

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 994 394**

51 Int. Cl.:

A01H 1/02 (2006.01)

C12M 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.04.2017 PCT/US2017/027381**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.10.2017 WO17180849**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.04.2017 E 17718712 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2024 EP 3442323**

54 Título: **Procedimiento de acondicionamiento y conservación del polen en el campo**

30 Prioridad:

13.04.2016 US 201662321914 P
24.06.2016 US 201615192519

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.01.2025

73 Titular/es:

POWERPOLLEN, INC. (100.00%)
27253 US Highway 69
Ames, IA 50010, US

72 Inventor/es:

COPE, JASON;
KRONE, TODD;
SINGLETARY, GEORGE y
ETTER, SARA, KATHERINE

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 994 394 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

Procedimiento de acondicionamiento y conservación del polen en el campo

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere en general a un nuevo procedimiento de acondicionamiento y conservación del polen en el campo para aumentar la viabilidad y fertilidad general del polen para su uso en polinizaciones realizadas con polen fresco o con polen que ha sido conservado.

Antecedentes

10 La presente invención tiene aplicación en el campo de la longevidad y viabilidad del polen. La longevidad del polen varía considerablemente de una especie a otra y está muy influida por las condiciones ambientales, sobre todo la temperatura y la humedad relativa. El polen, que se desprende de forma natural de las flores o estructuras florales de las angiospermas, sufre una rápida pérdida de viabilidad una vez que se desprende de la planta. La viabilidad puede perderse en minutos u horas, dependiendo de la especie y de las condiciones ambientales. La exposición al aire seco y a altas temperaturas es especialmente perjudicial para la viabilidad y longevidad del polen una vez que se desprende de la planta. Así pues, en condiciones naturales de campo, el polen tiene una vida limitada durante la cual permanece viable, denominada en esta aplicación "ventana de viabilidad" En particular, el polen de la familia de plantas Poaceae (Gramineae), comúnmente denominadas gramíneas, es especialmente vulnerable y de corta vida (Barnabas & Kovacs (1997) En: Pollen Biotechnology For Crop Production And Improvement. (1997). Sawhney, V.K., y K.R. Shivanna (eds). Cambridge University Press. pp. 293-314). Esta familia de plantas incluye muchos cultivos de cereales de importancia económica, entre ellos el maíz. Los procedimientos para mejorar la viabilidad del polen y prolongar la duración de su viabilidad son de gran valor para la industria agrícola.

25 Específicamente, si el polen recogido de las plantas puede almacenarse en un estado viable durante un periodo de tiempo, este polen puede utilizarse para polinizar flores femeninas según se desee de varias formas ventajosas. La utilización de polen almacenado permite una polinización que no depende de la liberación activa de polen, la sincronía temporal con la receptividad del pistilo (flor femenina), el uso de la esterilidad masculina y/o el aislamiento físico de otras fuentes de polen. En la actualidad, muchas especies dependen de la autopolinización o de la polinización cruzada de plantas vecinas para producir semillas o granos fértiles. Normalmente, en la industria agrícola de semillas híbridas, se requieren intervenciones mecánicas, físicas y/o genéticas para garantizar que las plantas femeninas se polinicen cruzadamente, y no se autopolinicen, de modo que se emplee polen de una constitución genética específica para producir semillas híbridas. Estas medidas, por ejemplo, se utilizan habitualmente para producir semillas híbridas de maíz y arroz. En algunos cultivos, sin embargo, ni siquiera estas medidas son eficaces para garantizar una polinización cruzada rentable por una fuente de polen específica deseada. Actualmente, no es posible, o es muy difícil, producir estos cultivos comercialmente como híbridos. Algunos ejemplos de estos cultivos son, entre otros, el trigo y la soja.

35 Se han hecho muchos intentos para preservar el polen y extender su viabilidad para polinizaciones más allá del tiempo que el polen permanecería viable si se dejara expuesto a condiciones ambientales no controladas. Entre las gramíneas, los estudios con el maíz son ejemplares de los progresos realizados en la conservación del polen. Se han probado muchos tipos de tratamientos para mantener o prolongar la viabilidad y/o la fertilidad del polen de maíz. Entre ellos, muchos han señalado la conveniencia de tratar y/o almacenar el polen de maíz a alta humedad y/o a baja temperatura.

40 Entre las primeras descripciones de la conservación del polen de maíz (Andronesco, Demetrius I., The physiology of the pollen of Zea mays with special regard to vitality. Tesis doctoral Universidad de Illinois. 1915), se informó que en ausencia de condiciones ambientales de almacenamiento controladas, el polen moría en dos a cuatro horas. Al aumentar la humedad relativa del ambiente de almacenamiento, se mantuvo la viabilidad del polen durante 48 horas. Además, el almacenamiento a baja temperatura (por ejemplo, 8-14°C) tuvo un efecto estimulante sobre la viabilidad del polen.

45 Incluso cuando no se controla la humedad relativa durante el almacenamiento, el polen de maíz mantenido a baja temperatura (por ejemplo, 2-7°C durante 3-120 horas) puede más que duplicar su germinabilidad in vitro en comparación con la vitalidad inicial previa al almacenamiento o en comparación con el almacenamiento a 35°C (Pfähler, P.L. y Linskens, H.F., (1973) Planta, 111(3), pp.253-259; Frova, C.B. y Feder, W.A., (1979) Ann Bot, 43(1), pp.75-79). Cuando para el tratamiento del polen se combinan una alta humedad (90% HR) y una baja temperatura (4°C) durante el almacenamiento, la germinación del polen de maíz en medios artificiales se mantiene de buena a regular durante ocho días (Sartoris, G.B., (1942) Am JBot, pp.395-400). El almacenamiento del polen de maíz en las mismas condiciones durante ocho días también permite que el polen siga siendo fértil, aunque a un nivel reducido, y capaz de formar granos en las mazorcas tras la polinización (Jones, M.D. y Newell, L.C., (1948) J Amer Soc Agron 40:195-204).

El acondicionamiento del polen de maíz en el campo a alta humedad y baja temperatura suele ayudar a revivir el polen de baja viabilidad y/o a prolongar su longevidad, con lo que se produce al menos una formación limitada de semillas tras la polinización de las mazorcas. Pero el efecto estimulante del almacenamiento a baja temperatura sobre la fertilidad no siempre se observa (Walden, D.B., (1967) *Crop Science*, 7(5), pp.441-444) y si el polen se deshidrata hasta niveles excesivos, la formación de tubos polínicos en medios artificiales y sedas puede reducirse notablemente (Hoekstra, FA. (1986) En: *Membranes, Metabolism and Dry Organisms*. (Ed., AC Leopold), pp. 102-122, Comstock Publishing Associates, Ithaca, NY; Barnabas, B. y Fridvalszy, L., (1984) *Acta Bot Hung* 30:329-332).

Aunque la alta humedad y la baja temperatura ralentizan el deterioro temporal de la viabilidad durante el almacenamiento del polen de Gramineae, la optimización de estas condiciones ambientales para la conservación sólo pospone la pérdida completa de viabilidad y fertilidad. Se necesitan procedimientos adicionales a la regulación de la humedad y la temperatura para aumentar aún más la longevidad del polen almacenado, de modo que pueda utilizarse en la práctica comercial de la polinización suplementaria para mejorar la producción de semillas y cereales.

En algunos casos, puede ser deseable tratar el polen para que se deshidrate en diversos grados. La deshidratación puede lograrse mediante el secado al vacío o la exposición del polen a una humedad relativa y una temperatura (es decir, un déficit de presión de vapor) que provoque la difusión del agua fuera del polen. Los déficits de presión de vapor favorables para el secado del polen pueden producirse de varias formas, como con desecantes, equipos mecánicos diseñados para controlar la temperatura y la humedad relativa en una cámara cerrada y con soluciones salinas saturadas mantenidas en un espacio cerrado (Jackson, M.A. y Payne, A.R. (2007) *Biocontrol Sci Techn*, 17(7), pp.709-719), Greenspan, L., (1977) *JRes Nat Bur Stand*, 81(1), pp.89-96). Almeida et al (2011, *Revista Brasil. Bot.*, 34(4), pp.493-497) evaluaron la conservación del polen de maíz, utilizando dos temperaturas (4 °C y -20 °C) y dos agentes de deshidratación del polen (gel de sílice y cloruro de calcio hidratado), y concluyeron que la deshidratación en gel de sílice y el almacenamiento a 4 °C preservaban la viabilidad del polen de maíz.

En un esfuerzo por deshidratar y preservar el polen de caña de azúcar, el polen se almacenó a baja temperatura bajo vacío con una pequeña cantidad de desecante CaCl₂ presente (Sartoris, G.B. (1942) *Am J Bot*, pp.395-400). El polen permaneció seco durante todo el almacenamiento, como era de desear, pero el uso de baja presión no fue tan favorable como el almacenamiento a presión atmosférica normal. El comportamiento del polen de maíz fue muy similar al de la caña de azúcar. En intentos más directos de deshidratación se ha incubado el polen en condiciones de humedad relativa y temperatura establecidas o registradas. Estos ejemplos demuestran que el polen de maíz puede deshidratarse hasta niveles muy bajos (por ejemplo, 7-10% de contenido de agua en el polen) y seguir poseyendo una capacidad, aunque reducida, para efectuar la formación de semillas tras la polinización de las mazorcas (Barnabas, B., et al. (1988) *Euphytica*, 39(3), pp.221-225; Patente Estadounidense 5,596,838).

La deshidratación del polen se realiza normalmente antes de la congelación para su almacenamiento y conservación a temperaturas muy bajas. Como se practica con el maíz, el polen fresco se deshidrata a temperatura ambiente en una cámara de vacío, incubadora de humedad, o simplemente con secado al aire o calor suave (Patente Estadounidense 5,596,838; Barnabas, B. y Rajki, E. (1981). *Ann Bot*, 48(6), pp.861-864; Connor, K.F. y Towill, L.E. (1993) *Euphytica*, 68(1), pp.77-84). Tras la descongelación después de un almacenamiento a corto o largo plazo, el polen crioconservado puede ser viable y fértil, pero no siempre muestra fertilidad y algunos miembros de la familia Gramineae, como el maíz, el sorgo, la avena y el trigo, pueden ser difíciles de crioconservar (Collins, F.C., et al. (1973) *Crop Sci*, 13(4), pp.493-494). Una explicación ofrecida para esta recalcitrancia es el exceso de secado o envejecimiento del polen (Collins, F.C., et al. (1973) *Crop Sci*, 13(4), pp.493-494). Es evidente que la calidad del polen puede verse afectada por las condiciones ambientales imperantes durante el desarrollo floral, la maduración del polen y la antesis (Shivanna, K.R., et al. (1991) *Theor Appl Genet* 81(1), pp.38-42; Schoper, J.B., et al. (1987) *Crop Sci*, 27(1), pp.27-31; Herrero, M.P. y Johnson, R.R. (1980) *Crop Sci*, 20(6), pp.796-800). El polen sometido a este tipo de estrés podría mostrar una menor propensión a resistir los rigores de la deshidratación y la congelación para la crioconservación. Existe la necesidad de superar este problema y hacer que la crioconservación del polen de Gramineae sea más asequible y rutinaria, de modo que esta forma de conservación del polen pueda aplicarse de manera predecible a escala comercial.

