

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 996 461**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/82** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.01.2010 PCT/IB2010/000184**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.07.2010 WO10079432**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.01.2010 E 10702906 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2024 EP 2379726**

54 Título: **Plantas productoras de gametos 2n o gametos apomeióticos**

30 Prioridad:

**07.01.2009 EP 09290010**

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

**12.02.2025**

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE RECHERCHE POUR  
L'AGRICULTURE, L'ALIMENTATION ET  
L'ENVIRONNEMENT (100.00%)  
147 Rue de l'Université  
75007 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**MERCIER, RAPHAEL;  
D'ERFURTH, ISABELLE;  
FROGER, NICOLE;  
JOLIVET, SYLVIE y  
CROMER, LAURENCE**

74 Agente/Representante:

**DURAN-CORRETJER, S.L.P**

Observaciones:

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

ES 2 996 461 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

Plantas productoras de gametos 2n o gametos apomeióticos

5 La presente invención se refiere a plantas que producen gametos de Restitución de Segunda División (SDR, *Second Division Restitution*) 2n, y a plantas que producen gametos apomeióticos, y a su utilización en el fitomejoramiento.

10 Los gametos 2n (también conocidos como diplogametos) son gametos que tienen el número de cromosomas somáticos en lugar del número de cromosomas gametofíticos. Se ha demostrado que son útiles para la mejora genética de varios cultivos (para una revisión, véase, por ejemplo, RAMANNA y JACOBSEN, *Euphytica* 133, 3-18, 2003). En particular, la producción de diplogametos permite realizar cruces entre plantas de diferente nivel de ploidía, por ejemplo, cruces entre plantas de cultivo tetraploides y sus parientes silvestres diploides, con el fin de utilizar su diversidad genética en programas de fitomejoramiento.

15 La formación de gametos 2n es resultado de anomalías durante la meiosis (para una revisión, véase, VEILLEUX, *Plant Breeding Reviews* 3, 252-288, 1985, o BRETAGNOLLE y THOMPSON, *New Phytologist* 129, 1-22, 1995).

20 En la meiosis normal, los cromosomas primero se duplican, dando como resultado pares de cromátidas hermanas. Esta ronda de replicación es seguida por dos rondas de división, conocidas como meiosis I y meiosis II. Durante la meiosis I, los cromosomas homólogos se recombinan y se separan en dos células, comprendiendo cada una de las cuales un contenido haploide completo de cromosomas. En la meiosis II, las dos células resultantes de la meiosis I se dividen adicionalmente, y las cromátidas hermanas se segregan.  
25 Las esporas resultantes de esta división son, por lo tanto, haploides y contienen información genética recombinada.

30 Entre las anomalías que conducen a la formación de gametos 2n se incluyen, en particular, la citocinesis anormal, la omisión de la primera o segunda división meiótica o la geometría anormal del huso (para una revisión, véase, VEILLEUX, *Plant Breeding Reviews* 3, 252-288, 1985, o BRETAGNOLLE y THOMPSON, *New Phytologist* 129, 1-22, 1995). Estas anomalías dan lugar a diferentes clases de gametos no reducidos. Por ejemplo, el fracaso de la primera división meiótica da lugar a gametos de Restitución de Primera División (FDR, *First Division Restitution*), mientras que el fracaso de la segunda división meiótica da lugar a gametos de restitución de segunda división (SDR).  
35

Aunque se han descrito numerosos mutantes capaces de producir gametos 2n en diversas especies de plantas, hasta ahora se ha identificado y caracterizado a nivel molecular sólo un gen implicado en la formación de polen 2n. La inactivación de este gen, denominado *AtPS1* (por *Arabidopsis thaliana parallel spindles*), genera esporas masculinas diploides, dando lugar a granos de polen diploides viables y a plantas triploides espontáneas en la progenie. Este gen y su utilización para producir polen 2n se dan a conocer en la Patente EP08490672, presentada el 8 de julio de 2008, y en la publicación de D'ERFURTH et al (PLoS Genet. Noviembre de 2008; 4(11):e1000274. Publicación electrónica de 28 de noviembre de 2008).  
40

45 Los inventores han identificado ahora en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, otro gen implicado en la formación de gametos 2n en plantas. Los inventores han descubierto que la inactivación de este gen da como resultado la omisión de la segunda división meiótica. Esto genera esporas masculinas y femeninas diploides, dando lugar a gametos masculinos y femeninos diploides viables, que son gametos SDR. Este gen se designará en lo sucesivo *OSD1*, por omisión de la segunda división. La secuencia del gen *OSD1* de *Arabidopsis thaliana* está disponible en la base de datos TAIR con el número de acceso At3g57860 o en la base de datos GenBank con el número de acceso NM\_115648. Este gen codifica una proteína de 243 aminoácidos (GenBank NP\_191345), cuya secuencia también está representada en el listado de secuencias adjunto como SEQ ID NO: 1.  
50

55 El gen *OSD1* de *Arabidopsis thaliana* ha sido descrito previamente como gen "*UVI4-Like*" (*UVI4-L*), en una publicación de HASE et al. (*Plant J*, 46, 317-26, 2006)), que describe su parálogo, denominado *UVI4*. Según HASE et al., *UVI4* actúa como un supresor de la endorreduplicación y es necesario para mantener el estado mitótico, mientras que *OSD1* (*UVI4-L*) no parece ser necesario para este proceso. Por el contrario, tal como se muestra en el presente documento, *OSD1* parece necesario para permitir la transición de la meiosis I a la meiosis II.  
60

65 Los inventores también han identificado en arroz (*Oryza sativa*) un ortólogo del gen *OSD1* de *Arabidopsis thaliana*. La secuencia del gen *OSD1* de *Oryza sativa* está disponible en las bases de datos OryGenes o TAIR con el número de acceso Os02g37850. Codifica una proteína de 234 aminoácidos, cuya secuencia está representada en el listado de secuencias adjunto como SEQ ID NO: 35. Las proteínas *OSD1* de *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa* tienen el 23,6 % de identidad y el 35 % de similitud sobre la longitud total de sus secuencias.

La presente invención es tal como se define en las reivindicaciones 1 a 10.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para obtener una planta productora de gametos de Restitución de Segunda División 2n, en el que dicho procedimiento comprende la inhibición en dicha planta de una proteína designada en lo sucesivo proteína OSD1, en el que dicha proteína OSD1

- a. tiene, como mínimo, el 35 % de identidad de secuencia utilizando el algoritmo de alineamiento global de Needleman-Wunsch o, como mínimo, el 50 % de similitud de secuencia utilizando la matriz de puntuación BLOSUM62 con la proteína AtOSD1 de la SEQ ID NO: 1 o con la proteína OsOSD1 de la SEQ ID NO: 35, y
- b. permite la transición de la meiosis I a la meiosis II,

en el que la inhibición de la proteína OSD1 se obtiene mediante mutagénesis del gen *OSD1* o de su promotor, y se seleccionan los mutantes que han perdido parcial o totalmente la actividad de la proteína OSD1, y en el que la mutagénesis se realiza mediante delección dirigida de la secuencia codificante o del promotor del gen que codifica dicha proteína o de una parte del mismo, o mediante inserción dirigida de una secuencia exógena dentro de dicha secuencia codificante o de dicho promotor, o mediante inducción de mutaciones aleatorias o mutagénesis insercional aleatoria, seguida de un cribado de los mutantes dentro del gen deseado. A menos que se especifique lo contrario, los valores de identidad y similitud de secuencia de proteína dados a conocer en el presente documento se calculan sobre la longitud total de las secuencias, utilizando el programa BLASTP con parámetros predeterminados, o el algoritmo de alineamiento global de Needleman-Wunsch (herramienta Needle de alineamiento por pares EMBOSS con parámetros predeterminados). Los cálculos de similitud se realizan utilizando la matriz de puntuación BLOSUM62.

Los gametos SDR 2n producidos, según la presente invención, son útiles en todas las aplicaciones habituales de los gametos 2n, por ejemplo, para producir plantas poliploides, o para permitir cruces entre plantas de diferente nivel de ploidía. También pueden ser útiles en procedimientos de mapeo genético, por ejemplo el procedimiento de "Mapeo de progenie inverso" dado a conocer en la Patente US20080057583.

Los inventores han descubierto, además, que combinando la inactivación de *OSD1*, con la inactivación de otros dos genes, uno (*SPO11-1*) que codifica una proteína necesaria para una recombinación meiótica eficiente en plantas, y cuya inhibición elimina la recombinación y el apareamiento (GRELON et al., Embo J, 20, 589-600, 2001), y otro (*REC8*, At2g47980) que codifica una proteína necesaria para la orientación monopolar de los cinetocoros durante la meiosis (CHELYSHEVA et al., J Cell Sci, 118, 4621-32, 2005), y cuya inhibición modifica la segregación de cromátidas, dio como resultado un genotipo en el que la meiosis es totalmente sustituida por mitosis sin afectar a los procesos sexuales posteriores. Este genotipo se denominará en lo sucesivo *MiMe* por "mitosis en lugar de meiosis". Esta sustitución de la meiosis por la mitosis da como resultado gametos apomeióticos, que conservan toda la información genética del progenitor (BICKNELL y KOLTUNOW, Plant Cell, 16 Supl., S228-45, 2004).

La figura 1 da a conocer una comparación esquemática entre los mecanismos de la mitosis, la meiosis normal, la meiosis en el mutante *osd1*, la meiosis en un mutante que carece de actividad SPO11-1 (*Atspo11-1*), la meiosis en un mutante doble que carece de actividad SPO11-1 y REC8 (*Atspo11-1/Atrec8*) y la meiosis en el mutante *MiMe*.

Durante la mitosis en células diploides, los cromosomas se replican y las cromátidas hermanas se segregan para generar células hijas que son diploides y genéticamente idénticas a la célula inicial. Durante la meiosis normal, dos rondas de segregación cromosómica siguen a una única ronda de replicación. En la primera división, los cromosomas homólogos se recombinan y se separan. La meiosis II es más similar a la mitosis, lo que da como resultado una distribución igualitaria de las cromátidas hermanas. Las esporas obtenidas son, por lo tanto, haploides y contienen información genética recombinada. En el mutante *osd1* (este estudio), se omite la meiosis II, lo que da lugar a esporas diploides y gametos SDR con información genética recombinada.

El mutante *Atspo11-1* experimenta una primera división desequilibrada seguida de una segunda división que conduce a esporas desequilibradas y esterilidad.

