la duplicación cromosómica en embriones inmaduros.

Métodos

Una planta diploide de maíz, "A", se polinizó con una línea inductora haploide que contiene GFP. Los embriones inmaduros se aislaron a los 12 días después de la polinización y el tamaño del embrión oscila entre 1,9-2,0 mm de largo. Se descartaron los embriones diploides, embriones que expresan GFP. Los embriones haploides, basándose en la ausencia de la expresión del marcador GFP, se cultivaron en un medio que comprende sales de MS, vitaminas de MS, tiamina, asparagina, BAP, sacarosa, gelrite y colchicina al 0,05 % con el scutellum hacia arriba durante 24 horas a 26 °C en la oscuridad. Estos embriones se cultivaron después con el scutellum hacia abajo durante 6-10 días a 26 °C en la oscuridad en un medio que no contenía un agente de duplicación. Este medio comprende sales de MS, vitaminas de MS, mio-inositol, sacarosa y gelrite. Las plántulas germinadas de estos embriones tratados se transfirieron a una sala de cultivo con luz a 26 °C durante otras 2-3 semanas hasta que se desarrollaron plántulas sanas con buenas raíces. Estas plántulas se transfirieron al suelo y se cultivaron en un invernadero normal hasta la maduración. Las plantas se autopolinizaron y se cosecharán las semillas maduras. La semilla cosechada de cada planta se cultivará como una fila de mazorcas y las plantas se examinarán para determinar la uniformidad de la morfología de la planta dentro de cada fila de mazorcas.

Resultados

Mazorca	Número total de embriones	Embriones haploides	Plántulas Germinadas	Plántulas a Invernadero	Plantas Completamente Fértiles
1	71	3	3	2	2
2	60	7	5	5	4*
3	101	9	8	8	8
Suma	232	19 (8,2 %)	16 (84,2 %)	15	14 (93,3 %)

* Una planta en este grupo tiene una parte de la panícula que disemina polen.

Ejemplo 3: Obtención de Plantas de Maíz Haploide Duplicadas

Métodos

Dos líneas diferentes de maíz diploide, "B" y "C", se polinizaron con una línea inductora haploide, que contenía GFP homocigoto. Los embriones inmaduros se aislaron a los 11 días después de la polinización y el tamaño del embrión osciló entre 1,5 y 1,6 mm de longitud. Se descartaron los embriones diploides, embriones que mostraban expresión de GFP. Los embriones haploides, embriones que no expresaban GFP, se cultivaron en un medio MS modificado que contenía 5 µM de pronamida con el scutellum hacia arriba durante 48 horas a 26 °C en la oscuridad. Después de aproximadamente 48 horas, los embriones se transfirieron a un medio MS modificado sin ningún agente de duplicación. Los embriones se colocaron con el scutellum hacia abajo durante 6-10 días a 26 °C en la oscuridad. Las plántulas germinadas de estos embriones tratados se movieron a una sala de cultivo con luz a 26 °C durante otras 3 semanas hasta que se desarrollaron plántulas sanas con buenas raíces. Estas plántulas se transfirieron después al suelo y se cultivaron en un invernadero normal hasta la maduración. Las plantas se autopolinizaron y se cosecharán las semillas maduras. La semilla cosechada se plantará como una hilera. Las plantas dentro de una hilera, se examinarán para determinar la uniformidad de la morfología de las plantas.

Resultados

Línea	Embrión total	Embrión haploide	Plántula Germinada	Plántula en Invernadero	Planta Completamente Fértil
B	112	11	4	3	2*
C	35	4	4	3	3
Suma	147	15 (10,2 %)	8 (53,3 %)	6	5 (83,3 %)
* Una planta en este grupo tiene una parte de la panícula que disemina polen.					

5 **Ejemplo 4: Semillas haploides duplicadas y líneas haploides duplicadas derivadas de la duplicación cromosómica en embriones inmaduros**

Las semillas haploides duplicadas se obtienen a través de los métodos descritos en los Ejemplos 1, 2 y 3. Las plantas haploides duplicadas en los ejemplos 1, 2 y 3 se autopolinizan y las semillas haploides duplicadas se forman en cada planta haploide duplicada. Las semillas producidas en cada mazorca son semillas homocigotas. Esta tabla proporciona un ejemplo de semillas cosechadas de 10 de estas plantas haploides duplicadas.