Se sabe que la desecación tiene un impacto directo en la viabilidad del polen. Barnabas (1985) *Ann Bot* 55:201-204 y Fonseca y Westgate (2005) *Field Crops Research* 94: 114-125 demostraron que el polen de maíz recién cosechado podía sobrevivir a una reducción del contenido original de agua de aproximadamente el 50%, pero pocos granos de polen demostraron viabilidad o capacidad para la formación normal de tubos polínicos con una pérdida adicional de agua por encima de ese nivel. Primeros trabajos de Barnabas y Rajki (1976), *Euphytica* 25: 747-752 demostraron que el polen con un contenido reducido de agua conservaba su viabilidad cuando se almacenaba criogénicamente a -196°C. Trabajos posteriores (Barnabas & Rajki (1981) *Ann Bot* 48:861-864) demostraron que tales granos de polen de maíz parcialmente desecados almacenados a -76°C o -196°C también podían efectuar la fecundación de flores femeninas receptoras. Se conocen otros procedimientos para almacenar el polen durante periodos de tiempo variables, como la liofilización, el secado al vacío o el almacenamiento en disolventes orgánicos no polares. Las limitaciones en la escalabilidad de estas técnicas de conservación del polen, combinadas con los complejos requisitos de los equipos no portátiles, hacen que estas técnicas sean poco prácticas para su uso con grandes volúmenes de polen necesarios para aplicaciones a escala de campo.

La Patente Estadounidense 5,596,838 de Greaves, et al., divulga un procedimiento de almacenamiento de polen que implica una reducción del nivel de humedad mediante la exposición del polen a presiones atmosféricas reducidas antes del almacenamiento. Esta técnica preparaba pequeñas cantidades de polen, por ejemplo de una sola planta de maíz, para su posterior almacenamiento en condiciones bajo cero. El procedimiento de Greaves et al. tiene inconvenientes. Por ejemplo, la metodología y los requisitos del sistema mecánico carecen de la capacidad para producir polen almacenado en cantidades lo suficientemente grandes como para permitir la producción comercial de semillas o aplicaciones de producción de grano. Estos requisitos anulan de hecho cualquier oportunidad de hacer avanzar la tecnología más allá de las investigaciones a nivel de investigación. Por ejemplo, la capacidad de crear una cámara de vacío lo suficientemente grande para las conservaciones de polinización de campo a nivel de producción requeriría una cámara de vacío muy grande capaz de cambiar rápidamente los niveles de presión. Los campos de aumento de progenitores a nivel de producción suelen ser de un acre o más, mientras que los campos de producción de híbridos suelen tener un tamaño de 10 acres o más. Estos campos requieren una cantidad considerable de polen, por lo que se necesitaría una gran cámara de vacío. Una cámara de las especificaciones de Greaves, et al. requeriría la capacidad de bombear hasta una presión de 5 Torr (0,67 kPa) o menos, con la capacidad añadida de subir y bajar rápidamente este nivel de presión. A medida que aumenta el volumen físico de la muestra, la capacidad de generar y ciclar a 5 Torr (0,67 kPa) de forma eficiente empieza a ir más allá de lo que pueden generar las bombas mecánicas. Además, el almacenamiento de polen en disolventes orgánicos crea requisitos químicos peligrosos.

La disponibilidad de polen conservado y viable superaría muchos de los retos de producción a los que se enfrenta la industria de semillas híbridas. Como se explica con más detalle en la Solicitud de Patente de Estados Unidos No. 15/192,485, del Solicitante, en lo que respecta a las semillas híbridas, la disponibilidad de polen almacenado para su entrega a las flores femeninas puede eliminar muchas prácticas estándar y costosas de la producción de semillas, incluyendo, entre otras, la plantación de plantas masculinas cerca de las plantas femeninas para permitir la hibridación, el aislamiento de las plantas femeninas de fuentes de polen no deseadas y el uso de la esterilidad masculina genética o mecánica de las plantas femeninas. Estas prácticas aumentan drásticamente el espacio de campo y los recursos dedicados a las plantas femeninas que producen semillas o grano. La reducción o eliminación de cualquiera de estas prácticas reduciría el coste de la producción de semillas híbridas. Además, el polen almacenado puede aplicarse en cualquier momento. Cuando el desprendimiento de polen de las plantas macho y la receptividad de polen de las plantas hembra no coinciden según lo previsto (debido a la gestión, el entorno o la variación genética), la aplicación de polen conservado y viable puede garantizar la polinización de las plantas hembra en el momento óptimo. La polinización por fuentes externas (adventicias) no deseadas de polen o la autopolinización no deseada de plantas femeninas también puede reducirse o eliminarse aplicando polen almacenado del tipo deseado en el momento adecuado. Hoy en día, la genética de una semilla híbrida concreta viene determinada al principio de la temporada de cultivo por el genotipo de las plantas macho donadoras de polen y las plantas hembra receptoras de polen plantadas juntas en el campo. Sin embargo, utilizando las realizaciones de la presente divulgación, un productor de semillas híbridas que responda a oportunidades de mercado cambiantes puede decidir en el momento de la polinización utilizar un polen masculino diferente (es decir, una fuente genética) para la polinización con el fin de producir semillas híbridas más valiosas. Además, el polen almacenado puede utilizarse para proporcionar rasgos genéticos únicos o genes que mejoren las características de calidad de la semilla a razas endogámicas femeninas altamente productivas. Por ejemplo, podrían aportarse rasgos de resistencia a determinadas plagas de insectos presentes. Es importante destacar que las realizaciones de la presente divulgación también garantizan un alto nivel de pureza genética en la semilla híbrida. Por ello, los procedimientos para mejorar la viabilidad del polen para múltiples especies de cultivos y prolongar la duración de su viabilidad tienen un valor significativo para la industria agrícola.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Esta figura muestra el efecto de las condiciones ambientales de laboratorio de 21°C y 30% de humedad relativa sobre la viabilidad del polen recién esparcido a lo largo del tiempo.

Figura 2: Esta figura muestra la variabilidad del contenido de humedad del polen recién recogido en el campo.

Figura 3: Esta figura muestra el efecto del acondicionamiento del polen en el campo comparando las tasas de germinación *in vitro* del polen inmediatamente después de la recolección y de nuevo dos horas después tras un periodo de acondicionamiento en el campo.

Figura 4: Esta figura muestra los porcentajes medios de germinación del polen de cuatro genotipos de maíz tras el almacenamiento del polen en condiciones de alta humedad durante una hora a 4°C o 22°C.

Figura 5: Esta figura muestra el efecto del acondicionamiento en campo sobre la revitalización de la viabilidad del polen en múltiples genotipos. Para cada genotipo, se muestran los efectos de la revitalización en respuesta a la alta humedad y la ventaja obtenida por el acondicionamiento de campo a baja temperatura.

Figura 6: Esta figura muestra el cambio en el contenido de humedad del polen en diferentes genotipos en función de la hora del día en que tuvo lugar la recogida de polen.

Figura 7: Esta figura muestra el efecto sobre el contenido de humedad del polen del almacenamiento de polen recién recogido durante 6 días a dos niveles de presión diferentes, manteniendo un nivel de humedad elevado.

Figura 8: Esta figura muestra el cambio en el porcentaje de germinación del polen tras el almacenamiento del polen recién recolectado durante 6 días a dos niveles de presión diferentes, ambos con un alto nivel de humedad.

Figura 9: Esta figura muestra el cambio en el contenido de humedad del polen a través de seis antecedentes genéticos diferentes en el momento cero, y después de seis días de almacenamiento a diferentes valores de presión atmosférica.

Figura 10: Esta figura muestra la variación de los porcentajes de germinación del polen en seis antecedentes genéticos diferentes en el momento cero, tras un día de acondicionamiento en el campo a presión atmosférica ambiente y tras seis días de almacenamiento a diferentes valores de presión atmosférica.

Figura 11: Esta figura muestra la viabilidad del polen de ocho antecedentes genéticos diferentes tras el acondicionamiento en el campo con alta humedad y baja temperatura en el momento cero, y después de 3, 5 y 8 días de almacenamiento a valores de presión atmosférica de 101,3 kPa o 67,4 kPa.

Figura 12: Esta figura muestra el efecto deshidratante del gas nitrógeno sobre el contenido de humedad del polen durante un periodo de exposición de cuatro horas y cómo la deshidratación del polen en diversos grados afecta a su viabilidad cuando se almacena durante 17 días.

Figuras 13A y 13B: Estas figuras muestran el contenido de humedad del polen almacenado a distintos niveles de humedad relativa durante un periodo de once días.

Figuras 14A y 14B: Estas cifras muestran la viabilidad del polen de maíz almacenado a distintos niveles de humedad relativa durante un periodo de once días.

Figura 15: Esta figura muestra una imagen de polen de arroz almacenado a 4°C y 100% de humedad relativa germinando en cultivo tras 20 horas de conservación.

Figura 16: Imagen de polen de arroz almacenado a 4°C sin control de humedad relativa germinando en cultivo tras 20 horas de conservación. La germinación global para este tratamiento se midió en un 1%.

Las figuras 17A, 17B y 17C muestran los resultados de polinizaciones realizadas con polen conservado tras períodos de almacenamiento de 4 horas a 38 días, como se indica en el ejemplo 10 y en la Tabla 3.

Figura 18: Esta figura muestra los resultados finales de los medios de germinación del polen de maíz rápidamente congelado y rápidamente descongelado. La germinación global fue inferior al 0,5%.

RESUMEN DE LA INVENCION

Se proporciona un procedimiento de conservación del polen de la familia de plantas *Poaceae* (*Gramineae*), por ejemplo de múltiples especies de cultivos, que comprende: (a) recoger polen fresco de *Poaceae* (*Gramineae*); b) someter dicho polen fresco a condiciones de acondicionamiento de campo durante un periodo de tiempo adecuado para mejorar la viabilidad del polen, incluyendo: (i) una humedad relativa que oscila entre el 50% y el 100% aproximadamente; (ii) una temperatura que oscila entre -10°C y 10°C aproximadamente; y (iii) una presión atmosférica que oscila entre 15 kPa y 150 kPa aproximadamente; para producir polen acondicionado en el campo con una viabilidad mejorada; y (c) someter el polen acondicionado en el campo a una etapa de conservación. Opcionalmente, la etapa de conservación comprende conservar el polen acondicionado en el campo en un entorno controlado con una temperatura que oscila entre -10 °C y 10 °C aproximadamente y una presión atmosférica ajustable, en el que el polen acondicionado en el campo se deshidrata en el entorno controlado para alcanzar un contenido de humedad del polen de entre el 15% y el 35% aproximadamente, tras lo cual la temperatura y la humedad relativa en el entorno controlado son ajustables y mantienen el contenido de humedad del polen entre el 15% y el 35% aproximadamente. Opcionalmente, el entorno controlado del procedimiento puede incluir un flujo de uno o más gases seleccionados continuamente refrescados, en el que dicho gas desplaza al oxígeno.