El mutante doble *Atspo11-1/Atrec8* experimenta una división similar a la mitótica en lugar de una primera división meiótica normal, seguida de una segunda división desequilibrada que conduce a esporas desequilibradas y esterilidad.

En el mutante triple *osd1/Atspo11-1/Atrec8* (*MiMe*), la presencia de las mutaciones *Atspo11-1* y *Atrec8* conduce a una primera división meiótica similar a la mitótica y la presencia de la mutación *osd1* impide que se produzca la segunda división meiótica. De este modo, la meiosis se sustituye por una división similar a la mitótica. Las esporas y gametos obtenidos son genéticamente idénticos a la célula inicial.

Los gametos apomeióticos producidos por el mutante *MiMe* pueden utilizarse, de la misma forma que los gametos SDR 2n, para producir plantas poliploides o para cruzar plantas de diferente nivel de ploidía. También son de interés para la producción de plantas apomícticas, es decir, plantas que son capaces de formar semillas a partir de los tejidos maternos del óvulo, lo que da como resultado una progenie que son clones genéticos del progenitor materno. Aunque existe en más de 400 especies de angiospermas, muy pocas especies de cultivo son apomícticas y los intentos de introducir este rasgo mediante cruzamiento han fracasado (SAVIDAN, The Flowering of Apomixis: From Mechanisms to Genetic Engineering 2001; SPILLANE et al., Sexual Plant Reproduction, 14, 2001).

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para obtener una planta productora de gametos apomeióticos, en el que dicho procedimiento comprende la inhibición en dicha planta de las siguientes proteínas:

- a) la proteína OSD1, tal como se ha definido anteriormente;
- b) una proteína implicada en la iniciación de la recombinación meiótica en plantas, siendo dicha proteína seleccionada entre:

- i) una proteína designada en lo sucesivo proteína SPO11-1, en la que dicha proteína tiene, como mínimo, el 55 % de identidad de secuencia, o, como mínimo, el 70 % de similitud de secuencia con la proteína SPO11-1 de la SEQ ID NO: 2;

- ii) una proteína designada en lo sucesivo proteína SPO11-2, en la que dicha proteína tiene, como mínimo, el 60 % de identidad de secuencia, o, como mínimo, el 75 % de similitud de secuencia con la proteína SPO11-2 de la SEQ ID NO: 3;

- iii) una proteína designada en lo sucesivo proteína PRD1, en la que dicha proteína tiene, como mínimo, el 25 % de identidad de secuencia, o, como mínimo, el 40 % de similitud de secuencia con la proteína PRD1 de la SEQ ID NO: 4;

- iv) una proteína designada en lo sucesivo proteína PAIR1, en la que dicha proteína tiene, como mínimo, el 30 % de identidad de secuencia, o, como mínimo, el 40 % de similitud de secuencia con la proteína PAIR1 de la SEQ ID NO: 5;

- c) una proteína designada en lo sucesivo proteína Rec8, en la que dicha proteína tiene, como mínimo, el 40 % de identidad de secuencia, o, como mínimo, el 50 % de similitud de secuencia con la proteína Rec8 de la SEQ ID NO: 6,

en el que en este procedimiento, el porcentaje de identidad se calcula utilizando el algoritmo de alineación global de Needleman-Wunsch y el porcentaje de similitud se calcula utilizando la matriz de puntuación BLOSUM62, y en el que,

- la inhibición de dichas proteínas se obtiene mediante mutagénesis del gen que codifica dicha proteína o de su promotor, y se seleccionan los mutantes que han perdido parcial o totalmente la actividad de dicha proteína, y en el que la mutagénesis se realiza mediante delección dirigida de la secuencia codificante o del promotor del gen que codifica dicha proteína o de una parte del mismo, o mediante inserción dirigida de una secuencia exógena dentro de dicha secuencia codificante o de dicho promotor, o mediante inducción de mutaciones aleatorias o mutagénesis insercional aleatoria, seguida de un cribado de los mutantes dentro del gen deseado, o

- la inhibición de dichas proteínas se obtiene mediante la expresión en dicha planta de un ARN silenciador dirigido al gen que codifica dicha proteína.

La SEQ ID NO: 2 representa la secuencia de la proteína SPO11-1 de *Arabidopsis thaliana*. Esta secuencia también está disponible en la base de datos Swissprot con el número de acceso Q9M4A2.

La SEQ ID NO: 3 representa la secuencia de la proteína SPO11-2 de *Arabidopsis thaliana*. Esta secuencia también está disponible en la base de datos SwissProt con el número de acceso Q9M4A1.

La SEQ ID NO: 4 representa la secuencia de la proteína PRD1 de *Arabidopsis thaliana*. Esta secuencia también está disponible en la base de datos GenBank con el número de acceso ABQ12642.

La SEQ ID NO: 5 representa la secuencia de la proteína PAIR1 de *Arabidopsis thaliana*. Esta secuencia también está disponible en la base de datos GenBank con el número de acceso NP\_171675.

La SEQ ID NO: 6 representa la secuencia de la proteína Rec8 de *Arabidopsis thaliana*. Esta secuencia también está disponible en la base de datos GenBank con el número de acceso NP\_196168.

Las proteínas SPO11-1, SPO11-2, PRD1, PAIR1 y Rec8 se conservan en plantas superiores, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas. A modo de ejemplos no limitativos de ortólogos de las

proteínas SPO11-1, SPO11-2, PRD1, PAIR1 y Rec8 de *Arabidopsis thaliana* en plantas monocotiledóneas, se pueden citar las proteínas SPO11-1, SPO11-2, PRD1, PAIR1 y Rec8 de *Oryza sativa*. La secuencia de la proteína SPO11-1 de *Oryza sativa* está disponible en GenBank con el número de acceso AAP68363; la secuencia de la proteína SPO11-2 de *Oryza sativa* está disponible en GenBank con el número de acceso NP\_001061027; la secuencia de la proteína PRD1 de *Oryza sativa* está disponible en GenBank con el número de acceso EAZ30311; la secuencia de la proteína PAIR1 de *Oryza sativa* está disponible en SwissProt con el número de acceso Q75RY2; la secuencia de la proteína Rec8 de *Oryza sativa* está disponible en GenBank con el número de acceso AAQ75095.

La inhibición de las proteínas OSD1, SPO11-1, SPO11-2, PRD1, PAIR1 o Rec8 mencionadas anteriormente se puede obtener ya sea eliminando, bloqueando o disminuyendo su función o, de manera ventajosa, previniendo o regulando negativamente la expresión de los genes correspondientes.

A modo de ejemplo, la inhibición de dicha proteína se puede obtener mediante la mutagénesis del gen correspondiente o de su promotor, y la selección de los mutantes que han perdido parcial o totalmente la actividad de dicha proteína. Por ejemplo, una mutación dentro de la secuencia codificante puede inducir, dependiendo de la naturaleza de la mutación, la expresión de una proteína inactiva, o de una proteína con una actividad alterada; de la misma manera, una mutación dentro de la secuencia promotora puede inducir una falta de expresión de dicha proteína o una disminución de la misma.

La mutagénesis se puede realizar, por ejemplo, mediante la delección dirigida de la secuencia codificante o del promotor del gen que codifica dicha proteína o de una parte del mismo, o mediante la inserción dirigida de una secuencia exógena dentro de dicha secuencia codificante o dicho promotor. También se puede realizar mediante la inducción de mutaciones aleatorias, por ejemplo, mediante mutagénesis EMS o mutagénesis insercional aleatoria, seguida del cribado de los mutantes dentro del gen deseado. En la técnica se encuentran disponibles procedimientos para la mutagénesis y el cribado de alto rendimiento. A modo de ejemplo, se puede mencionar TILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes, descrito por McCallum et al., 2000).

Entre las mutaciones dentro del gen *OSD1*, las que dan lugar a la capacidad de producir gametos SDR 2n pueden identificarse sobre la base de las características fenotípicas de las plantas que son homocigóticas para esta mutación: estas plantas pueden formar, como mínimo, el 5 %, de manera preferente, como mínimo, el 10 %, de manera más preferente, como mínimo, el 20 %, de manera aún más preferente, como mínimo, el 50 %, y hasta el 100 % de diádas como producto de la meiosis.

Entre las mutaciones dentro de un gen que codifica una proteína implicada en la iniciación de la recombinación meiótica en plantas, tales como el gen *SPO11-1* o el gen *SPO11-2*, *PRD1* o *PAIR1*, aquellas útiles para obtener una planta productora de gametos apomeióticos pueden identificarse sobre la base de las características fenotípicas de las plantas que son homocigóticas para esta mutación, en particular la presencia de univalentes en lugar de bivalentes en la meiosis I, y la esterilidad de la planta.

Entre los mutantes que tienen una mutación dentro del gen *REC8*, aquellos útiles para obtener una planta productora de gametos apomeióticos se pueden identificar sobre la base de las características fenotípicas de las plantas que son homocigóticas para esta mutación, en particular la fragmentación cromosómica en la meiosis y la esterilidad de la planta.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para obtener una planta productora de gametos de Restitución de Segunda División 2n, en el que dicho procedimiento comprende la inhibición de la proteína OSD1, en el que dicha proteína OSD1 es tal como se ha definido anteriormente y en el que la inhibición de dicha proteína OSD1 se obtiene mediante la expresión en dicha planta de un ARN silenciador dirigido al gen que codifica dicha proteína.

Los procedimientos para silenciar genes en plantas son conocidos en sí mismos en la técnica. Por ejemplo, se puede mencionar la inhibición antisentido o la cosupresión, tal como se describen, a modo de ejemplo, en las Patentes US5,190,065 y US5,283,323. También es posible utilizar ribozimas dirigidas al ARNm de dicha proteína.

Los procedimientos preferentes son aquellos en los que el silenciamiento génico se induce por medio de ARN de interferencia (ARNi), utilizando un ARN silenciador que se dirige al gen que se va a silenciar. En la técnica se encuentran disponibles diversos procedimientos y construcciones de ADN para el suministro de ARN silenciadores.

Un "ARN silenciador" se define en el presente documento como un ARN pequeño que puede silenciar un gen diana de una manera específica de secuencia mediante el apareamiento de bases con moléculas de ARNm complementarias. Los ARN silenciadores incluyen, en particular, ARN de interferencia pequeños (ARNip) y microARN (miARN).