10

Número de Planta	Fertilidad de la Panícula	Número de semillas producidas
1	Totalmente fértil	99
2	Totalmente fértil	11
3	Totalmente fértil	245
4	Totalmente fértil	175
5	Totalmente fértil	97
6	Totalmente fértil	183
7	Totalmente fértil	188
8	Totalmente fértil	124
9	Totalmente fértil	154
10	Totalmente fértil	275

Para verificar la homocigosidad de estas líneas haploides duplicadas producidas a través de la duplicación cromosómica en la etapa de embrión inmaduro, las semillas producidas de cada una de las mazorcas haploides duplicadas se plantan como hileras en el campo. Las plantas dentro de cada hilera se evalúan para determinar sus fenotipos, tal como, altura de la planta, altura de la mazorca, número de hojas, forma de la planta, forma de la panícula, número de ramas de la panícula, color de antera, color de seda, tiempo de floración, etc. Toda esta información se utiliza para verificar la uniformidad de las plantas dentro de cada hilera. A través de estas evaluaciones, estas líneas haploides duplicadas se confirman como homocigotas. Para confirmar adicionalmente la homocigosidad de estas líneas haploides duplicadas, se utiliza la tecnología de marcadores moleculares.

15

20

Ejemplo 5: Descripción del Tratamiento de Mazorcas Inmaduras para la Duplicación de Haploides

Una mazorca de maíz se poliniza con una línea inductora que es homocigota para el gen marcador R-nj. La mazorca se coge alrededor de 6 horas a 35 días después de la polinización cortando la planta por encima y debajo de la mazorca. El extremo inferior del tallo se sumerge en un recipiente grande de agua. Las mazorcas se llevan a una campana estéril en el laboratorio. El tallo se corta varias pulgadas debajo de la mazorca con un cuchillo estéril. El tercer extremo inferior de la mazorca se sumerge en una solución de Clorox (hipoclorito de sodio) al 2,5 % durante 10 minutos. Toda la superficie de la mazorca y el tallo se limpian con etanol al 70 % o una solución de clorox al 5 %. El extremo superior cortado del tallo se sella con lanolina estéril. El tercio inferior de la mazorca se coloca en agua destilada estéril para enjuagar durante 10 minutos. La mazorca se coloca en un matraz estéril de brazo lateral de 250 ml que contiene medio estéril que comprende un agente de duplicación tal como colchicina o pronamida. El recipiente

25

30

puede ser cualquiera que satisfaga la necesidad de una aplicación a pequeña o gran escala. Se puede usar una toalla de papel estéril para sellar los espacios entre el matraz y la mazorca. La toalla de papel y el matraz se pueden envolver con parafilm para sellar el recipiente. El brazo lateral del matraz está conectado por un tubo estéril a una bureta estéril o recipiente separado para suministrar medio adicional o para cambiar a un medio nuevo. El flujo del medio se controla con una abrazadera en el tubo. la mazorca surge en un medio líquido que contiene un agente de duplicación durante 10 a 48 horas y después se cultiva en el medio líquido sin el agente de duplicación durante el resto del tiempo. La mazorca se cultiva en el medio hasta la maduración del grano. La mazorca se seca y se cosechan las semillas. Las semillas haploides duplicadas y haploides se identifican basándose en el marcador. Por ejemplo, cuando el marcador R-nj viene de la línea inductora, las semillas haploides y haploides duplicadas resultantes tendrán un embrión incoloro y un endospermo coloreado. Las semillas que se someten a una polinización normal tendrían endospermo coloreado y embrión coloreado. Plante las semillas haploides duplicadas y autopolinice estas plantas para producir la próxima generación de semillas. Plante las semillas producidas a partir de estas plantas como hileras. Verifique la uniformidad de cada hilera.

15 **Ejemplo 6: Segunda Descripción del de Mazorcas Inmaduras para Haploides**

Las plantas híbridas de maíz se polinizadas con plantas inductoras haploides. Las mazorcas con parte de los tallos unidos se cosecharon de las plantas híbridas 4-6 días después de la polinización (longitud del embrión menor de 4 mm). Los tallos tenían aproximadamente 10,16-20,32 cm (4-8 pulgadas) de largo a cada lado de donde estaban unidas las mazorcas. Las mazorcas y los tallos unidos se esterilizan superficialmente con etanol al 70 % o Clorox al 5 %. Los extremos inferiores de los tallos que contenían las mazorcas surgieron en medio líquido que contenía medio MS, vitaminas de MS, sacarosa, etc. y 5 uM de pronamida, DMSO al 0,5 % durante un día a 26 °C. Después, las mazorcas aún contenidas en los tallos se movieron a un medio nuevo que contenía medio MS, vitaminas de MS, sacarosa, etc. sin agente de duplicación para permitir que se desarrollaran los embriones y los granos. Los embriones dentro de la mazorca pueden aislarse en cualquier momento después de duplicarse. El rescate de embriones se puede utilizar para germinar embriones inmaduros en las plantas. Las plantas germinadas se cultivaron para examinar la fertilidad.