Las realizaciones de los procedimientos de la invención incluyen el uso de polen fresco que se recoge de plantas que se desprenden activamente o se recoge de anteras aplastando, triturando o desorganizando de otro modo la antera para obtener su polen.

La deshidratación del polen para los procedimientos de la invención puede lograrse de varias maneras, incluyendo, pero sin limitarse a, secado por calor, secado mediante una solución salina saturada, secado con sílice, secado al sol, secado por microondas, secado al vacío; y secado utilizando una combinación de humedad y ventilación controladas.

El entorno controlado utilizado en las realizaciones de los procedimientos puede ser un contenedor sellado o un contenedor ventilado. En otras realizaciones, el entorno controlado puede ser una sala con una atmósfera controlada.

El nivel de humedad relativa del ambiente controlado puede controlarse de varias maneras, incluyendo el uso de una solución salina saturada, un procedimiento de dos presiones, un procedimiento de dos temperaturas, o un aparato, incluyendo un generador de punto de rocío; un atomizador; un generador de flujo mixto, o un sonicador.

En algunas realizaciones de los procedimientos, el gas utilizado para desplazar el oxígeno es gas nitrógeno, y la concentración de gas nitrógeno es de aproximadamente 78% a aproximadamente 100% de la atmósfera controlada.

En algunas realizaciones de los procedimientos, el flujo de aire continuo, ajustable, positivo o negativo permite que el aire en el entorno controlado se intercambie a un ritmo de 1 a 10 veces por hora.

En algunas realizaciones de los procedimientos, el polen fresco a conservar procede de cultivos de cereales.

Descripción detallada

- 5 A continuación, se describe detalladamente una realización de tecnología y procedimientos que permiten mejorar y ampliar la viabilidad del polen recogido, incluyendo técnicas de acondicionamiento del polen en el campo y sometiénolo a técnicas de conservación especializadas. El polen puede recogerse de plantas que estén mudando activamente o, alternativamente, el polen que se va a acondicionar en el campo puede haberse recogido y almacenado previamente de acuerdo con numerosos procedimientos conocidos en la técnica que mantienen la viabilidad del polen durante un período de tiempo. Dichos procedimientos incluyen, por ejemplo, la congelación, la liofilización, el almacenamiento en nitrógeno líquido, etc.
- 10 Con el fin de acondicionar el polen en el campo para una viabilidad mejorada y prolongada, el polen se mantiene en, o se transfiere a, una cámara de almacenamiento que permite la modificación y/o el mantenimiento de los cambios de uno o más de la humedad relativa, la temperatura, la presión atmosférica y las concentraciones de componentes gaseosos de la atmósfera presente en la cámara. A los efectos de la presente invención, el término "cámara" se utiliza para referirse a un recinto adecuado para contener y almacenar polen. Una cámara puede variar en tamaño y material de construcción.
- 15 La cámara puede ser de cualquier tamaño que sea adecuado para contener una cantidad de polen, y puede ser cualquier tipo de contenedor, recipiente, recinto o espacio en el que se almacene el polen, en el que el espacio sirve como cámara para el almacenamiento de grandes cantidades de polen. En todos los casos, la cámara debe ser una en la que las condiciones ambientales puedan regularse para parámetros seleccionados como, por ejemplo, la temperatura, la humedad relativa, la composición de los gases y la presión. La cámara puede estar equipada con un respiradero u otro medio para permitir que la presión escape del sistema y que la humedad eliminada del polen salga de la cámara.
- 20 A los efectos de la presente divulgación, el término "viable" o "viabilidad" se utiliza para describir el polen que es capaz de germinar y hacer crecer un tubo polínico con una longitud de al menos el doble del diámetro del grano de polen. Además, el polen puede considerarse viable si se demuestra que la naturaleza celular del material sigue siendo íntegra y se considera que mantiene su integridad de forma que es posible el funcionamiento intracelular y los procedimientos metabólicos celulares normales. La viabilidad del polen puede evaluarse de numerosas maneras, incluyendo, pero sin limitarse a, la evaluación del crecimiento del tubo polínico en medios artificiales o estigmas o estilos extirpados, la evaluación de la integridad celular mediante tinción vital de numerosos tipos, la ausencia de fugas de electrolitos (por ejemplo, potasio) y la citometría de flujo de impedancia. El polen viable puede germinar con éxito y suele poseer el vigor necesario para promover la fecundación y el inicio del desarrollo de la semilla. No todo el polen viable es también polen fértil. En algunos casos, incluso cuando un grano de polen es viable e inicia el crecimiento del tubo polínico, puede carecer del vigor necesario para alcanzar el óvulo y favorecer la fecundación. Los granos de polen no viables no pueden germinar con éxito. La viabilidad puede referirse a un solo grano de polen o a una población de granos de polen. Cuando se utiliza un valor porcentual para describir la viabilidad del polen, el valor se aplica normalmente a una población de polen.
- 25 30 35 Otro término que puede utilizarse para describir la capacidad del polen para germinar y formar el tubo polínico es "germinabilidad". Así, el polen con buena viabilidad es el polen deseable para su uso con los procedimientos de la presente divulgación. La "ventana de viabilidad" se refiere al período de vida limitado durante el cual el polen sigue siendo viable.
- 40 A los efectos de la presente divulgación, el término "fértil" o "fertilidad" se utiliza para describir la capacidad del polen de llevar los núcleos espermáticos al óvulo y efectuar así una doble fecundación. En las plantas con flores, el término "doble fecundación" se refiere a un núcleo espermático que se fusiona con los núcleos polares para producir los tejidos del endospermo, y el otro núcleo espermático que se fusiona con el núcleo del óvulo para producir el embrión.
- 45 A efectos de la presente divulgación, "pérdida de viabilidad" y "pérdida de fertilidad" son términos utilizados para describir el polen. Estos términos significan, respectivamente, que la viabilidad y la fertilidad del polen han descendido a un nivel inferior al requerido para iniciar con éxito el desarrollo de la semilla. El nivel de viabilidad y fertilidad requerido para polinizaciones exitosas se define típicamente como un promedio de 4 granos de polen fresco por óvulo, o de 4 a 8 granos de polen conservado, que ha sido conservado de acuerdo con los procedimientos de la presente divulgación.
- 50 A los efectos de la presente divulgación, el término "longevidad" se utiliza para describir el tiempo durante el cual el polen permanece viable y fértil.
- 55 A los efectos de esta divulgación, el término "acondicionamiento del campo de polen" o "acondicionamiento del campo" se utiliza para describir el procedimiento divulgado en esta solicitud de tratar el polen recién recolectado en el campo para mantener o mejorar su viabilidad, permitiendo un almacenamiento de polen más exitoso. El éxito del almacenamiento se mide por el porcentaje de una población de polen que sigue siendo viable y fértil durante un período de almacenamiento. El acondicionamiento del campo tiene lugar normalmente en el campo donde se recoge el polen, de forma que el acondicionamiento del campo se lleva a cabo antes de transportar el polen a un laboratorio u otro lugar. Es un procedimiento inmediato que se realiza tras la recolección del polen. El acondicionamiento en el campo también puede tener lugar en otros lugares donde se cultivan plantas y donde tiene lugar la recolección de polen, como una cámara de crecimiento, un invernadero, un invernadero de cristal, una casa de sombra, una casa de aro, una instalación de cultivo vertical, una instalación hidropónica o cualquier instalación de cultivo que proporcione borlas cultivadas, como se describe a continuación. El acondicionamiento del campo incluye cualquier regulación intencionada de las condiciones ambientales
- 60

(por ejemplo, humedad relativa, temperatura, composición gaseosa, presión, luz, etc.) de un espacio confinado en el que se mantiene el polen recién recogido inmediatamente después de su recogida y antes de su transporte a cualquier otro lugar. Los periodos de acondicionamiento sobre el terreno pueden ser breves, del orden de minutos a horas, o prolongarse hasta varios días. El término "reavivar" o "revivir" se utiliza para describir la naturaleza del polen durante el procedimiento de acondicionamiento del campo. Por ejemplo, "revivir" el polen durante el procedimiento de acondicionamiento del campo puede incluir la mejora de una o más de las características de viabilidad, germinabilidad o fertilidad del polen.

A los efectos de esta divulgación, el término "almacenamiento" significa cualquier período de contención de polen con la intención de utilizar el polen en un momento o fecha posterior. El término "conservación" designa cualquier almacenamiento de polen que dé lugar a un nivel de viabilidad, fertilidad, o ambos, diferente del nivel de viabilidad, fertilidad, o ambos, que se produciría si el polen se mantuviera en condiciones ambientales no reguladas. Opcionalmente, el polen puede acondicionarse sobre el terreno antes de su almacenamiento o conservación.

A los efectos de esta divulgación, el término "planta femenina" se utiliza para referirse a una planta que se está utilizando como receptora del polen, y que tiene flores receptivas que están siendo fertilizadas. En el caso del maíz, y de muchas otras especies, la planta es monoica y contiene inflorescencias masculinas y femeninas en una sola planta. En la práctica de la cría, la polinización, la polinización cruzada y la hibridación, algunas plantas actúan como "planta masculina" de la que se recoge el polen para utilizarlo en las polinizaciones, y algunas plantas actúan como "planta femenina" siendo la receptora del polen. En el caso de la autopolinización, una sola planta actúa a la vez como "planta masculina" y como "planta femenina", ya que las flores femeninas son fecundadas por el polen de sus propias flores masculinas.

A los efectos de la presente divulgación, el término "fresco" aplicado al polen significa polen liberado de las anteras de una flor que, en su patrón natural de crecimiento y desarrollo de órganos, libera polen tras la dehiscencia en respuesta a condiciones ambientales promotoras.

La recolección de polen fresco puede realizarse de maneras comúnmente conocidas en la técnica. Por ejemplo, el polen puede recogerse de flores recién desprendidas o de estructuras florales masculinas producidas de diversas maneras. En el caso del maíz, por ejemplo, el polen se recoge de las flores masculinas recién desprendidas de las borlas, que pueden estar unidas o separadas de la planta. El polen puede recogerse de plantas cultivadas en cualquier entorno adecuado para el crecimiento vegetal. Dichos entornos incluyen, entre otros, un campo, una cámara de crecimiento, un invernadero, un invernadero de cristal, un invernadero de sombra, un invernadero de aro, una instalación de cultivo vertical o una instalación hidropónica. Alternativamente, el polen puede recogerse directamente de las anteras aplastándolas o triturándolas, liberando así el polen y permitiendo su recogida. Además, puede recogerse polen de una instalación de cultivo de borlas (Pareddy DR, Greyson RI, Walden DB (1989) Production of normal, germinable and viable pollen from in vitro-cultured maize tassels. Theor Appl Genet 77:521 - 526.). Las borlas cultivadas pueden ser borlas maduras que se han extraído de plantas en cualquier tipo de instalación o entorno de cultivo, incluido un campo u otro tipo de instalaciones de cultivo, y se han introducido en agua en un entorno controlado para recoger polen, o las borlas cultivadas pueden ser tejido que se ha recogido de estructuras de floración en fases inmaduras y luego se ha cultivado para que se desarrolle en una estructura de floración o borla completamente madura.