Inicialmente, las construcciones de ADN para suministrar un ARN silenciador en una planta incluían un fragmento de 300 pb o más (en general, 300-800 pb, aunque secuencias más cortas pueden inducir a veces un silenciamiento eficaz) del ADNc del gen diana, bajo el control transcripcional de un promotor activo en dicha planta. Actualmente, las construcciones de ARN silenciador más ampliamente utilizadas son aquellas que pueden producir transcripciones de ARN de horquilla (ARNh). En estas construcciones, el fragmento del gen diana se repite de forma inversa, con, generalmente, una región espaciadora entre las repeticiones (para una revisión, véase WATSON *et al.*, 2005). También se pueden utilizar microARN artificiales (miARNa) dirigidos contra el gen que se va a silenciar (para una revisión sobre el diseño y las aplicaciones de los ARN silenciadores, que incluyen, en particular, los miARNa, en plantas, véase, por ejemplo, OSSOWSKI *et al.*, (Plant J., 53, 674-90, 2008).

La presente invención da a conocer herramientas para silenciar uno o más genes diana seleccionados entre *OSD1*, *SPO11-1*, *SPO11-2*, *PRD1*, *PAIR1* y *REC8*, incluyendo, en particular, casetes de expresión para ARNhp o miARNa dirigidos a dicho o dichos genes.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un casete de expresión que comprende:

- un promotor funcional en una célula vegetal;
- como mínimo, una construcción de ADN seleccionada entre:

- a) una o más construcciones de ADN de 200 a 1.000 pb, comprendiendo cada una de las cuales un fragmento de un ADNc del gen *OSD1* y puede comprender, además, un fragmento de un ADNc de un gen diana seleccionado entre *SPO11-1*, *SPO11-2*, *PRD1*, *PAIR1* y *REC8*, o de sus complementarios, o que tiene, como mínimo, el 95 % de identidad con dicho fragmento, estando dicha secuencia o secuencias de ADN colocadas bajo el control transcripcional de dicho promotor;
- b) una o más construcciones de ADN en horquilla capaces, cuando se transcriben, de formar un ARN en horquilla dirigido, como mínimo, al gen *OSD1* y de poder formar, además, un ARN en horquilla dirigido a un gen seleccionado entre *SPO11-1*, *SPO11-2*, *PRD1*, *PAIR1* y *REC8*;
- c) una o más construcciones de ADN capaces, cuando se transcriben, de formar un miARNa dirigido al gen *OSD1* y de poder formar, además, un miARNa dirigido a un gen seleccionado entre *SPO11-1*, *SPO11-2*, *PRD1*, *PAIR1* y *REC8*;

estando dicha construcción o construcciones de ADN colocadas bajo el control transcripcional de dicho promotor.

En general, dicha construcción de ADN en horquilla comprende: i) una primera secuencia de ADN de 200 a 1.000 pb, de manera preferente, de 300 a 900 pb, que consiste en un fragmento de un ADNc del gen diana, o que tiene, como mínimo, el 95 % de identidad, y por orden de preferencia creciente, como mínimo, el 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con dicho fragmento; ii) una segunda secuencia de ADN que es la complementaria de dicho primer ADN, estando dichas primera y segunda secuencias en orientaciones opuestas y iii) una secuencia espaciadora que separa dichas primera y segunda secuencias, de modo que estas primera y segunda secuencias de ADN son capaces, cuando se transcriben, de formar una única molécula de ARN bicatenario. El espaciador puede ser un fragmento aleatorio de ADN. Sin embargo, de manera preferente, se utilizará un intrón que sea empalmable por la célula vegetal diana. Su tamaño es, en general, de 400 a 2.000 nucleótidos de longitud.

En una realización, la presente invención se refiere a un casete de expresión, tal como se ha definido anteriormente, que comprende una construcción de ADN dirigida al gen *OSD1*.

En una realización, la presente invención se refiere a un casete de expresión, tal como se ha definido anteriormente, que comprende: una construcción de ADN dirigida al gen *OSD1*, una construcción de ADN dirigida a un gen seleccionado entre *SPO11-1*, *SPO11-2*, *PRD1* y *PAIR1*, y una construcción de ADN dirigida a *REC8*.

En la técnica se encuentra disponible una amplia variedad de promotores adecuados para la expresión de genes heterólogos en plantas.

Pueden obtenerse, por ejemplo, a partir de plantas, virus vegetales o bacterias, tales como *Agrobacterium*. Incluyen promotores constitutivos, es decir, promotores que son activos en la mayoría de los tejidos y células y en la mayoría de las condiciones ambientales, así como promotores específicos de tejido o específicos de célula que son activos solo o principalmente en determinados tejidos o determinados tipos de células, y promotores inducibles que se activan por estímulos físicos o químicos, tales como los que resultan de la infección por nematodos.

Ejemplos no limitativos de promotores constitutivos que se utilizan habitualmente en células vegetales son el

promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), el promotor Nos, el promotor de rubisco y el promotor del virus del mosaico de la vena de la yuca (CsVMV).

5 Entre los promotores específicos de órganos o tejidos que se pueden utilizar en la presente invención se incluyen, en particular, promotores capaces de conferir expresión asociada a la meiosis, tales como el promotor *DMC1* (KLIMYUK y JONES, Plant J, 11, 1-14, 1997); también se puede utilizar cualquiera de los promotores endógenos de los genes *OSD1*, *SPO11-1*, *SPO11-2*, *PRD1*, *PAIR1* o *REC8*.

10 Las construcciones de ADN de la presente invención, en general, también incluyen un terminador transcripcional (por ejemplo, el terminador transcripcional 35S o el terminador transcripcional de la nopalina sintasa (Nos)).

15 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un vector recombinante que comprende un casete de expresión, tal como se ha definido anteriormente. Clásicamente, dichos vectores recombinantes también incluyen uno o más genes marcadores, que permiten la selección de hospedadores transformados.

20 La selección de vectores adecuados y los procedimientos para insertar construcciones de ADN en los mismos son bien conocidos por el experto en la materia. La elección del vector depende del hospedador previsto y del procedimiento de transformación previsto de dicho hospedador. En la técnica se encuentran disponibles diversos procedimientos para la transformación genética de células vegetales o plantas para muchas especies vegetales, dicotiledóneas o monocotiledóneas. A modo de ejemplos no limitativos, se pueden mencionar la transformación mediada por virus, la transformación por microinyección, por electroporación, la transformación mediada por microproyectiles, la transformación mediada por *Agrobacterium* y similares.

25 En otro aspecto, la presente invención se refiere a una planta productora de gametos de Restitución de Segunda División 2n,

30 en la que está inhibida una proteína, en lo sucesivo denominada proteína OSD1, teniendo dicha proteína OSD1, como mínimo, el 35 % de identidad de secuencia o, como mínimo, el 50 % de similitud de secuencia con la proteína AtOSD1 de la SEQ ID NO: 1 o con la proteína OsOSD1 de la SEQ ID NO: 35, en la que el porcentaje de identidad se calcula utilizando el algoritmo de alineamiento global de Needleman-Wunsch y el porcentaje de similitud se calcula utilizando la matriz de puntuación BLOSUM62, en la que:

35 el gen que codifica la proteína o su promotor está mutado y el mutante obtenido ha perdido parcial o totalmente la actividad de la proteína, o un ARN silenciador dirigido al gen que codifica la proteína está expresado en dicha planta.

40 En otro aspecto, la presente invención se refiere a una planta productora de gametos apomeióticos, en la que están inhibidas las siguientes proteínas:

45 a) una proteína designada en lo sucesivo proteína OSD1, teniendo dicha proteína OSD1, como mínimo, el 35 % de identidad de secuencia o, como mínimo, el 50 % de similitud de secuencia con la proteína AtOSD1 de la SEQ ID NO: 1 o con la proteína OsOSD1 de la SEQ ID NO: 35,  
b) una proteína implicada en la iniciación de la recombinación meiótica en plantas, siendo dicha proteína seleccionada entre:

50 i) una proteína designada en lo sucesivo proteína SPO11-1, en la que dicha proteína tiene, como mínimo, el 55 % de identidad de secuencia, o, como mínimo, el 70 % de similitud de secuencia con la proteína SPO11-1 de la SEQ ID NO: 2;

ii) una proteína designada en lo sucesivo proteína SPO11-2, en la que dicha proteína tiene, como mínimo, el 60 % de identidad de secuencia, o, como mínimo, el 75 % de similitud de secuencia con la proteína SPO11-2 de la SEQ ID NO: 3;

55 iii) una proteína designada en lo sucesivo proteína PRD1, en la que dicha proteína tiene, como mínimo, el 25 % de identidad de secuencia, o, como mínimo, el 40 % de similitud de secuencia con la proteína PRD1 de la SEQ ID NO: 4;

60 iv) una proteína designada en lo sucesivo proteína PAIR1, en la que dicha proteína tiene, como mínimo, el 30 % de identidad de secuencia, o, como mínimo, el 40 % de similitud de secuencia con la proteína PAIR1 de la SEQ ID NO: 5;

65 c) una proteína designada en lo sucesivo proteína Rec8, en la que dicha proteína tiene, como mínimo, el 40 % de identidad de secuencia, o, como mínimo, el 50 % de similitud de secuencia con la proteína Rec8 de la SEQ ID NO: 6,

en la que el porcentaje de identidad se calcula utilizando el algoritmo de alineación global de

Needleman-Wunsch y el porcentaje de similitud se calcula utilizando la matriz de puntuación BLOSUM62, en la que:

5 el gen que codifica la proteína o su promotor está mutado, y el mutante obtenido ha perdido parcial o totalmente la actividad de la proteína, o un ARN silenciador dirigido al gen que codifica la proteína está expresado en dicha planta.

10 En una realización, la presente invención se refiere a una planta, tal como se ha definido anteriormente, que es una planta transgénica que contiene un transgén que comprende un casete de expresión, tal como se ha definido anteriormente, que comprende: una construcción de ADN dirigida al gen *OSD1*, una construcción de ADN dirigida a un gen seleccionado entre *SPO11-1*, *SPO11-2*, *PRD1* y *PAIR1*, y una construcción de ADN dirigida a *REC8*.

15 Esto también incluye plantas transformadas genéticamente por una o más construcciones de ADN de la presente invención. De manera preferente, dichas plantas son plantas transgénicas, en las que dicha construcción está contenida en un transgén integrado en el genoma de la planta, de modo que se transmite a generaciones sucesivas de plantas.