Resultados

Número de mazorca	Cosecha de Mazorca/tallo	Número de plantas para invernadero	Número de plantas con panícula fértil	Número de plantas con panícula estéril	% de plantas con panícula fértil
1	6 días después de la polinización	24	16	8	67 %
2	6 días después de la polinización	32	30	2	94 %
3	5 días después de la polinización	20	14	6	70 %
4	4 días después de la polinización	20	19	1	95 %
Suma		96	79	17	82 %

30 **Ejemplo 7: Descripción del Tratamiento de Mazorcas Inmaduras para la Duplicación de Haploides Mientras la Mazorca está en la Planta**

Una mazorca de maíz se poliniza con una línea inductora. De aproximadamente 6 horas a 35 días después de la polinización, se coge la planta y las raíces de la planta se sumergen en un recipiente de solución nutritiva que comprende un agente de duplicación. Las raíces de la planta surgen en un medio líquido que contiene un agente de duplicación durante 10 a 48 horas y después se mueven a una nueva solución nutritiva hidropónica durante el resto del tiempo. Ejemplos de agentes de duplicación incluyen, pero sin limitación, pronamida, carbetamida, orizalina y colchicinas. Se permite que la mazorca se desarrolle. Los embriones haploides duplicados pueden aislarse en cualquier momento después del tratamiento de duplicación. Se puede realizar el rescate del embrión o se puede permitir que la mazorca se desarrolle hasta la maduración del grano. La mazorca se deja madurar, las semillas se pueden secar y las semillas se cosechan. Las semillas haploides duplicadas y haploides se pueden identificar basándose en el marcador. Por ejemplo, si el marcador R-nj viene de la línea inductora, las semillas haploides y haploides duplicadas resultantes tendrán un embrión incoloro y un endospermo coloreado. Las semillas que se someten a una polinización normal tendrían endospermo coloreado y embrión coloreado. Plante las semillas haploides duplicadas y autopolinice estas plantas para producir la próxima generación de semillas. Plante las semillas producidas a partir de estas plantas como hileras. Verifique la uniformidad de cada hilera.

Ejemplo 8: Descripción de la Obtención de una Planta Haploide Duplicada mediante Inducción de Brotes

Un embrión haploide se aísla 6-12 días después de la polinización. El embrión haploide se coloca con el lado del eje hacia arriba en un medio que comprende un agente de duplicación cromosómica durante 24 a 48 horas. El embrión haploide duplicado (o un explante extirpado que contiene el meristemo apical) se coloca después en un medio de proliferación de brotes (medio SP) con el eje hacia arriba (lado del scutellum hacia abajo). El medio de proliferación de brotes contiene sales y vitaminas de MS con 2 mg/l de 2-benciladenina, sacarosa al 2 % y 9 g/l de agar TC (véase Lowe *et al.*, 1995, *Biotechnology* 13:677-682), pero además de los niveles elevados de citocinina, tales medios SP pueden contener niveles bajos de auxinas tales como 2,4-D o IBA (como en Zhong *et al.*, 1992, *Planta* 187:483-489). Después de formarse múltiples brotes en el medio SP, se transfieren a un medio de regeneración de brotes (también denominado medio de alargamiento de brotes), que consiste en medio MS con un nivel óptimo de citocinina. Para algunos genotipos, ninguna citocinina es óptima para el alargamiento del brote, mientras que para otros genotipos es necesaria cierta citocinina (es decir, 10 mg/l de zeatina). Una vez que se ha producido la regeneración del brote, los brotes se transfieren al medio de iniciación de la raíz, por ejemplo, un medio MS que no contiene auxinas ni citocininas. Si las plántulas tienen dificultad para formar raíces en ausencia de auxina, el enraizamiento se promueve mediante cultivo en medio MS (Murashige y Skoog) o SH (Shenk y Hildebrandt) con 1 mg/l de NAA, o cortando la base del tallo con un bisturí y sumergiendo los brotes en una solución de 1 mg/l de NAA. Las plántulas haploides duplicadas se transfieren después a una cámara de crecimiento y finalmente se trasplantan al invernadero para el crecimiento hasta la madurez y la producción de semillas. Las semillas de las plantas haploides duplicadas se cultivan y se analizan para determinar su homocigosidad mediante análisis con marcadores moleculares y observaciones fenotípicas.