El acondicionamiento de campo y el almacenamiento del polen pueden lograrse colocando el material en una cámara donde se regulan las condiciones ambientales. Por ejemplo, se podría utilizar una cámara de refrigeración con temperatura controlada y capacidad de controlar la humedad relativa para acondicionar y/o conservar el polen recogido. La unidad también tendría una entrada para introducir varios gases o mezclas de gases, como nitrógeno, dióxido de carbono y/u oxígeno, en la cámara. Del mismo modo, una sala adecuada para almacenar mayores volúmenes de polen, que se abastece mediante una forma mecánica de humidificación (sónica, ionizada, etc.), deshumidificación, está a temperatura controlada y permite el muestreo, control y equilibrio del suministro de gases o mezclas gaseosas en el aire ambiente, es una cámara.

El polen destinado al acondicionamiento en el campo y a su posterior conservación y almacenamiento se coloca en un entorno con una humedad relativa elevada, como se indica en varios ejemplos, incluido, entre otros, el ejemplo 4, que evalúa el efecto de la humedad relativa sobre el polen. La humedad relativa puede ser, por ejemplo, cualquier valor comprendido entre aproximadamente 75% de humedad y aproximadamente 100% de humedad, incluyendo aproximadamente 75%, aproximadamente 76%, aproximadamente 77%, aproximadamente 78%, aproximadamente 79%, aproximadamente 80%, aproximadamente 81%, aproximadamente 82%, aproximadamente 83%, aproximadamente 84%, aproximadamente 85%, aproximadamente 86%, aproximadamente 87%, aproximadamente 88%, aproximadamente 89%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99% y aproximadamente 100% de humedad. Al mismo tiempo, el entorno debe tener una temperatura relativamente baja, como se indica en los ejemplos que incluyen, entre otros, el Ejemplo 4. Una temperatura relativamente baja puede ser, por ejemplo, cualquier valor comprendido entre aproximadamente -10° C y aproximadamente 10° C, incluyendo aproximadamente -10° C, aproximadamente -9° C, aproximadamente -8° C, aproximadamente -7° C, aproximadamente -6° C, aproximadamente -5° C, aproximadamente -4° C, aproximadamente -3° C, aproximadamente -2° C, aproximadamente -1° C, aproximadamente 0° C, aproximadamente 1° C, aproximadamente 2° C, aproximadamente 3° C, aproximadamente 4° C, aproximadamente 5° C, aproximadamente 6° C, aproximadamente 7° C, aproximadamente 8° C, aproximadamente 9° C y aproximadamente 10° C. El acondicionamiento de campo se realiza a una presión de aire

que oscila entre unos 15 kPa y unos 150 kPa, incluyendo aproximadamente 15 kPa, aproximadamente 20 kPa, aproximadamente 25 kPa, aproximadamente 30 kPa, aproximadamente 35 kPa, aproximadamente 40 kPa, aproximadamente 45 kPa, aproximadamente 50 kPa, aproximadamente 55 kPa, aproximadamente 60 kPa, aproximadamente 65 kPa, aproximadamente 70 kPa, aproximadamente 75 kPa, aproximadamente 80 kPa, aproximadamente 85 kPa, aproximadamente 90 kPa, aproximadamente 95 kPa, aproximadamente 100 kPa, aproximadamente 105 kPa, aproximadamente 110 kPa, aproximadamente 115 kPa, aproximadamente 120 kPa, aproximadamente 125 kPa, aproximadamente 130 kPa, aproximadamente 135 kPa, aproximadamente 140 kPa, aproximadamente 145 kPa o aproximadamente 150 kPa. El entorno de acondicionamiento del campo puede tener un flujo de uno o más gases seleccionados continuamente refrescados, en el que el gas desplaza al oxígeno. En los ejemplos 11 y 12 se pueden encontrar ejemplos de un entorno de acondicionamiento de campo de este tipo. Se prevé que puedan utilizarse muchos gases para este fin, incluidos, entre otros, los gases inertes. En algunas realizaciones, pueden utilizarse gases como nitrógeno, dióxido de carbono o combinaciones de los mismos. En una realización preferida, puede utilizarse gas nitrógeno. Además, la concentración de nitrógeno (gas N₂) presente en la cámara puede ser moderada desde un porcentaje atmosférico hasta aproximadamente el 100%, incluyendo aproximadamente 78%, aproximadamente 79%, aproximadamente 80%, aproximadamente 81%, aproximadamente 82%, aproximadamente 83%, aproximadamente 84%, aproximadamente 85%, aproximadamente 86%, aproximadamente 87%, aproximadamente 88%, aproximadamente 89%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99% y aproximadamente 100% de nitrógeno. La concentración de oxígeno (gas O₂) presente en la cámara puede moderarse desde aproximadamente el porcentaje atmosférico predominante hasta aproximadamente el 0%, incluyendo aproximadamente el 21%, aproximadamente el 20%, aproximadamente el 19%, aproximadamente el 18%, aproximadamente el 17%, aproximadamente el 16%, aproximadamente el 15%, aproximadamente el 14%, aproximadamente el 13%, aproximadamente el 12%, aproximadamente el 11%, aproximadamente el 10%, aproximadamente el 9%, aproximadamente el 8%, aproximadamente el 7%, aproximadamente el 6%, aproximadamente el 5%, aproximadamente el 4%, aproximadamente el 3%, aproximadamente el 2%, aproximadamente el 1% y aproximadamente el 0% de oxígeno.

Cuando el polen se encuentra en este ambiente con alta humedad relativa y temperatura relativamente baja, está siendo acondicionado en el campo. El periodo de acondicionamiento del campo mejorará la salud y viabilidad del polen. Tras el acondicionamiento en el campo, el polen puede someterse a otras técnicas de conservación o almacenarse.

Para conseguir un nivel de humedad relativa conocido, pueden emplearse diversos medios conocidos en la técnica. Estos incluyen, pero no se limitan a, el uso de un aparato como un generador de punto de rocío, un atomizador, un generador de flujo mixto, un sonicador, u otro aparato diseñado para aumentar la humedad relativa. También puede conseguirse mediante un procedimiento de dos presiones, un procedimiento de dos temperaturas o una solución salina saturada. El procedimiento de generación de humedad a dos presiones consiste en saturar aire o nitrógeno con vapor de agua a una temperatura y presión conocidas. El aire saturado a alta presión fluye desde el saturador, a través de una válvula reductora de presión, donde el aire se reduce isotérmicamente a la presión de prueba a la temperatura de prueba. Asimismo, el procedimiento de dos temperaturas hace circular una corriente de aire a través de un saturador de temperatura precisa controlada (pulverizador de agua o columna de burbujas). El aire se satura a la temperatura del agua. Al salir del saturador, el aire pasa por un dispositivo de eliminación de niebla para garantizar que el agua líquida no salga del saturador. A continuación, el aire se recalienta hasta alcanzar la temperatura de bulbo seco deseada. La temperatura del saturador sería igual a la temperatura del punto de rocío. La HR se calcula a partir de las temperaturas del punto de rocío y del bulbo seco (procedimiento de las dos temperaturas).

Como se muestra en el Ejemplo 1, el polen de maíz recién recolectado de ocho antecedentes genéticos diversos muestra una variación significativa en la viabilidad, incluso cuando se muestrea en un solo día en las mismas condiciones. El polen procedente de diversos antecedentes genéticos muestra diferencias significativas en la capacidad de tolerar el estrés térmico y los déficits de presión de vapor. La experimentación posterior con polen recogido de dos antecedentes genéticos diferentes (véase el Ejemplo 2) demostró que el polen recién vertido disminuye rápidamente su capacidad de germinar con éxito cuando se expone a condiciones ambientales de laboratorio.

La pérdida de humedad afecta a la viabilidad del polen, con una mayor pérdida de humedad que resulta en una mayor pérdida de viabilidad y, finalmente, la muerte del grano de polen. La tasa de pérdida de humedad depende de varios factores, como la temperatura ambiente, la humedad relativa y las condiciones del viento. La muerte del polen se produce más rápidamente en condiciones cálidas y secas, como las que se esperan durante una sequía. Colocar el polen que está perdiendo contenido de humedad en un entorno que tiene una humedad relativa alta y una temperatura relativamente baja permite que el polen recupere su contenido de humedad casi a su nivel anterior a la caída, sin embargo, no detiene completamente la actividad metabólica del polen, que consume recursos vitales. Esto se demuestra en el Ejemplo 3, que demuestra una mejora en los índices de germinación del polen tras el acondicionamiento en el campo a alta humedad y baja temperatura. Otros experimentos demostraron que el acondicionamiento del polen en el campo a alta humedad elevaba la baja viabilidad en una hora, pero se obtenían beneficios adicionales del acondicionamiento en el campo a baja temperatura.

La tasa de eliminación de humedad del polen tiene un impacto directo en el éxito de la conservación. El procedimiento divulgado permite la eliminación de la humedad a velocidades que superan lo que puede lograr una aspiradora, que era

el procedimiento conocido anteriormente para la eliminación de la humedad del polen. El novedoso procedimiento divulgado también permite modificar la velocidad de secado. Por ejemplo, la humedad puede eliminarse a un ritmo rápido para empezar, y luego los niveles de humedad relativa pueden alterarse para alcanzar el objetivo de 15-30% de contenido de humedad del polen a un ritmo más gradual. Los datos experimentales han demostrado que el secado por debajo del 15% de humedad del polen da lugar a una viabilidad mucho menor del polen conservado.

La presente divulgación demuestra que la viabilidad del polen puede preservarse, e incluso mejorarse, como resultado del acondicionamiento en el campo tras la recolección. Aunque ya se sabía que el polen de especies de gramíneas recién recolectado podía almacenarse, no se había demostrado hasta ahora que el acondicionamiento de dicho polen en el campo tras su recolección, utilizando tanto la temperatura como la humedad, pudiera, a gran escala, mejorar la viabilidad del polen y potenciar su almacenamiento. Una base a gran escala se define como cantidades de polen que miden unos 5 gramos o más, incluidas las cantidades medidas en kilogramos de polen. Como se demuestra en el Ejemplo 4, el polen sometido a estrés por déficit de presión de vapor recogido de una serie de variedades endogámicas de maíz mostró una mejora significativa en el porcentaje de germinación tras ser sometido a un breve tratamiento de acondicionamiento en campo. El tratamiento de acondicionamiento en el campo sirvió para "rescatar" los granos de polen estresados y deshidratados, invirtiendo así su disminución de viabilidad y mejorando su capacidad de germinación. Como se divulga en el ejemplo 4, el acondicionamiento en el campo de granos de polen estresados con una humedad relativa del 100% mejoró la germinación en un 21% de media. La adición de un tratamiento de frío a 4 °C produjo un efecto sinérgico que aumentó la germinación en un 33%. El efecto de condicionamiento del campo fue detectable al cabo de una hora. Las condiciones calurosas y secas, que son típicas durante el pico de desprendimiento de polen en el campo, hacen que el polen pierda contenido de humedad y caduque más rápidamente. El tratamiento combinado de alta humedad relativa y baja temperatura ralentiza el metabolismo del polen a la vez que mantiene el contenido de humedad, prolongando así su viabilidad.