20 La expresión de una construcción de ADN quimérica dirigida al gen *OSD1*, que da como resultado una regulación negativa de la proteína *OSD1*, proporciona a dicha planta transgénica la capacidad de producir gametos SDR 2n. La coexpresión de una construcción de ADN quimérica dirigida al gen *OSD1*, una construcción de ADN quimérica dirigida a un gen seleccionado entre *SPO11-1*, *SPO11-2*, *PRD1* y *PAIR1*, y una construcción de ADN quimérica dirigida al gen *REC8*, da como resultado una regulación negativa de las proteínas codificadas por estos tres genes y proporciona a dicha planta transgénica la capacidad de producir gametos apomeióticos.

30 La presente invención también abarca un procedimiento para producir gametos SDR 2n, en el que dicho procedimiento comprende cultivar una planta de la presente invención y recuperar los gametos producidos por dicha planta. De manera preferente, dichos gametos comprenden, como mínimo, el 10 %, de manera más preferente, como mínimo, el 20 %, y por orden de preferencia creciente, como mínimo, el 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % de gametos 2n viables.

35 La presente invención también abarca un procedimiento para producir gametos apomeióticos, en el que dicho procedimiento comprende cultivar una planta de la presente invención y recuperar los gametos producidos por dicha planta. De manera preferente, dichos gametos comprenden, como mínimo, el 10 %, de manera más preferente, como mínimo, el 20 %, y por orden de preferencia creciente, como mínimo, el 30 %, 40 %, 50 % o 60 %, 70 %, 80 % o 90 % de gametos apomeióticos viables.

40 La presente invención se aplica a una amplia gama de plantas monocotiledóneas o dicotiledóneas de interés agronómico. A modo de ejemplos no limitativos, se pueden mencionar la patata, el arroz, el trigo, el maíz, el tomate, el pepino, la alfalfa, la caña de azúcar, la batata, la mandioca, el trébol, la soja, el raigrás, el plátano, el melón, la sandía, el algodón o plantas ornamentales, tales como las rosas, los lirios, los tulipanes y los narcisos.

45 Los objetivos y ventajas anteriores y otros de la presente invención resultarán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y los dibujos adjuntos. Sin embargo, debe entenderse que esta descripción detallada anterior es solo a modo de ejemplo y no limita la presente invención.

50 **EJEMPLOS:**

**PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES**

**Material vegetal y condiciones de crecimiento.**

55 Las plantas de *Arabidopsis* se cultivaron, tal como se ha descrito en VIGNARD et al., (PLoS Genet, 3, 1894-906, 2007). Para los ensayos de germinación y los experimentos de citometría, se cultivaron *Arabidopsis in vitro* en medio *Arabidopsis* (ESTELLE y SOMERVILLE, Mol. Gen. Genet., 206, 200-06, 1987) a 21 °C con un fotoperiodo de 16 horas de día/8 horas de noche y una higrometría del 70 %.

60 **Análisis genético.**

65 Las plantas se genotiparon mediante PCR (30 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 56 °C y 1 minuto a 72 °C) utilizando dos pares de cebadores. Para cada genotipo, el par de cebadores se muestra en la tabla I y el par de cebadores específico para la inserción se muestra en la tabla II.

Tabla I

	Cebadores para alelo de tipo silvestre
<i>osd1-1</i>	pst15307U (5'CGTCACTCTCCCAAGAAAG 3') (SEQ ID NO: 7) pst15307L (5'GGCTAAGCAAGCCTGCTATG 3') (SEQ ID NO: 8)
<i>osd1-2</i>	GT21481U (5'CCGGTGTTCCTTGACTCG 3') (SEQ ID NO: 9) GT21481L (5'GCAGATTCCTAATTCAGCTC 3') (SEQ ID NO: 10)
<i>Atspo11-1-3</i>	N646172U (5'AATCGGTGAGTCAGGTTTCAG 3') (SEQ ID NO: 11) N646172L (5'CCATGGATGAAAGCGATTTAG 3') (SEQ ID NO: 12)
<i>Atrec8-3</i>	N836037U (5'CTCATATTCACGGTGCTCCC 3') (SEQ ID NO: 13) N836037L (5'GGGGGAAAAGAGAAAGGTTTC 3') (SEQ ID NO: 14)

Tabla II

	Cebadores para alelo mutante
<i>osd1-1</i>	pst15307L Ds5-2a (5'TCCGTTCCGTTTTTCGTTTTTTAC3') (SEQ ID NO: 15)
<i>osd1-2</i>	GT21481U Ds3-4 (5'CCGTCCCAGTAAATATG3') (SEQ ID NO: 16)
<i>Atspo11-1-3</i>	N646172L LbSaik2 (5'GCTTTCTCCGTTCCCTTTCTC 3') (SEQ ID NO: 17)
<i>Atrec8-3</i>	N836137L LB3saill (5'TAGCATCTGAATTTGATAACCAATCTCGATACAC3') (SEQ ID NO: 18)

- 5 Los marcadores genéticos utilizados para genotipar la población F1 *osd1-1*(No-0)/*osd1-2*(Ler) x Col-0 y la población F1 del triple mutante *osd1-1*(No-0)/*spo11-1*(Col-0)/*rec8*(Col-0) x Ler se enumeran en la tabla III. Las condiciones de PCR fueron 40 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a Tf y 30 segundos a 72 °C.

Tabla III

marcador	Cromosoma	Posición pb	Cebador 1 (SEQ ID NO:.)	Cebador 2 (SEQ ID NO:.)
Msat1-13	1	25827433	CAAGCACCAGGGTC (19)	GTCAAACCAGTTCAATCA(20)
F5i14	1	24374008	CTGCCCTGAAATTGTCGAAAC(21)	GGCATCACAGTTCGTGATTCC(22)
Msat2-18	2	2799644	TAGTCTCTTTTGGTGGCATA(23)	AGCCTCTCCAAGCTTAGGTCT(24)
Msat2-21	2	11461020	ATTTTACCCCAATCACGTTT(25)	AGGTCAAGTGAAAGGGTAAGG(26)
Msat2-9	2	18152560	TAAAAGAGTCCCTCGTAAAG(27)	GTTGTTGTTGTGGCATT(28)
CapsK4_10355	4	10354800	ACCCATTTGGTGATGCTAAC(29)	GAGCAGTTTCCACCTTGTCC(30)
Msat4-18	4	11966304	TGTAATATCGGCTTCTAAG(31)	CTGAAACAATAATCCATT(32)
Nga151	5	4669932	GTTTTGGGAAGTTTTCCTGG(33)	CAGTCTAAAAGCGGAGAGTATGATG(34)

Estos marcadores se amplificaron (40 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 58 °C y 30 segundos a 72 °C) con los cebadores indicados y se observaron después de la migración en gel de agarosa al 3 %.

Se observó CAPS K4 10355 después de la doble digestión con Eco47III/HpaI. Los dos pares de cebadores específicos para los bordes de inserción de *osd1-1* y *osd1-2* se utilizaron como marcador en el cromosoma 3.

### **Citología y Citometría de Flujo:**

5 Los productos meióticos finales se observaron, tal como se ha descrito en AZUMI et al., (Embo J, 21, 3081-95, 2002) y se observaron con un microscopio óptico convencional con un objetivo seco de 40X. Las propagaciones y observaciones de cromosomas se llevaron a cabo utilizando la técnica descrita en MERCIER et al., (Biochimie, 83, 1023-28, 2001). La fluorescencia del ADN de los núcleos de polen espermático se cuantificó utilizando el software Open LAB 4.0.4. Para cada núcleo se calculó el ruido circundante y se restó de la fluorescencia global del núcleo. Los husos meióticos se observaron según el protocolo descrito en MERCIER et al., (Genes Dev, 15, 1859-71, 2001), excepto que el ADN se contratiñó con DAPI. Las observaciones se realizaron utilizando un microscopio confocal Leica SP2. Las imágenes se adquirieron con un objetivo de agua de 63X en xyz y se realizaron reconstrucciones 3D utilizando el software de Leica. Se muestran las proyecciones. Se obtuvieron imágenes de las células a una excitación de 488 nm y 405 nm con AlexaFluor488 y DAPI, respectivamente. Los tamaños del genoma de *Arabidopsis* se midieron, tal como se ha descrito en MARIE y BROWN, (Biol Cell, 78, 41-51, 1993) utilizando como patrón el tomate *Lycopersicon esculentum* cv "Montfavet". (2C = 1,99 pg, %GC = 40,0 %)

### **EJEMPLO 1: PRODUCCIÓN DE GAMETOS DIPLOIDES POR MUTANTES *osd1*.**

20 Como parte de un cribado de los perfiles de expresión para genes meióticos, utilizando la herramienta Expression Angler (TOUFIGHI et al., Plant J, 43, 153-63, 2005) con el conjunto de tejidos AtGenExpress (SCHMID et al., Nat Genet, 37, 501-6, 2005), se seleccionó At3g57860 como un buen candidato debido a su corregulación con varios genes meióticos conocidos. At3g57860 corresponde al gen *UVI4-Like (UVI4-L)* que fue descrito brevemente en un estudio de su parólogo, el gen *UVI4 (HASE et al., Plant J, 46, 317-26, 2006)*. Debido a su papel en la meiosis (ver más abajo), se renombró el gen At3g57860 como *OSD1*, por omisión de la segunda división. Las proteínas OSD1 y UVI4 se conservan en todo el reino vegetal, pero no contienen ningún dominio funcional conocido conservado obvio. No se identificaron homólogos fuera del reino vegetal.

30 Se investigó el papel del gen *OSD1* aislando y caracterizando dos mutantes. Los mutantes insercionales *Ds osd1-1* (pst15307) y *osd1-2* (GT21481) se encuentran en los antecedentes de Nooseen (No-0) y Landsberg (Ler), respectivamente, y en ambos casos la inserción se encuentra en el segundo exón del gen *OSD1*.

35 La estructura intrón/exón del gen *OSD1* y la ubicación de las dos inserciones *Ds* diferentes se muestran en la figura 2. El gen *OSD1* contiene 3 exones y 2 intrones y codifica una proteína de 243 aminoácidos. Las posiciones de las dos inserciones *Ds* están indicadas por triángulos.

40 La figura 3 representa la meiosis en plantas de tipo silvestre y la figura 4 representa la meiosis en mutantes *osd1*.