Como alternativa para proporcionar el agente de duplicación al embrión haploide antes del cultivo, los embriones o los explantes de embriones que contienen el meristemo apical se pueden colocar en medio SP, y una vez que ha comenzado la proliferación de brotes, el cultivo de brotes múltiples puede exponerse a un agente de duplicación cromosómica durante 24-48 horas. Después, el tejido se transfiere a un medio SP nuevo para una continua proliferación de meristemos o se puede mover al medio de iniciación de la raíz.

Ejemplo 9: Prueba de Diferentes Híbridos y Duración del Agente de Duplicación

Se usó una línea de maíz inductora de haploides materna para polinizar 4 plantas híbridas diferentes. Los embriones inmaduros derivados de estos cruces se aislaron y se colocaron directamente en medio de rescate de embriones que contenía pronamida 5 μ M. Los embriones se mantuvieron en el medio de pronamida durante aproximadamente 36 o 48 horas antes de ser transferidos a nuevos medios sin el agente de duplicación.

Las plántulas germinadas de estos embriones tratados se transfirieron a tubos hasta que se desarrollaron plántulas sanas con buenas raíces. Estas plántulas se transfirieron después al suelo y se cultivaron en un invernadero normal hasta la maduración. Las plantas se autopolinizaron y se cosecharon las semillas maduras. La descendencia de una muestra de las plantas haploides duplicadas se verificó utilizando 120 marcadores moleculares y se confirmó para determinar la homocigosidad.

Resultados

Genotipo femenino	Edad del Embrión: Días Después de la Polinización	N.º de embriones extirpados	Tamaño del embrión (mm)	Duración del tiempo en pronamida 5 μ M (horas)	Número de Plantas Haploides Duplicadas con Mazorcas
Híbrido 1	11	100	2,5	36	1
Híbrido 2	11	176	2,5-3	36	4
Híbrido 1	12	300	2,5	36	1
Híbrido 3	12	279	2,5-3	36	13
Híbrido 4	12	322	2,5	36	2
Híbrido 3	10	236	2	48	6
Híbrido 4	10	144	2	48	3

REIVINDICACIONES

1. Un método para obtener una planta de maíz haploide duplicada que comprende:

- 5 (a) aislar un embrión haploide inmaduro obtenido polinizando sedas de una mazorca de maíz con una línea inductora de maíz;
- (b) poner en contacto dicho scutellum de embrión haploide aislado hacia arriba en un medio de cultivo de embriones que contiene un agente de duplicación cromosómica para producir al menos una célula embrionaria haploide duplicada;
- 10 (c) cultivar dicho scutellum de embrión aislado hacia abajo en un medio de maduración de embrión que no contiene un agente de duplicación cromosómica para generar una planta de maíz haploide duplicada a partir de dicha célula embrionaria haploide duplicada;

en donde la etapa (b) se produce 4-21 días después de la polinización;

- 15 y en donde la línea inductora contiene un gen marcador que se expresa en el tejido embrionario y dicho gen marcador se expresa 4 o más días después de la polinización.

2. El método de la reivindicación 1, en donde la etapa (b) se produce de 4-15 días después de la polinización.

- 20 3. El método de la reivindicación 1 en donde dicho gen marcador es R-nj.

4. El método de la reivindicación 1 en donde dicho gen marcador es GFP.

5. El método de la reivindicación 1 en donde dicho gen marcador expresa pigmentos de antocianina.

- 25 6. El método de la reivindicación 1 en donde el embrión haploide de la etapa (b) tiene una longitud de 0,4 mm a 3 mm.

7. El método de la reivindicación 1, en donde el agente de duplicación cromosómica comprende un agente antimicrotúbulos.

- 30 8. El método de la reivindicación 1, en donde dicho agente de duplicación cromosómica se selecciona del grupo que consiste en colchicina, pronamida, ditiopir y trifluralina.

- 35 9. El método de la reivindicación 1 en donde, en la etapa (b), el embrión haploide está en contacto con el agente de duplicación durante 4 a 48 horas.

10. El método de la reivindicación 1 en donde, en la etapa (b), dicho agente de duplicación cromosómica está presente en un medio no promotor de callos.