Una vez establecido el procedimiento de acondicionamiento del polen en el campo, se realizaron más experimentos para determinar las condiciones óptimas para el almacenamiento del polen acondicionado en el campo.

El polen sometido al procedimiento de acondicionamiento de campo puede someterse posteriormente a otras técnicas de conservación o puede almacenarse. Si se desea, el polen puede someterse a la etapa de acondicionamiento en el campo y utilizarse después en las polinizaciones.

El polen puede someterse a pasos adicionales de conservación para aumentar su capacidad de retener la viabilidad y la fertilidad durante periodos de almacenamiento. Es beneficioso acondicionar el polen en el campo como se ha descrito anteriormente antes de aplicar dichas técnicas de conservación o almacenamiento, con el fin de maximizar la salud y viabilidad del polen antes de cualquier almacenamiento. La preparación del polen para su almacenamiento requiere un cuidadoso procedimiento que incluye un entorno con niveles conocidos de humedad relativa, así como unas condiciones específicas de temperatura y presión atmosférica. Además, la presencia de gases útiles ayudará a maximizar el éxito del almacenamiento.

Inicialmente es necesario eliminar parte de la humedad del polen para maximizar su viabilidad y fertilidad, como se demuestra en el Ejemplo 8, y es particularmente crítico antes del almacenamiento criogénico a largo plazo. Establecer un entorno con una humedad relativa conocida sirve para eliminar gradualmente la humedad del polen, actuando así como agente desecante. Idealmente, la humedad relativa en el entorno de secado debe ser cualquier valor que oscile entre aproximadamente 0% y aproximadamente 30% de humedad relativa, incluyendo aproximadamente 0%, aproximadamente 1%, aproximadamente 2%, aproximadamente 3%, aproximadamente 4%, aproximadamente 5%, aproximadamente 6%, aproximadamente 7%, aproximadamente 8%, aproximadamente 9%, aproximadamente 10%, aproximadamente 11%, aproximadamente 12%, aproximadamente 13%, aproximadamente 14%, aproximadamente 15%, aproximadamente 16%, aproximadamente 17%, aproximadamente 18%, aproximadamente 19%, aproximadamente 20%, aproximadamente 21%, aproximadamente 22%, aproximadamente 23%, aproximadamente 24%, aproximadamente 25%, aproximadamente 26%, aproximadamente 27%, aproximadamente 28%, aproximadamente 29% y aproximadamente 30% de humedad. Cuanto más bajo sea el umbral del nivel de humedad relativa, más rápidamente se eliminará la humedad del polen. El contenido de humedad del polen totalmente hidratado suele rondar el 60%. Un contenido de humedad objetivo del polen antes del almacenamiento criogénico es un valor comprendido entre aproximadamente el 15% y aproximadamente el 35%, incluyendo aproximadamente el 35%, aproximadamente el 34%, aproximadamente el 33%, aproximadamente el 32%, aproximadamente el 31%, aproximadamente el 30%, aproximadamente el 29%, aproximadamente el 28%, aproximadamente el 27%, aproximadamente el 26%, aproximadamente el 25%, aproximadamente el 24%, aproximadamente el 23%, aproximadamente el 22%, aproximadamente el 21%, aproximadamente el 20%, aproximadamente el 19%, aproximadamente el 18%, aproximadamente el 17%, aproximadamente el 16% y aproximadamente el 15% de contenido de humedad. La humedad relativa puede ajustarse con el tiempo para que aumente o disminuya la velocidad de secado. En el campo, el polen con un contenido de humedad inferior al 30% ha perdido completamente la viabilidad para la germinación in vitro (Fonseca y Westgate (2005) Field Crops Research 94: 114-125). Por el contrario, en la presente invención, la fertilidad y la viabilidad del polen se mantienen cuando el contenido de humedad del polen se reduce en condiciones de frío en un entorno que alcanza el contenido de humedad del polen objetivo. El factor crítico es un procedimiento de secado muy controlado, que no puede conseguirse sobre el terreno.

La adición del tratamiento de presión dirigida al polen mostró que la viabilidad del polen durante el almacenamiento con

alta humedad y baja temperatura puede mejorarse si se almacena a presiones específicas, que en algunas realizaciones es por debajo de las presiones atmosféricas. Los ejemplos 5, 6 y 7 demuestran este concepto. Específicamente, en algunas realizaciones de la invención, la introducción de un vacío sirve para reducir y/o prevenir el estrés oxidativo en el polen y, por lo tanto, aumentar la viabilidad. Los ejemplos 5-7 siguientes muestran que la viabilidad durante el almacenamiento con alta humedad y baja temperatura mejora a veces si el polen se almacena además por debajo de la presión atmosférica. Como comprenderán los expertos en la materia, la presión óptima (negativa o positiva) puede variar en función de la especie de polen y de los antecedentes genéticos del polen específico dentro de una especie. Además, en algunas realizaciones el vacío puede ser óptimo, mientras que en otras presiones iguales o superiores a la atmosférica pueden ser óptimas. La experimentación basada en los ejemplos proporcionados a continuación permitirá optimizar la presión para maximizar la conservación de la viabilidad del polen.

En el maíz, por ejemplo, el almacenamiento a unos 15 kPa - 150 kPa es óptimo, como se muestra en el Ejemplo 6. Además, el almacenamiento a presiones reducidas de aproximadamente 67 kPa - 94 kPa puede ser el óptimo, incluyendo presiones de aproximadamente 67 kPa, 68 kPa, 69 kPa, 70 kPa, 71 kPa, 72 kPa, 73 kPa, 74 kPa, 75 kPa, 76 kPa, 77 kPa, 78 kPa, 79 kPa, 80 kPa, 81 kPa, 82 kPa, 83 kPa, 84 kPa, 85 kPa, 86 kPa, 87 kPa, 88 kPa, 89 kPa, 90 kPa, 91 kPa, 92 kPa, 93 kPa y 94 kPa. En algunos experimentos, incluido el Ejemplo 6 que figura a continuación, una presión reducida en torno a 84,3 kPa puede proporcionar una viabilidad del polen que casi se duplica en comparación con el almacenamiento a presión atmosférica. Por consiguiente, el almacenamiento a presión reducida, combinado con un aumento de la humedad y una temperatura baja mejora la viabilidad del polen. Además, el almacenamiento a presión reducida puede mantener una mayor viabilidad durante todos los periodos de conservación y almacenamiento y permitir conservar el polen durante periodos prolongados para su uso posterior. Por supuesto, las condiciones óptimas de presión y las mejoras de la viabilidad pueden diferir según las especies vegetales y, dentro de cada especie, según los antecedentes genéticos.

Además, en algunas realizaciones de la invención, el ajuste de la PMC inicial puede proporcionar ventajas, como se demuestra a continuación en el Ejemplo 8. En algunas realizaciones, la deshidratación del polen antes del almacenamiento mejora la viabilidad del polen almacenado. El contenido típico de humedad del polen fresco es de aproximadamente el 60%. Además, la deshidratación del polen durante una etapa de acondicionamiento en el campo, combinada con un nivel específico de humedad relativa durante el almacenamiento, puede proporcionar unas condiciones óptimas de almacenamiento del polen para prevenir y/o reducir la pérdida de viabilidad. El contenido de humedad de equilibrio del polen almacenado puede optimizarse para mantener y/o ralentizar la pérdida de viabilidad. En algunos ejemplos de maíz, un contenido de humedad de equilibrio de aproximadamente 45%, aproximadamente 46%, aproximadamente 47%, aproximadamente 48%, aproximadamente 49%, aproximadamente 50%, aproximadamente 51%, aproximadamente 52%, aproximadamente 53%, aproximadamente 54%, aproximadamente 55%, aproximadamente 56%, aproximadamente 57%, y/o aproximadamente 58% puede mantener y/o ralentizar la pérdida de viabilidad. Además, se ha demostrado que la búsqueda de un contenido de humedad de equilibrio optimizado proporciona mejores resultados que el simple almacenamiento del polen en un entorno de alta humedad.

La adición de gases, como nitrógeno (N₂) o dióxido de carbono (CO₂), cumple varias funciones en la preparación del polen para su almacenamiento, como se muestra en los Ejemplos 10, 11 y 12 a continuación. La primera función es que los gases pueden servir como agentes secantes. El contenido de humedad de estos gases suele ser inferior al 1,0%. El flujo constante de una fuente renovada de gas a la cámara donde se retiene el polen garantiza que la humedad liberada por el polen se expulse del sistema. Los gases también sirven para desplazar el oxígeno de la cámara. El polen necesita oxígeno para su actividad metabólica y favorece la acumulación de especies reactivas del oxígeno (ROS). La reducción de la actividad metabólica ayuda a acondicionar el polen y a prepararlo para su almacenamiento.

La cámara que contiene el polen destinado al almacenamiento se somete a una presión positiva, o a un flujo de aire tratado hacia la cámara. Esta presión puede establecerse mediante el bombeo de aire tratado en la cámara, como se demuestra en los Ejemplos 10, 11 y 12. La presión positiva del flujo de aire tratado puede extraer, añadir o mantener la humedad del polen y, además, puede extraer, añadir o mantener la humedad de la cámara, lo que permite controlar cuidadosamente el nivel de humedad relativa (HR). La HR y la temperatura del aire pueden establecerse utilizando cualquier combinación de desecantes, soluciones salinas, calor u otros tratamientos para maximizar su eficacia en el control del secado del polen.

Durante la fase de secado del polen hasta un contenido de humedad del 15 al 35%, el aire de la cámara que contiene el polen se mantiene entre aproximadamente -10° C y aproximadamente 10° C, incluyendo aproximadamente -10° C, aproximadamente -9° C, aproximadamente -8° C, aproximadamente -7° C, aproximadamente -6° C, aproximadamente -5° C, aproximadamente -4° C, aproximadamente -3° C, aproximadamente -2° C, aproximadamente -1° C, aproximadamente 0° C, aproximadamente 1° C, aproximadamente 2° C, aproximadamente 3° C, aproximadamente 4° C, aproximadamente 5° C, aproximadamente 6° C, aproximadamente 7° C, aproximadamente 8° C, aproximadamente 9° C y aproximadamente 10° C. Esto puede conseguirse colocando la cámara en una sala refrigerada o introduciendo aire refrigerado en la cámara por diversos medios.

Opcionalmente, durante el periodo de secado del polen, el polen contenido dentro de la cámara puede agitarse mecánicamente. La agitación sirve para exponer la máxima superficie del polen al aire de la cámara, lo que permite un

secado más uniforme y evita que el polen se apelmace. Esto puede lograrse de diferentes maneras, incluido el uso de vibración, aire forzado, rotación u otros medios.

Una vez que el polen ha alcanzado el contenido de humedad óptimo de 15 a 35% de humedad, puede almacenarse. El almacenamiento puede lograrse colocando la cámara de polen en nitrógeno líquido, en condiciones de congelación de -80 °C a 0 °C, en refrigeración o en condiciones atmosféricas. La elección de las condiciones en las que se almacena el polen puede depender del plazo en el que se espera utilizarlo.