45 Leyenda de la figura 3: (A) Paquiteno. Los cromosomas homólogos están completamente sinapsados. (B) Diacinesis. Se observan cinco pares de cromosomas homólogos (bivalentes), unidos por quiasmas. (C) Metafase I. Los cinco bivalentes están alineados en la placa de metafase. (D) Anafase I. Los cromosomas homólogos están separados. (E) Telofase I. (F) Metafase II. Los pares de cromátidas hermanas se alinean en las placas de metafase. (G) Anafase II. Las cromátidas hermanas están separadas. (H e I) Telofase II. Se forman cuatro esporas haploides (tétrada). Barra de escala = 10  $\mu$ m.

50 Leyenda de la figura 4: (A y B) Productos meióticos masculinos teñidos con azul de toluidina. (A) Una tétrada de tipo silvestre. (B) Una díada en el mutante *osd1-1*. (C a D) La meiosis masculina en *osd1* es indistinguible del tipo silvestre hasta la telofase I (comparar con la figura 3), pero no se observaron figuras características de una segunda división. (C) paquiteno. (D) diacinesis. (E) metafase I. (F) Anafase I. (G) Telofase I. (H) Metafase I de la meiosis femenina en *osd1*.

55 En ambos mutantes *osd1* independientes los productos de la meiosis masculina fueron díadas (*osd1-1*: 714/714 *osd1-2*: 334/334) en lugar de tétradas (figuras 4A y B). Las pruebas de complementación entre *osd1-1* y *osd1-2* confirmaron que estas mutaciones son alélicas (*osd1-1/osd1-2*: 369 díadas/369) y, por lo tanto, demostraron que las díadas observadas se deben a la alteración del gen *OSD1*. Los mutantes *osd1* no mostraron ningún defecto de desarrollo somático, letalidad de gametofitos masculinos y femeninos o fertilidad reducida (tipo silvestre  $38 \pm 11$  semillas/fruto, *osd1*  $35 \pm 6$ ).

60 A continuación, se midieron los niveles de ploidía entre la descendencia de mutantes *osd1* diploides. Entre la progenie autofecundada, se encontraron tetraploides (84 %) y triploides (16 %), pero no plantas diploides (*osd1-1*: n = 56; *osd1-2*: n = 24). Cuando se utilizó polen mutante para fertilizar una planta de tipo silvestre, toda la progenie resultante fue triploide (*osd1-1*: n = 75). Cuando se fertilizaron óvulos mutantes con granos

de polen de tipo silvestre, se aisló el 12 % de plantas diploides y el 88 % de plantas triploides ( $n = 25$ ). Esto demostró que los mutantes *osd1* producen altos niveles de esporas diploides masculinas (100 %) y femeninas (~85 %), que dan como resultado gametos funcionales.

5 Para desentrañar los mecanismos que conducen a la producción de díadas en *osd1*, se investigó el comportamiento cromosómico durante la meiosis. La meiosis I tanto masculina como femenina fueron indistinguibles del tipo silvestre (comparar la figura 4 con la figura 3). De manera destacada, se observaron quiasmas, la manifestación citológica de cruzamientos, y bivalentes. Sin embargo, no se pudo encontrar ninguna figura de meiosis II (entre > 500 meiocitos masculinos desde la profase hasta la formación de esporas), lo que sugiere firmemente que la producción de díadas se debe a una ausencia de la segunda división meiótica. Si esta segunda división no tiene lugar, entonces cualquier heterocigosis en los centrómeros se perderá en los gametos diploides debido a la cosegregación de las cromátidas hermanas y a la separación de los homólogos durante la primera división. Debido a la recombinación, cualquier loci que no esté unido a los centrómeros se segregará. Se probó la suposición aprovechando los dos antecedentes genéticos diferentes de los mutantes *osd1-1* (No-0) y *osd1-2* (Ler). Las plantas F1 que portaban las dos mutaciones (mutante para *osd1* y heterocigótica para cualquier polimorfismo No-0/Ler) se cruzaron como masculinas o femeninas con un tercer antecedente genético, Columbia (Col-0). El cariotipo y el genotipo de las plantas obtenidas para marcadores moleculares trimórficos proporcionaron información directa sobre la composición genética de los granos de polen y los gametofitos femeninos producidos por el mutante. Todos los gametos diploides analizados tenían las características genéticas predichas. Eran sistemáticamente homocigóticos en los centrómeros y se segregaban, debido a la recombinación, en otros loci ( $n = 48$  para gametos diploides masculinos y  $n = 41$  para gametos diploides femeninos). Estos resultados confirmaron que la ausencia de una segunda división meiótica es de hecho la causa de la producción de gametos  $2n$  en *osd1*. Este mecanismo también implica que la segregación cromosómica desequilibrada en la meiosis I daría lugar a díadas desequilibradas en *osd1*; esto se confirmó analizando un mutante doble *Atspo11-1/osd1-1* (datos no mostrados).

Debido a la ausencia de la segunda división meiótica, los mutantes *osd1* producen frecuencias elevadas de gametofitos masculinos y femeninos diploides viables, que generan, después de la fecundación, plantas tetraploides viables. Sin embargo, este fenómeno difiere de la apomeiosis en que los gametos producidos son genéticamente diferentes de la planta madre.

## EJEMPLO 2: PRODUCCIÓN DE GAMETOS APOMEIÓTICOS POR MUTANTES TRIPLES *osd1/Atrec8/Atspo11-1*

35 En mutantes dobles *Atspo11-1/Atrec8* la primera división meiótica es reemplazada por una división similar a la mitótica, seguida por una segunda división desequilibrada que conduce a esporas desequilibradas y esterilidad. (CHELYSHEVA et al., J Cell Sci, 118, 4621-32, 2005).

40 Se generaron los mutantes *osd1/Atrec8/Atspo11-1*. Se obtuvieron plantas heterocigóticas para las mutaciones *Atspo11-1* y *Atrec8* cruzando plantas heterocigóticas para cada mutación y se cruzaron con una planta heterocigótica para *osd1*. Las plantas triplemente heterocigóticas identificadas se autofecundaron y se analizaron las plantas homocigóticas para las tres mutaciones.

45 La observación del comportamiento cromosómico durante la meiosis masculina y femenina de estos mutantes se muestra en la figura 5.

Leyenda de la figura 5: (A) Metafase I masculina (B) Anafase I masculina. La viñeta muestra una díada en MiMe. (C) Metafase I femenina. (D) Anafase I femenina. Barra de escala = 10  $\mu\text{m}$ .

50 Estas observaciones revelaron una división similar a la mitótica: 10 univalentes alineados en la placa de metafase y cromátidas hermanas separadas en la anafase (figura 5).

55 Las mutaciones *Atspo11-1* y *Atrec8* conducen a una primera división meiótica similar a la mitótica y la mutación *osd1* impide que se produzca la segunda división meiótica. Esto da como resultado la sustitución de la meiosis por una división similar a la mitótica y la apomeiosis.

60 Se denomina a este genotipo *MiMe* por "mitosis en lugar de meiosis". Las plantas *MiMe* generan díadas (408/408) y son fértiles ( $25 \pm 6$  semillas por fruto). Por lo tanto, la mutación *osd1* suprimió el fenotipo de esterilidad del mutante doble *Atspo11-1/Atrec8*.

65 La progenie autofecundada de plantas *MiMe* fue sistemáticamente tetraploide ( $n = 24$ ) y los retrocruzamientos entre plantas *MiMe* diploides y plantas de tipo silvestre generaron plantas triploides independientemente de si se utilizaron gametos *MiMe* masculinos ( $n = 24$ ) o femeninos ( $n = 67$ ), lo que demuestra que esta división similar a la mitótica da lugar a gametos diploides funcionales. Todos los gametos (masculinos y femeninos), probados de manera similar a la descrita anteriormente, conservaron

sistemáticamente la heterocigosidad de la planta madre para cada marcador genético probado y, por lo tanto, fueron idénticos genéticamente a la planta madre. Estos resultados confirman que las plantas *MiMe* experimentan una división similar a la mitótica en lugar de una división meiótica normal, sin afectar los procesos sexuales posteriores.

5

Cuando la meiosis es reemplazada por mitosis, se espera que la ploidía se duplique con cada generación. Esto se observó en plantas *MiMe*, tal como se muestra en la figura 6.

10

Leyenda de la figura 6: Columna de la izquierda: metafase mitótica, barra de escala = 10  $\mu$ m. Columna de la derecha: las plantas de cuatro semanas de vida correspondientes (barra de escala = 2 cm) y flores (barra de escala = 1 mm).

En generaciones posteriores, se obtuvieron tetraploides (4N, 20 cromosomas, n = 26) y octoploides (8N, 40 cromosomas, n = 33).

15

### LEJEMPLO 3: IDENTIFICACIÓN DE UN ORTÓLOGO DE ARROZ DEL GEN *OSD1* DE *ARABIDOPSIS*.

20

El genoma de *Oriza sativa* contiene dos candidatos homólogos de *OSD1*/*UVI4* (Os02g37850 y Os04g39670). Se aislaron dos mutantes de inserción de T-ADN en uno de estos supuestos homólogos (Os02g37850). Las dos líneas, AMBA12 y AMQF10, se genotiparon mediante PCR para seleccionar homocigotos. En ambas líneas se observaron plantas tetraploides espontáneas entre la descendencia de plantas mutantes diploides, lo que sugiere la producción de gametos 2n masculinos y femeninos funcionales (AMBA 12: 100 % de tetraploides, n = 30; AMQF10 37 % de tetraploides, n = 27). A continuación, se estudiaron los productos meióticos en mutantes AMB12 (n > 400) y se observó la producción del 100 % de díadas en lugar de tétradas, tal como se ilustra mediante la figura 7.

25

Leyenda de la figura 7: A: Tétrada de esporas en tipo silvestre; B: Díada de esporas en AMB12.

30

Este fenotipo es idéntico al mutante *osd1* de *Arabidopsis*. Para desentrañar los mecanismos que conducen a la producción de díadas en mutantes homocigotos AMBA12, se investigó el comportamiento cromosómico durante la meiosis. La meiosis I fue indistinguible del tipo silvestre. De manera destacada, se observaron quiasmas, la manifestación citológica de cruzamientos, y bivalentes. Sin embargo, no se pudo encontrar ninguna figura de meiosis II, lo que sugiere firmemente que la producción de esporas 2N se debe a una ausencia de la segunda división meiótica, como en *osd1* de *Arabidopsis*. En conjunto, estos resultados muestran que Os02g37850 es el homólogo funcional de *OSD1* de *Arabidopsis* y, por lo tanto, se le denominó *OsOSD1*. Las proteínas *OSD1* y *OsOSD1* tienen el 23,6 % de identidad y el 35 % de similitud en una alineación que cubre toda la longitud de las secuencias (herramienta Needle de alineación por pares EMBOSS).