Como se explica en detalle en los párrafos anteriores, maximizar y extender la viabilidad del polen utilizando el procedimiento divulgado requiere la manipulación cuidadosa de una serie de factores dentro de rangos definidos. Los datos generados en laboratorio utilizando polen de maíz como especie de ensayo han indicado que las condiciones para mejorar la viabilidad del polen incluyen la modificación de una o más condiciones dentro de la cámara para que se sitúen dentro de los rangos divulgados, como se indica a continuación.

La humedad relativa de la cámara que contiene el polen puede mantenerse a cualquier valor que oscile entre aproximadamente 75% de humedad y aproximadamente 100% de humedad, incluyendo aproximadamente 75%, aproximadamente 76%, aproximadamente 77%, aproximadamente 78%, aproximadamente 79%, aproximadamente 80%, aproximadamente 81%, aproximadamente 82%, aproximadamente 83%, aproximadamente 84%, aproximadamente 85%, aproximadamente 86%, aproximadamente 87%, aproximadamente 88%, aproximadamente 89%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99% y aproximadamente 100% de humedad

La temperatura de la cámara que contiene el polen puede mantenerse entre aproximadamente -10° C y aproximadamente 10° C, incluyendo aproximadamente -10° C, aproximadamente -9° C, aproximadamente -8° C, aproximadamente -7° C, aproximadamente -6° C, aproximadamente -5° C, aproximadamente -4° C, aproximadamente -3° C, aproximadamente -2° C, aproximadamente -1° C, aproximadamente 0° C, aproximadamente 1° C, aproximadamente 2° C, aproximadamente 3° C, aproximadamente 4° C, aproximadamente 5° C, aproximadamente 6° C, aproximadamente 7° C, aproximadamente 8° C, aproximadamente 9° C y aproximadamente 10° C.

La concentración de oxígeno (gas O₂) presente en la cámara puede moderarse desde aproximadamente el porcentaje atmosférico predominante hasta aproximadamente el 0%, incluyendo aproximadamente el 21%, aproximadamente el 20%, aproximadamente el 19%, aproximadamente el 18%, aproximadamente el 17%, aproximadamente el 16%, aproximadamente el 15%, aproximadamente el 14%, aproximadamente el 13%, aproximadamente el 12%, aproximadamente el 11%, aproximadamente el 10%, aproximadamente el 9%, aproximadamente el 8%, aproximadamente el 7%, aproximadamente el 6%, aproximadamente el 5%, aproximadamente el 4%, aproximadamente el 3%, aproximadamente el 2%, aproximadamente el 1% y aproximadamente el 0% de oxígeno.

La concentración de nitrógeno (gas N₂) presente en la cámara puede ser moderada desde un porcentaje atmosférico hasta aproximadamente el 100%, incluyendo aproximadamente 78%, aproximadamente 79%, aproximadamente 80%, aproximadamente 81%, aproximadamente 82%, aproximadamente 83%, aproximadamente 84%, aproximadamente 85%, aproximadamente 86%, aproximadamente 87%, aproximadamente 88%, aproximadamente 89%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99% y aproximadamente 100% de nitrógeno.

Además, la presión atmosférica y la concentración de dióxido de carbono (gas CO₂) dentro de la cámara pueden modificarse para mejorar la viabilidad, como se indica a continuación. La presión atmosférica en el interior de la cámara puede modificarse de forma que permita un control estricto de los niveles de humedad. Además, la modificación de la presión del aire permite evitar la oxidación del polen. Las presiones atmosféricas adecuadas oscilan entre unos 15 kPa y aproximadamente 150 kPa, incluidos aproximadamente 15 kPa, aproximadamente 20 kPa, aproximadamente 25 kPa, aproximadamente 30 kPa, aproximadamente 35 kPa, aproximadamente 40 kPa, aproximadamente 45 kPa, aproximadamente 50 kPa, aproximadamente 55 kPa, aproximadamente 60 kPa, aproximadamente 65 kPa, aproximadamente 70 kPa, aproximadamente 75 kPa, aproximadamente 80 kPa, aproximadamente 85 kPa, aproximadamente 90 kPa, aproximadamente 95 kPa, aproximadamente 100 kPa, aproximadamente 105 kPa, aproximadamente 110 kPa, aproximadamente 115 kPa, aproximadamente 120 kPa, aproximadamente 125 kPa, aproximadamente 130 kPa, aproximadamente 135 kPa, aproximadamente 140 kPa, aproximadamente 145 kPa o aproximadamente 150 kPa.

La concentración de CO₂ presente en la cámara puede moderarse desde un porcentaje aproximadamente atmosférico (aproximadamente 0.04%) a aproximadamente 100%, incluyendo aproximadamente 1%, aproximadamente 10%, aproximadamente 20%, aproximadamente 30%, aproximadamente 40%, aproximadamente 50%, aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 81%, aproximadamente 82%, aproximadamente 83%, aproximadamente 84%, aproximadamente 85%, aproximadamente 86%, aproximadamente 87%, aproximadamente 88%, aproximadamente 89%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99% y aproximadamente 100% de CO₂.

Tras la modificación de las condiciones dentro de la cámara, el polen se mantiene en las condiciones definidas durante un periodo de tiempo para permitir que se produzcan las mejoras en la viabilidad del polen y, como resultado, se extienda la viabilidad del polen. Incluso dicho acondicionamiento en el campo durante un corto periodo de tiempo, incluyendo, pero no limitándose a 60 minutos, puede mejorar la viabilidad del polen y ampliar la duración de la ventana de viabilidad. Los resultados iniciales de laboratorio han demostrado que la viabilidad global del polen de maíz mejoró significativamente, más de cuatro veces para muchos antecedentes genéticos, después de 24 horas en el entorno de acondicionamiento de campo (véase el Ejemplo 3). Además, la ventana de viabilidad del polen de maíz se ha ampliado con este procedimiento de acondicionamiento del campo. Los resultados de laboratorio han demostrado que el polen de maíz, que normalmente tiene una ventana de viabilidad de aproximadamente menos de 2 horas, tiene una ventana de viabilidad ampliada a aproximadamente 17 días, tras el tratamiento con el procedimiento de la invención (Ejemplo 8).

Por consiguiente, en una realización óptima, el polen puede recogerse de plantas que estén mudando activamente y colocarse en una cámara de conservación. La cámara de conservación puede incluir un flujo constante de gas nitrógeno. La cámara de conservación se ajusta para un contenido objetivo de humedad del polen, como por ejemplo alrededor del 30%. A medida que disminuye el contenido de humedad del polen, la temperatura de la cámara también puede ajustarse lentamente a la baja, por ejemplo, hasta aproximadamente -5°C . Preferentemente, el ajuste de la temperatura se produce sin congelar el polen. Del mismo modo, los niveles de humedad relativa en la cámara también pueden ajustarse para aumentar o disminuir la tasa de deshidratación del polen. La humedad relativa de la cámara puede aumentarse eventualmente si es necesario para estabilizar el contenido final de humedad del polen en aproximadamente el 30%. De manera óptima, este procedimiento se lleva a cabo en aproximadamente 100 minutos, aunque pueden utilizarse otros periodos de tiempo sin apartarse del alcance de la invención y con éxito.

El polen sometido a dicho procedimiento puede utilizarse en cualquier aplicación en la que el polen sea una unidad comercial o experimental. En un ejemplo, el polen acondicionado y conservado en el campo puede utilizarse para producir semillas, híbridos, parentales o de otro tipo, en cualquier entorno, incluidos, entre otros, el laboratorio, el invernadero y el campo. En otro ejemplo, el polen acondicionado y conservado en el campo puede utilizarse para producir grano, híbrido o no, en cualquier entorno, incluidos, entre otros, el laboratorio, el invernadero y el campo. Además, como se ha comentado anteriormente, dicho procedimiento se aplica al polen de la familia de plantas *Poaceae* (*Gramineae*), en la que se desea acondicionar y conservar el polen en el campo.

Las técnicas de acondicionamiento y preservación en el campo divulgadas en esta invención están destinadas a tratar y preservar con éxito el polen de tal manera que el polen acondicionado y/o preservado en el campo mantenga su viabilidad en la medida en que aproximadamente 4 a aproximadamente 20 granos de polen sean suficientes para polinizar con éxito un embrión.

Como se ha indicado anteriormente, aunque la invención tiene aplicabilidad al maíz y a la industria del maíz, la invención es aplicable al almacenamiento y conservación de todos los tipos de polen de la familia de plantas *Poaceae* (*Gramineae*). En otro ejemplo, el polen de arroz puede conservarse con éxito, como se indica en el Ejemplo 9. Específicamente, en el Ejemplo proporcionado, el polen de arroz se conservó a 4°C y 100% de humedad relativa durante 20 horas. El polen conservado mostró una tasa de germinación del 25%, lo que demuestra que los procedimientos de la presente invención son aplicables a otras especies vegetales de la familia *Poaceae* (*Gramineae*). Además, utilizando los procedimientos experimentales aquí descritos, un experto en la materia puede optimizar la presente invención para una especie de polen deseada. Los siguientes ejemplos ilustran la presente invención con más detalle y son ilustrativos de cómo la invención aquí descrita podría implementarse en el maíz.

Ejemplo 1: Efecto del genotipo en la salud del polen

Se realizó un estudio para determinar el efecto de los antecedentes genéticos de la planta sobre la viabilidad y la salud general del polen recién vertido. Se recolectó polen fresco de plantas de maíz cultivadas en campo de ocho antecedentes genéticos en Grimes, IA, aproximadamente a las 11:30 am del 14 de agosto de 2016. Los antecedentes genéticos se seleccionaron para representar una amplia muestra de grupos heteróticos conocidos en la mejora del maíz. Las borlas de las plantas se cepillaron enérgicamente para eliminar las anteras adheridas y el polen a las 9:00 horas del mismo día. El polen de las borlas de aproximadamente 10 plantas de cada antecedente genético se recogió en una bolsa de papel separada. El polen se separó de los desechos pasándolo por un tamiz (tamaño de poro de 150 micras) y se colocó inmediatamente en acondicionamiento de campo a 4°C durante 80 minutos. El acondicionamiento de campo consistió en esparcir una fina capa de polen en el fondo de una placa de Petri de 15 cm que tenía papel secante humedecido en agua previamente enfriada en la mitad superior de la placa. Tras el acondicionamiento del campo, el polen de cada placa se mezcló suavemente para obtener homogeneidad y se analizó la viabilidad de una pequeña porción. La germinación *in vitro* se utilizó para evaluar la viabilidad incubando el polen en un medio artificial (438 mM de sacarosa, 1,6 mM de H_3BO_3 , 3,0 mM de $\text{CaCl}_2\text{-H}_2\text{O}$) durante una hora a 22°C . Se realizaron ensayos por duplicado. Con la ayuda de un microscopio, el porcentaje de germinación se midió como el número de granos de polen con una longitud del tubo polínico superior al doble del diámetro del grano a partir de una muestra aleatoria de 200 granos por lo general.

Muchos factores pueden afectar a la viabilidad del polen, entre ellos los antecedentes genéticos. Como se demuestra en

la Tabla 1, la viabilidad del polen entre ocho antecedentes genéticos diversos de maíz difirió significativamente en aproximadamente el doble cuando se tomaron muestras en un solo día. Según los informes, las líneas genéticas de maíz muestran grandes diferencias en la tolerancia del polen al estrés, en particular al estrés térmico y a los déficits de presión de vapor que conducen a la deshidratación. Por estas razones, al evaluar los procedimientos de conservación del polen, es importante segregar la variación de la viabilidad debida a diferencias genéticas de la que puede ser causada por otros factores, como los procedimientos de manipulación y las condiciones de almacenamiento. Igualmente importante, es prudente evaluar más de un único antecedente genético a la hora de determinar las mejores prácticas para almacenar el polen.

Tabla 1: Diferencia en la viabilidad del polen entre ocho antecedentes genéticos diversos de maíz

Antecedentes Genéticos	Porcentaje de Germinación In Vitro (Media +/- SE)
AATH3	54 (+/- 1)
207	56 (+/- 0)
H99	28 (+/- 0)
CM105	63 (+/- 7)
C103	45 (+/- 8)
OQ101	63 (+/- 9)
LH162	50 (+/- 0)
OH43	39 (+/- 4)

Ejemplo 2: Efecto de las condiciones de laboratorio en la salud del polen

Se realizó un estudio para determinar el efecto de las condiciones ambientales de laboratorio sobre la viabilidad del polen recién vertido. Se recogió polen fresco de las borlas de las plantas cultivadas en el invernadero y expuestas a las condiciones ambientales del laboratorio. Se tomó polen de dos antecedentes genéticos de maíz no relacionados, Yukon Chief y Silver Choice, para evitar extraer conclusiones basadas en un único material genético. Inmediatamente después de la recogida, el polen se separó de los residuos pasándolo a través de un tamiz (tamaño de poro de 150 micras) y se colocó en una capa fina sobre una hoja de papel colocada en la mesa del laboratorio. El polen se dejó en estas condiciones sin ninguna precaución especial para controlar la temperatura ambiente y la humedad relativa del laboratorio, que fueron de 21-23°C y 30-34%, respectivamente, a lo largo del experimento. El polen se mezcló para obtener homogeneidad y se tomaron muestras para medir la viabilidad a las 0, 1, 2, 3 y 23 horas del inicio del experimento. Medido in vitro como se describe en el Ejemplo 1, utilizando una muestra aleatoria de unos 100 granos por medición. Los resultados se presentan en la figura 1.

El porcentaje de germinación de Yukon Chief disminuyó rápidamente con la exposición a condiciones ambientales de laboratorio, comenzando en 88% y disminuyendo a 4% en tres horas. Tras 23 horas de exposición, sólo se pudo detectar un rastro de germinación entre los granos del polen. El polen de Silver Choice siguió un patrón similar, salvo que el valor del tiempo cero fue inferior a la viabilidad a una hora de exposición. Se cree que el valor de la hora cero es un valor atípico.

Las condiciones ambientales del laboratorio eran muy desfavorables para el mantenimiento de la viabilidad en el polen de los dos antecedentes genéticos examinados. Se sabe que el estrés por altas temperaturas en el polen de maíz se produce normalmente a temperaturas superiores a 35°C y, dado que el laboratorio estaba a 21-23°C, lo más probable es que la viabilidad se perdiera rápidamente en estas muestras porque la humedad relativa ambiente deshidrató rápidamente el polen durante un periodo de tres horas. Se sabe que la deshidratación afecta a la viabilidad y, a veces, a la fertilidad del polen de maíz.

Ejemplo 3: Acondicionamiento del polen en el campo: frío y alta humedad relativa

Se realizó un estudio para determinar si la viabilidad del polen en el campo podía mejorarse para invertir los efectos negativos de la deshidratación causada por el estrés por déficit de presión de vapor. Se recolectó polen fresco de plantas de maíz cultivadas en campo de ocho antecedentes genéticos en Grimes, IA, aproximadamente a la 1:45 pm del 10 de agosto de 2016. La temperatura ambiente y la humedad relativa fueron de 31,7°C y 72%, respectivamente, durante la recogida. Los antecedentes genéticos se seleccionaron para representar diversos grupos heteróticos conocidos en la mejora del maíz, e incluían líneas híbridas y endogámicas. El momento de la recogida, a media tarde, se eligió intencionadamente porque el déficit de presión de vapor suele ser más desfavorable para la salud del polen cuando las temperaturas son elevadas y la humedad relativa reducida, en comparación con momentos más tempranos del día. Las borlas de las plantas se cepillaron enérgicamente para eliminar las anteras sueltas y el polen a las 9:00 am del mismo día y, a continuación, se cubrieron con una bolsa de papel. Se embolsaron al menos seis plantas de cada antecedente genético. En el momento de la recolección, las borlas se agitaron en las bolsas y el material extraído de las bolsas de

5 cada genotipo se pasó por un tamiz (de 150 micras de tamaño de poro) para recoger el polen. Cada agrupación genética de polen se mezcló minuciosamente para obtener homogeneidad. Los ensayos de germinación in vitro se iniciaron inmediatamente en el campo mediante el muestreo del polen recogido para cada antecedente (ensayo descrito en el Ejemplo 1). Además, se tomaron muestras de cada grupo para medir el contenido de humedad del polen (PMC), que se calculó tras pesar 50-100 mg de polen antes y después del secado a 104°C durante 24 horas. Inmediatamente, los grupos de polen se sometieron a acondicionamiento de campo, se mantuvieron allí durante 120 minutos, y se ensayaron de nuevo para la germinación in vitro, como se describe en el Ejemplo 1. Se realizó un único ensayo para cada antecedente genético en cada momento y se examinaron aproximadamente 335 granos de polen para cada ensayo.

10 El polen de maíz fresco suele tener un PMC de aproximadamente el 60%, pero en este experimento los valores de PMC del polen recién recogido oscilaron entre el 22,8 y el 46,9%, con una media del 35,4% (Fig. 2). Las condiciones ambientales en el momento de la recogida del polen, 31,7°C y 72% de humedad relativa, provocaron un déficit de presión de vapor que hizo que el polen que estaba suelto en las borlas se deshidratara. Se observaron diferencias genéticas en la PMC del polen recién recolectado, como ya han señalado otros investigadores.

15 Se comprobó la germinación in vitro del polen de cada antecedente genético inmediatamente después de la recolección y de nuevo dos horas más tarde tras el acondicionamiento en el campo a aproximadamente 4°C y 100% de humedad relativa. La figura 3 muestra que en el momento 0, antes del acondicionamiento en el campo, la germinación del polen era inferior al 10% para todos los genotipos, pero la viabilidad del polen aumentaba, más de cuatro veces para muchos antecedentes genéticos, tras dos horas de incubación a alta humedad y baja temperatura. La viabilidad del polen deshidratado se reavivó más para algunos antecedentes genéticos que para otros, pero por regla general, el acondicionamiento en campo del polen estresado mejoró su capacidad de germinar y formar tubos polínicos que son necesarios para que el polen fecunde los óvulos y forme semillas. La inversión de los efectos negativos del estrés y la deshidratación sobre la viabilidad y la fertilidad del polen mediante el acondicionamiento del campo puede desempeñar un papel importante en el almacenamiento del polen como preparación para su uso como suplemento de polinización para mejorar la pureza y el rendimiento de las semillas producidas en la producción de semillas y granos.

Ejemplo 4: Acondicionamiento del polen en el campo: efecto de la temperatura frente a la humedad relativa

30 Se realizó un estudio para determinar si el enfriamiento o la alta humedad relativa producían el efecto de rescate observado en el Ejemplo 3, y para determinar con qué rapidez se producía este efecto. Se recolectó polen fresco de plantas de maíz cultivadas en campo de cuatro antecedentes genéticos (Mo17, C103, AATH1, AATH3) en Slater, IA, el 27 de julio de 2016. Los antecedentes genéticos se seleccionaron para representar germoplasma de maíz diverso, e incluían líneas híbridas y endogámicas. Se cepillaron enérgicamente las borlas para eliminar el polen suelto, se embolsaron y se recogió el polen como se describe en el Ejemplo 3. Los ensayos de germinación in vitro se iniciaron inmediatamente en el campo y se tomaron muestras de polen para PMC como también se describe en el Ejemplo 3. Inmediatamente después de la recogida, los grupos de polen se colocaron en acondicionamiento de campo, utilizando finas capas de polen en placas petri hidratadas de 6 cm, tal como se describe en el Ejemplo 1. Las muestras se acondicionaron en el campo a 4 °C o 22 °C durante dos horas. Se tomaron muestras de polen cada hora para la germinación in vitro, como se detalla en el Ejemplo 1. Se realizó un único ensayo para cada antecedente genético en cada punto temporal y se examinaron aproximadamente 206 granos de polen para cada ensayo.

40 El acondicionamiento del campo de polen se realizó con un único y elevado nivel de humedad relativa (aprox. 100%) y dos temperaturas de incubación. En el lugar de la prueba no fue posible aplicar un esquema de tratamiento factorial con nivel de humedad relativa para el acondicionamiento del campo. Por lo tanto, el experimento examinó cómo el acondicionamiento del campo con alta humedad influía en la viabilidad del polen en comparación con su nivel inicial (es decir, el momento de la recolección del polen) y si la combinación de alta humedad con baja temperatura proporcionaba algún beneficio único.

50 El PMC del polen en el momento de la recolección osciló entre el 51,9% y el 59,2%, por lo que ninguna de las endogamias o híbridos demostró una deshidratación o estrés graves del polen. En la Fig. 4 se muestra la viabilidad media de los cuatro antecedentes genéticos en todos los tratamientos. La hidratación del polen fue de buena, a excelente, al inicio del acondicionamiento en campo, pero la viabilidad fue ligeramente baja, como indican los índices medios de germinación in vitro del polen, del 39%. Después de 60 minutos o menos, a temperatura "normal" (22°C), la hidratación del polen fresco aumentó la germinación en un 21%, por término medio. La hidratación más el tratamiento con frío (4°C) aumentaron la germinación un 33%, por término medio. En resumen, el acondicionamiento del polen en el campo elevó las muestras de baja viabilidad en una hora, principalmente debido a la presencia de alta humedad, pero se obtuvo un beneficio adicional del almacenamiento a baja temperatura.

55 Los detalles del efecto del acondicionamiento de campo sobre la revitalización de la viabilidad del polen se muestran para cada antecedente genético en la Fig. 5. De nuevo se pone de manifiesto la importancia de examinar múltiples genotipos para obtener una imagen más clara de cómo afectan al maíz, en general, los procedimientos de acondicionamiento y almacenamiento en el campo. Se produjeron diferencias genotípicas para, (a) la viabilidad en el momento de la recolección del polen (por ejemplo, C103 frente a AATH1), (b) la respuesta de revitalización a la alta humedad (por ejemplo, Mo17

frente a C103) y (c) la ventaja obtenida por acondicionamiento en campo a baja temperatura (por ejemplo, Mo17 frente a C103). A pesar de las diferencias genéticas, casi siempre se ha comprobado que la viabilidad del polen fresco puede mejorarse mediante un almacenamiento de corta duración a alta humedad y baja temperatura.