35

40

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para obtener una planta productora de gametos de Restitución de Segunda División 2n, en el que dicho procedimiento comprende la inhibición en dicha planta de una proteína designada en lo sucesivo proteína OSD1, en el que dicha proteína OSD1

- a. tiene, como mínimo, el 35 % de identidad de secuencia utilizando el algoritmo de alineamiento global de Needleman-Wunsch o, como mínimo, el 50 % de similitud de secuencia utilizando la matriz de puntuación BLOSUM62 con la proteína AtOSD1 de la SEQ ID NO: 1 o con la proteína OsOSD1 de la SEQ ID NO: 35, y
- b. permite la transición de la meiosis I a la meiosis II,

en el que la inhibición de la proteína OSD1 se obtiene mediante mutagénesis del gen *OSD1* o de su promotor, y se seleccionan los mutantes que han perdido parcial o totalmente la actividad de la proteína OSD1, y en el que la mutagénesis se realiza mediante delección dirigida de la secuencia codificante o del promotor del gen que codifica dicha proteína o de una parte del mismo, o mediante inserción dirigida de una secuencia exógena dentro de dicha secuencia codificante o de dicho promotor, o mediante inducción de mutaciones aleatorias o mutagénesis insercional aleatoria, seguida de un cribado de los mutantes dentro del gen deseado.

2. Procedimiento para obtener una planta productora de gametos de Restitución de Segunda División 2n, en el que dicho procedimiento comprende la inhibición de la proteína OSD1, en el que dicha proteína OSD1 se define en la reivindicación 1 y en el que la inhibición de dicha proteína OSD1 se obtiene mediante la expresión en dicha planta de un ARN silenciador dirigido al gen que codifica dicha proteína.

3. Procedimiento para obtener una planta productora de gametos apomeióticos, en el que dicho procedimiento comprende la inhibición en dicha planta de las siguientes proteínas:

- a) la proteína OSD1, tal como se ha definido en la reivindicación 1;
- b) una proteína implicada en la iniciación de la recombinación meiótica en plantas, siendo dicha proteína seleccionada entre:
  - i) una proteína designada en lo sucesivo proteína SPO11-1, en la que dicha proteína tiene, como mínimo, el 55 % de identidad de secuencia, o, como mínimo, el 70 % de similitud de secuencia con la proteína SPO11-1 de la SEQ ID NO: 2;
  - ii) una proteína designada en lo sucesivo proteína SPO11-2, en la que dicha proteína tiene, como mínimo, el 60 % de identidad de secuencia, o, como mínimo, el 75 % de similitud de secuencia con la proteína SPO11-2 de la SEQ ID NO: 3;
  - iii) una proteína designada en lo sucesivo proteína PRD1, en la que dicha proteína tiene, como mínimo, el 25 % de identidad de secuencia, o, como mínimo, el 40 % de similitud de secuencia con la proteína PRD1 de la SEQ ID NO: 4;
  - iv) una proteína designada en lo sucesivo proteína PAIR1, en la que dicha proteína tiene, como mínimo, el 30 % de identidad de secuencia, o, como mínimo, el 40 % de similitud de secuencia con la proteína PAIR1 de la SEQ ID NO: 5;
- c) una proteína designada en lo sucesivo proteína Rec8, en la que dicha proteína tiene, como mínimo, el 40 % de identidad de secuencia, o, como mínimo, el 50 % de similitud de secuencia con la proteína Rec8 de la SEQ ID NO: 6,

en el que en este procedimiento, el porcentaje de identidad se calcula utilizando el algoritmo de alineación global de Needleman-Wunsch y el porcentaje de similitud se calcula utilizando la matriz de puntuación BLOSUM62, y en el que,

- la inhibición de dichas proteínas se obtiene mediante mutagénesis del gen que codifica dicha proteína o de su promotor, y se seleccionan los mutantes que han perdido parcial o totalmente la actividad de dicha proteína, y en el que la mutagénesis se realiza mediante delección dirigida de la secuencia codificante o del promotor del gen que codifica dicha proteína o de una parte del mismo, o mediante inserción dirigida de una secuencia exógena dentro de dicha secuencia codificante o de dicho promotor, o mediante inducción de mutaciones aleatorias o mutagénesis insercional aleatoria, seguida de un cribado de los mutantes dentro del gen deseado, o

- la inhibición de dichas proteínas se obtiene mediante la expresión en dicha planta de un ARN silenciador dirigido al gen que codifica dicha proteína.

4. Casete de expresión que comprende:

- un promotor funcional en una célula vegetal;

- como mínimo, una construcción de ADN seleccionada entre:

- 5 a) una o más construcciones de ADN de 200 a 1.000 pb, comprendiendo cada una de las cuales un fragmento de un ADNc del gen *OSD1*, tal como se ha definido en la reivindicación 1, y puede comprender, además, un fragmento de un ADNc de un gen diana que codifica una proteína seleccionada entre SPO11-1, SPO11-2, PRD1, PAIR1 y REC8, tal como se ha definido en la reivindicación 3, o de su complementario, o que tiene, como mínimo, el 95 % de identidad con dicho fragmento, estando dicha secuencia o secuencias de ADN colocadas bajo el control transcripcional de dicho promotor;
- 10 b) una o más construcciones de ADN en horquilla capaces, cuando se transcriben, de formar un ARN en horquilla dirigido, como mínimo, al gen *OSD1*, tal como se ha definido en la reivindicación 1, y de poder formar, además, un ARN en horquilla dirigido a un gen que codifica una proteína seleccionada entre SPO11-1, SPO11-2, PRD1, PAIR1 y REC8, tal como se ha definido en la reivindicación 3;
- 15 c) una o más construcciones de ADN capaces, cuando se transcriben, de formar un miARNa dirigido al gen *OSD1*, tal como se ha definido en la reivindicación 1, y de poder formar, además, un miARNa dirigido a un gen que codifica una proteína seleccionada entre SPO11-1, SPO11-2, PRD1, PAIR1 y REC8, tal como se ha definido en la reivindicación 3;

20 estando dicha construcción o construcciones de ADN colocadas bajo el control transcripcional de dicho promotor.

5. Casete de expresión, según la reivindicación 4, que comprende una construcción de ADN dirigida al gen *OSD1*.

25 6. Casete de expresión, según la reivindicación 4, que comprende: una construcción de ADN dirigida al gen *OSD1*, una construcción de ADN dirigida a un gen seleccionado entre *SPO11-1*, *SPO11-2*, *PRD1* y *PAIR1*, y una construcción de ADN dirigida a *REC8*.

30 7. Vector recombinante que comprende un casete de expresión, según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6.

8. Planta productora de gametos de Restitución de Segunda División 2n,

35 en la que está inhibida una proteína, designada en lo sucesivo proteína *OSD1*, teniendo dicha proteína *OSD1*, como mínimo, el 35 % de identidad de secuencia o, como mínimo, el 50 % de similitud de secuencia con la proteína *AtOSD1* de la SEQ ID NO: 1 o con la proteína *OsOSD1* de la SEQ ID NO: 35,

40 en la que el porcentaje de identidad se calcula utilizando el algoritmo de alineamiento global de Needleman-Wunsch y el porcentaje de similitud se calcula utilizando la matriz de puntuación BLOSUM62, en la que:

el gen que codifica la proteína o su promotor está mutado y el mutante obtenido ha perdido parcial o totalmente la actividad de la proteína, o un ARN silenciador dirigido al gen que codifica la proteína está expresado en dicha planta.

45 9. Planta productora de gametos apomeióticos,

en la que están inhibidas las siguientes proteínas:

- 50 a) una proteína designada en lo sucesivo proteína *OSD1*, teniendo dicha proteína *OSD1*, como mínimo, el 35 % de identidad de secuencia o, como mínimo, el 50 % de similitud de secuencia con la proteína *AtOSD1* de la SEQ ID NO: 1 o con la proteína *OsOSD1* de la SEQ ID NO: 35,
- b) una proteína implicada en la iniciación de la recombinación meiótica en plantas, siendo dicha proteína seleccionada entre:

55 i) una proteína designada en lo sucesivo proteína *SPO11-1*, en la que dicha proteína tiene, como mínimo, el 55 % de identidad de secuencia, o, como mínimo, el 70 % de similitud de secuencia con la proteína *SPO11-1* de la SEQ ID NO: 2;

60 ii) una proteína designada en lo sucesivo proteína *SPO11-2*, en la que dicha proteína tiene, como mínimo, el 60 % de identidad de secuencia, o, como mínimo, el 75 % de similitud de secuencia con la proteína *SPO11-2* de la SEQ ID NO: 3;

iii) una proteína designada en lo sucesivo proteína *PRD1*, en la que dicha proteína tiene, como mínimo, el 25 % de identidad de secuencia, o, como mínimo, el 40 % de similitud de secuencia con la proteína *PRD1* de la SEQ ID NO: 4;

65 iv) una proteína designada en lo sucesivo proteína *PAIR1*, en la que dicha proteína tiene, como mínimo, el 30 % de identidad de secuencia, o, como mínimo, el 40 % de similitud de secuencia con la proteína *PAIR1* de la SEQ ID NO: 5;

c) una proteína designada en lo sucesivo proteína Rec8, en la que dicha proteína tiene, como mínimo, el 40 % de identidad de secuencia, o, como mínimo, el 50 % de similitud de secuencia con la proteína Rec8 de la SEQ ID NO: 6,

5

en la que el porcentaje de identidad se calcula utilizando el algoritmo de alineación global de Needleman-Wunsch y el porcentaje de similitud se calcula utilizando la matriz de puntuación BLOSUM62, en la que:

10

el gen que codifica la proteína o su promotor está mutado, y el mutante obtenido ha perdido parcial o totalmente la actividad de la proteína, o un ARN silenciador dirigido al gen que codifica la proteína está expresado en dicha planta.

15

10. Planta, según la reivindicación 9, que es una planta transgénica que contiene un transgén que comprende un casete de expresión, según la reivindicación 6.

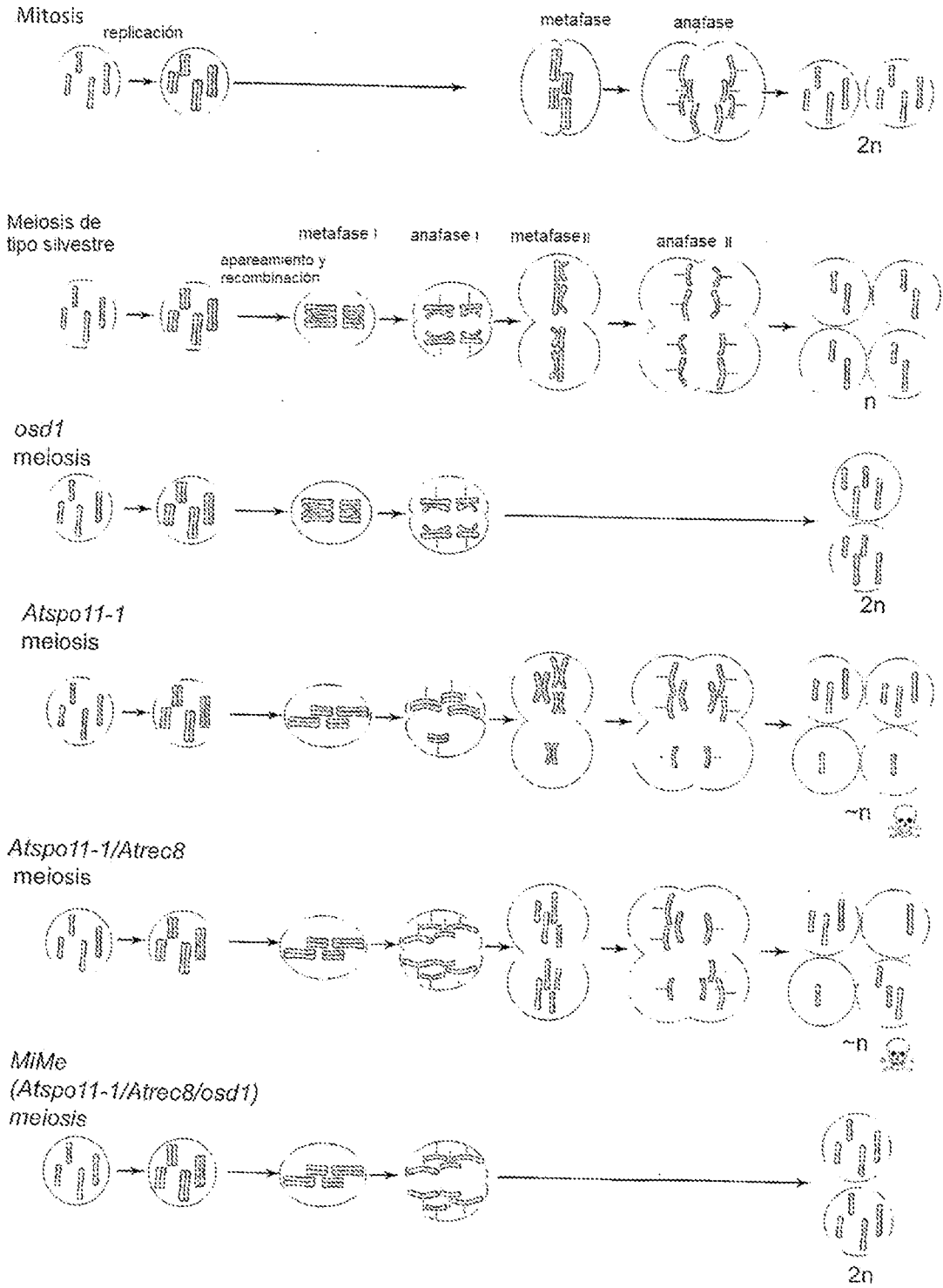


Figura 1

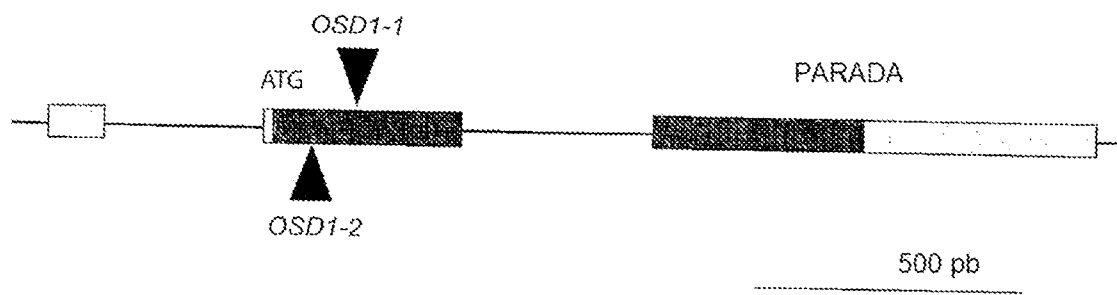


Figura 2

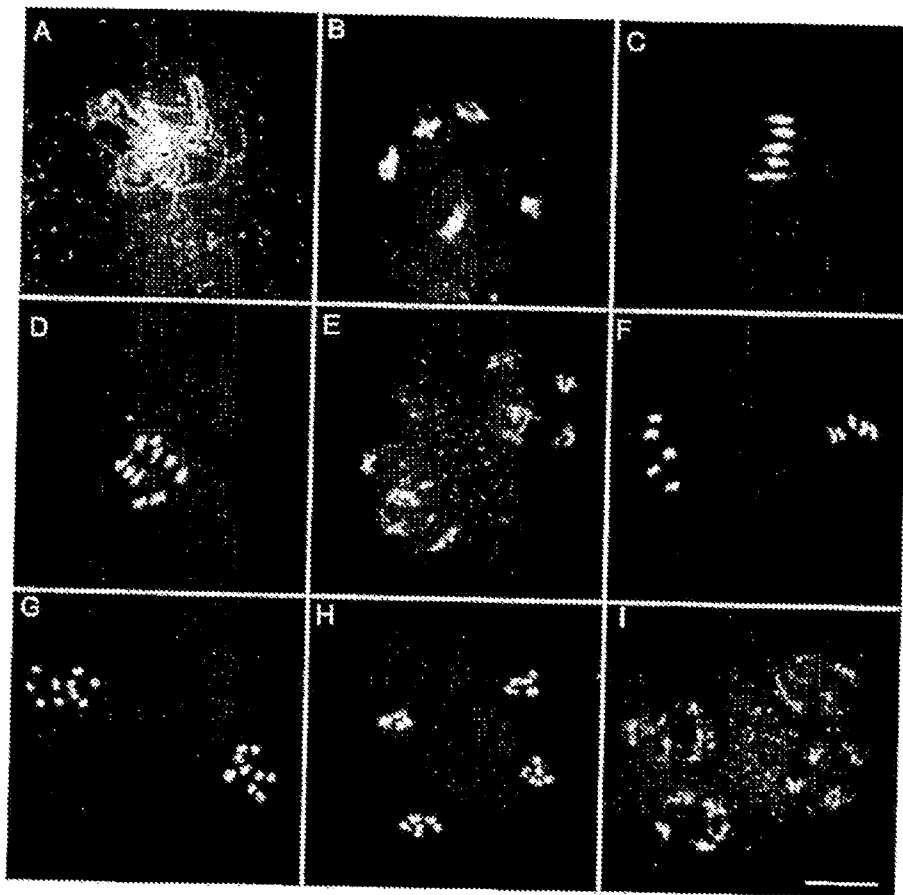


Figura 3

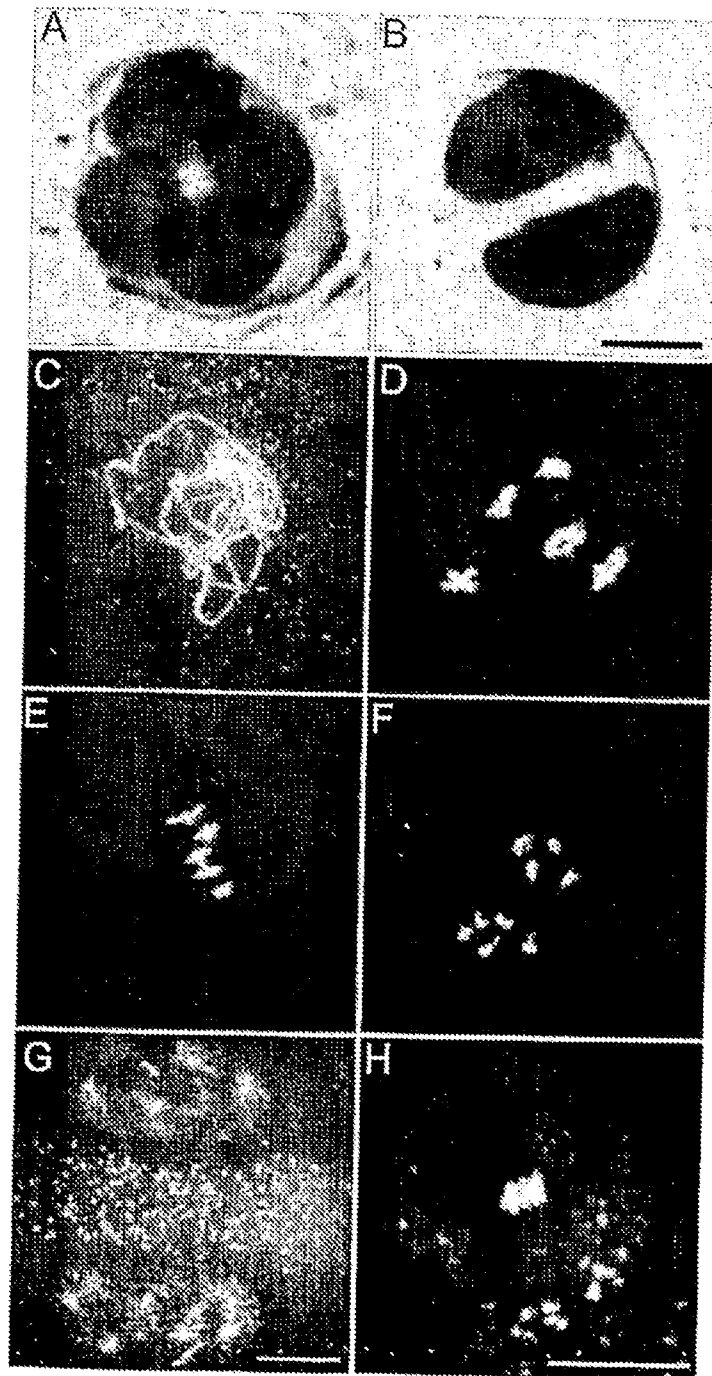


Figura 4

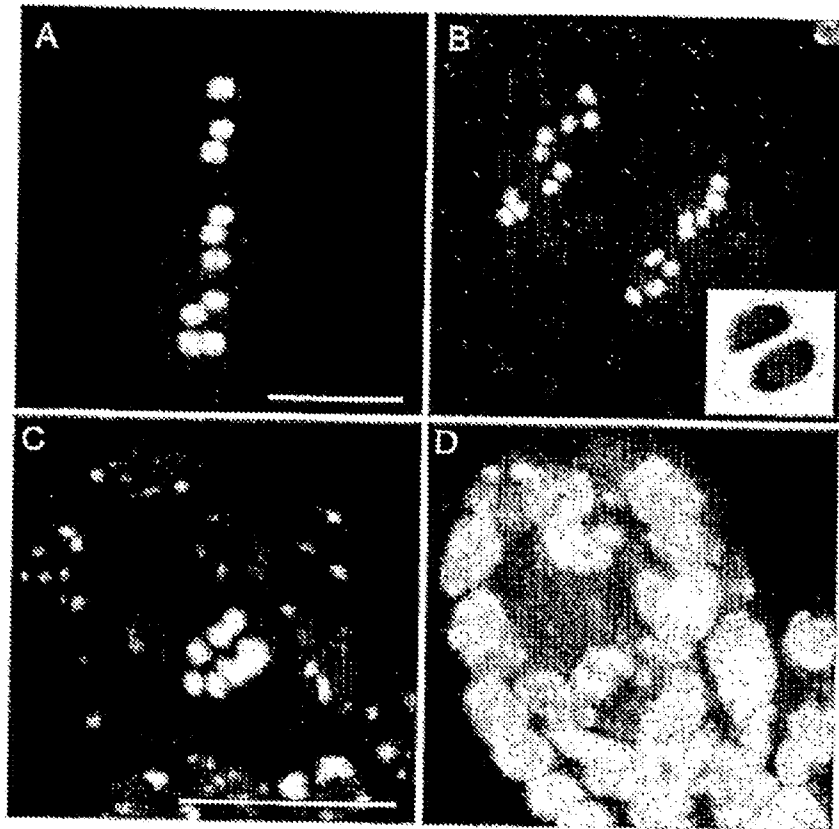


Figura 5

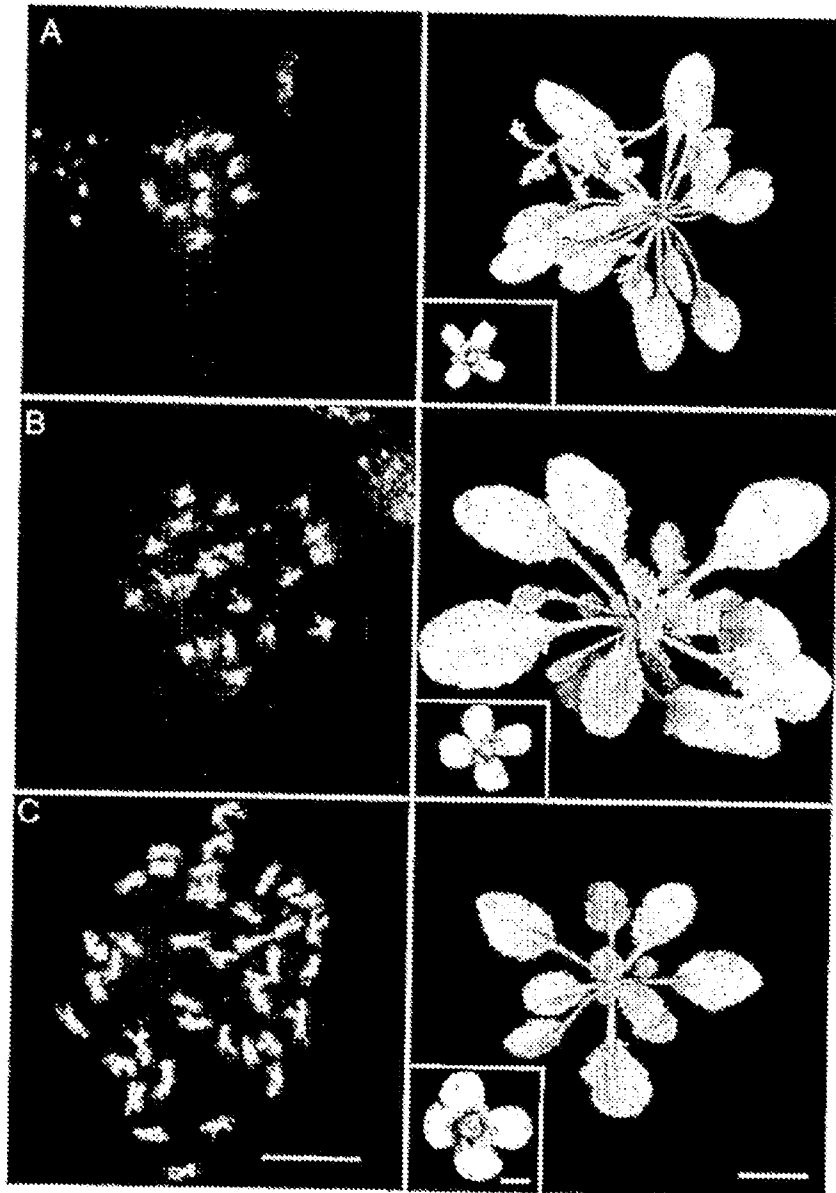


Figura 6

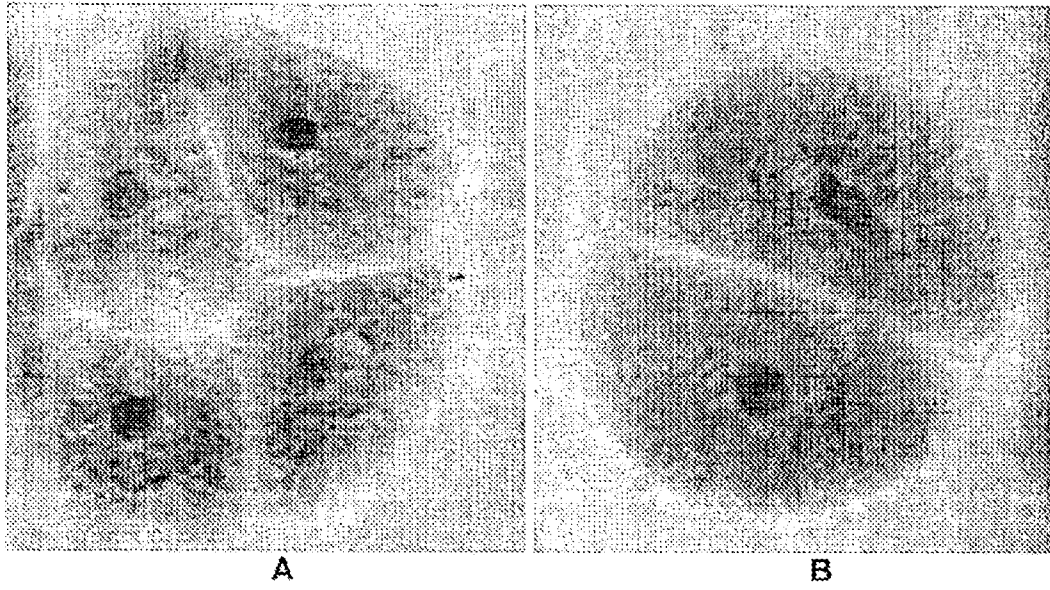


Figura 7

**REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN**

Esta lista de referencias citada por el solicitante es únicamente para mayor comodidad del lector. No forman parte del documento de la Patente Europea. Incluso teniendo en cuenta que la compilación de las referencias se ha efectuado con gran cuidado, los errores u omisiones no pueden descartarse; la EPO se exime de toda responsabilidad al respecto.

**Documentos de patentes citados en la descripción**

- EP 08490672 A
- US 20080057583 A
- US 5190065 A
- US 5283323 A

**Literatura no patente citada en la descripción**

- **RAMANNA; JACOBSEN.** 133. *Euphytica*, 2003, 3-18
- **VEILLEUX.** *Plant Breeding Reviews*, 1985, vol. 3, 252-288
- **BRETAGNOLLE; THOMPSON.** *New Phytologist*, 1995, vol. 129, 1-22
- **D'ERFURTH et al.** *PLoS Genet.*, 28 November 2008, vol. 4 (11), e1000274
- **HASE et al.** *Plant J*, 2006, vol. 46, 317-26
- **GRELON et al.** *Embo J*, 2001, vol. 20, 589-600
- **CHELYSHEVA et al.** *J Cell Sci*, 2005, vol. 118, 4621-32
- **BICKNELL; KOLTUNOW.** *Plant Cell*, 2004, vol. 16, S228-45
- **SAVIDAN.** *The Flowering of Apomixis: From Mechanisms to Genetic Engineering*, 2001
- **SPILLANE et al.** *Sexual Plant Reproduction*, 2001, vol. 14
- **MCCALLUM et al.** *Targeting Induced Local Lesions IN Genomes*, 2000
- **OSSOWSKI et al.** *Plant J.*, 2008, vol. 53, 674-90
- **KLIMYUK; JONES.** *Plant J*, 1997, vol. 11, 1-14
- **VIGNARD et al.** *PLoS Genet*, 2007, vol. 3, 1894-906
- **ESTELLE; SOMERVILLE.** *Mol. Gen. Genet.*, 1987, vol. 206, 200-06
- **AZUMI et al.** *Embo J*, 2002, vol. 21, 3081-95
- **MERCIER et al.** *Biochimie*, 2001, vol. 83, 1023-28
- **MERCIER et al.** *Genes Dev*, 2001, vol. 15, 1859-71
- **MARIE; BROWN.** *Biol Cell*, 1993, vol. 78, 41-51
- **TOUFIGHI et al.** *Plant J*, 2005, vol. 43, 153-63
- **SCHMID et al.** *Nat Genet*, 2005, vol. 37, 501-6