Ejemplo 5: Acondicionamiento del polen en el campo: tratamiento al vacío

5 Los experimentos realizados habían demostrado la capacidad de recoger polen en condiciones de estrés ambiental y mejorar su viabilidad acondicionándolo en el campo en condiciones específicas de temperatura y humedad relativa. Se teorizó que el estrés oxidativo podría ser responsable del deterioro de la germinabilidad cuando el polen se almacena durante un periodo de días. Se realizaron experimentos para eliminar el oxígeno del entorno de almacenamiento con el fin de determinar si esto mejoraba la duración del almacenamiento de polen viable. Las condiciones anóxicas se
10 obtuvieron mediante evacuación al vacío.

Se recolectó polen fresco de plantas de maíz cultivadas en campo de nueve antecedentes genéticos (B14, C103, SQ, B37, 207, LH162, AATH1, AATH3) entre las 9:45 am y la 1:10 pm en Slater, IA el 22 de julio de 2016. Los antecedentes genéticos se seleccionaron para representar diversos grupos heteróticos conocidos en la mejora del maíz, e incluían líneas híbridas y endogámicas. Se tomaron muestras de polen del híbrido AATH1 de plantas cultivadas en dos zonas
15 diferentes del campo. Las borlas se cepillaron enérgicamente para eliminar el polen suelto y se embolsaron la víspera del día de su utilización. El polen se recogió como se describe en el Ejemplo 3.

Cada grupo de polen genéticamente único fue muestreado para PMC inmediatamente después de la recolección. La PMC se midió como se describe en el Ejemplo 3. A continuación, cada grupo de polen se dividió en mitades y se colocó rápidamente en forma de capa fina en la mitad inferior de una placa de Petri de 6 cm. Cada placa se cubrió holgadamente con una toallita de fibra de papel (Kimwipe). A medida que se recogían, las placas de Petri cubiertas se colocaban en una rejilla mantenida en una cámara de vacío de acero inoxidable de 3,78 L. En el fondo de cada cámara había 200 ml de agua preenfriada. Cada tanque se cubrió con una tapa acrílica sujeta firmemente con gomas elásticas o al vacío. La mitad de cada muestra de polen se colocó en una cámara a presión atmosférica (101,3 kPa) o al vacío (50,5 kPa de presión).
20 Las cámaras estaban rodeadas de hielo en neveras mientras se recogían las muestras en el campo y luego se trasladaban a una incubadora a 5 °C en el laboratorio. Tras seis días de almacenamiento, se abrieron las cámaras, se mezclaron las muestras de polen hasta su homogeneidad, se tomaron muestras para PMC y se ensayó el polen para germinación in vitro como se describe en el Ejemplo 1. Se realizó un único ensayo para cada antecedente genético y se examinó una media de 298 granos de polen para cada prueba.

El polen se deshidrató más a medida que la recogida se produjo más tarde en el día (Fig. 6). Esta respuesta se ha observado a menudo en nuestros experimentos y en los de otros (Kaefer, K.A.C., et al. (2016) *Aft J Agr Res*, 11(12), pp. 1040-104). Cuando se almacenaron durante seis días a alta humedad, la mayoría de las muestras no se hidrataron en gran medida, especialmente las que estaban muy deshidratadas en el tiempo 0 (comparar Figs. 6 y 7). Por lo tanto, el polen de algunos antecedentes genéticos (por ejemplo, B37, AATH1, AATH3) se estresó antes y durante el almacenamiento y no germinó, independientemente de la presión de almacenamiento. Para los demás antecedentes, el PMC osciló entre el 45-55% tras el almacenamiento y el polen permaneció viable durante seis días (Figs. 7, 8). El almacenamiento a menor presión provocó que el polen, en promedio, fuera ligeramente más seco. Se observaron grandes diferencias en el efecto de la presión sobre la PMC en función de los antecedentes genéticos y la PMC inicial. Entre las muestras viables tras seis días de almacenamiento, la germinación del polen fue ligeramente mayor cuando se almacenó a presión y nivel de oxígeno reducidos (Fig. 8). Una vez más, el efecto del tratamiento difería según los antecedentes genéticos, pero los datos sugerían que la viabilidad durante el almacenamiento con alta humedad y baja temperatura mejora en general si se almacena por debajo de la presión atmosférica.

Ejemplo 6: Acondicionamiento del polen en el campo: valoración al vacío

45 Dada la ventaja reconocida de almacenar el polen al vacío, se diseñaron experimentos para valorar el nivel de vacío necesario para maximizar la preservación de la viabilidad del polen.

Se recogió polen fresco de plantas de maíz cultivadas en campo de seis antecedentes genéticos (OH43, Mo17, C103, H99, LH162, OQ101) entre las 10:30 am y las 1:10 pm en Slater, IA, el 20 de julio de 2016. Los antecedentes representaban endogamias de maíz de diversos grupos heteróticos. Las borlas se cepillaron enérgicamente para eliminar el polen suelto y se embolsaron la víspera del día de su utilización. El polen se recogió e inmediatamente (es decir, Tiempo-0) se tomaron muestras para determinar la PMC y la germinación in vitro, tal como se describe en el Ejemplo 3. A continuación, cada agrupación genética de polen se dividió en seis fracciones de igual tamaño. Cada fracción se colocó como una capa fina en el fondo de una placa Petri de 6 cm que posteriormente se cubrió con una toallita de fibra de papel.
50 Se colocó una placa de cada antecedente genético en una rejilla que se introdujo en una de las siete cámaras de vacío de acero inoxidable de 3,78 L. En el fondo de cada cámara había 200 ml de agua preenfriada. Cada cámara se cubrió con una tapa acrílica y se mantuvo a presión ambiente (101,3 kPa) y a 5°C durante 24 horas. Tras un día de acondicionamiento en el campo, se abrió brevemente una de las cámaras y se volvió a tomar una submuestra de polen para el ensayo de germinación in vitro. A continuación, se evacuó el aire de las cámaras a 84,3, 67,4, 50,5, 33,5, 16,6 o

8,5 kPa de presión. Una cámara permaneció a 101,3 kPa. A continuación, todas las cámaras se incubaron a 5 °C durante seis días antes de una medición final de la PMC y de la germinación in vitro. Se realizó un único ensayo de germinación para cada antecedente genético en cada momento y se examinaron aproximadamente 285 granos de polen para cada prueba.

5 En el Tiempo-0, cuando el polen se recogió inicialmente en el campo, la mayoría de las muestras de polen estaban bastante bien hidratadas, como lo indica un PCM medio de 49,8% (Fig. 9). Sólo se deshidrató el polen de la endogamia OQ101, con un PMC del 34,1%. A pesar de estos niveles de hidratación, la viabilidad de todos los antecedentes de polen fue escasa y la germinación media in vitro fue sólo del 7,4% (Fig. 10). Un día después, tras el acondicionamiento en el campo en un entorno de alta humedad y baja temperatura, la viabilidad mejoró considerablemente y la germinación in vitro alcanzó una media del 42,4%. Esta respuesta fue muy similar a la descrita en el Ejemplo 3 (Fig. 3). Tras la revitalización proporcionada por 24 horas de acondicionamiento sobre el terreno, las muestras estaban listas para ser incubadas de nuevo a alta humedad y baja temperatura, pero ahora bajo niveles reducidos de presión y oxígeno.

15 El almacenamiento durante seis días a alta humedad y baja temperatura no modificó la PMC media del polen mantenido a presión atmosférica (101,3 kPa) o a 84,3 kPa. Pero a medida que la presión de almacenamiento y el nivel de oxígeno disminuían más al aumentar el vacío, el polen se deshidrató más. La PMC media tras seis días de almacenamiento disminuyó del 50,1% a presión atmosférica al 37,1% a presiones de 33,5 kPa, o inferiores. Los patrones entre los antecedentes genéticos eran todos similares, en el sentido de que la PMC disminuía a medida que disminuía la presión de almacenamiento.

25 Dos endogamias, H99 y OQ101, no mantuvieron la viabilidad bajo ningún tratamiento de vacío después de seis días de almacenamiento (Fig. 10). El C103 endogámico tendió a disminuir su viabilidad a medida que se reducían la presión y el oxígeno, de forma muy similar a lo observado para el C103 del Ejemplo 5 (Fig. 8). Las otras tres endogamias probadas en este ejemplo mostraron un patrón en el que la viabilidad durante el almacenamiento mejoraba si el polen se almacenaba bajo un ligero vacío con presiones de 67-84 kPa (Fig. 10). En promedio, el mejor nivel de vacío para el almacenamiento fue de 84,3 kPa, donde la viabilidad casi se duplicó en comparación con el almacenamiento a presión atmosférica. Los genotipos diferían en cuanto a la mejora de la longevidad del polen almacenado bajo una presión ligeramente reducida, pero por regla general, el polen de maíz puede mantener mejor su viabilidad si se almacena bajo un ligero vacío con alta humedad y baja temperatura. Este es el primer informe que demuestra la ventaja de, y la optimización para, preservar la viabilidad del polen de Gramineae a presión reducida y/o oxígeno reducido.

Ejemplo 7: Acondicionamiento del polen en el campo: estudio del curso del tiempo de vacío

35 Se diseñaron experimentos para mejorar la comprensión de la dinámica del almacenamiento al vacío mediante el desarrollo de un estudio de curso temporal para examinar el efecto del tiempo en la conservación de la viabilidad del polen.

40 Se recogió polen de plantas cultivadas en el campo de ocho antecedentes de maíz genéticamente diversos, como antes (Ejemplo 1). Después de acondicionar el polen en el campo con alta humedad y baja temperatura durante 80 minutos, se midió la tasa de germinación in vitro y la PMC (véanse los Ejemplos 1 y 3 para el procedimiento de medición). A continuación, cada grupo de polen se dividió en dos y cada mitad se extendió en forma de capa fina en una placa de Petri de 6 cm cubierta con una toallita de fibra de papel. Las placas se colocaron en una rejilla en una de las dos cámaras de vacío de acero inoxidable de 3,78 L. Con el polen de cada genotipo en cada cámara, se colocaron tapas acrílicas de forma segura. Una cámara permaneció a presión atmosférica (101,3 kPa) y de la otra se extrajo aire para establecer una presión de 67,4 kPa. Las cámaras se incubaron a 5°C y se abrieron muy brevemente tras 3, 5 y 8 días de almacenamiento para volver a tomar muestras de los grupos de polen para la germinación in vitro. Las mediciones de la germinación in vitro se realizaron por duplicado en el Día 0 de almacenamiento, pero como ensayos individuales en todos los demás momentos. Se examinó una media de 254 granos de polen para cada ensayo de germinación in vitro.

50 Tras recoger el polen de las borlas y acondicionarlo en el campo durante 80 minutos, el PMC osciló entre el 50,0 y el 60,8% en todos los antecedentes genéticos. Por lo tanto, el estado de hidratación de este polen recién vertido era bueno. La viabilidad de estas muestras de polen en el día 0 figura en la Tabla 1. Cinco de los ocho antecedentes mostraban valores del 50% o superiores.

55 En general, la viabilidad del polen disminuyó durante los ocho días de almacenamiento (Fig. 11). El deterioro de la viabilidad se produjo más rápidamente en algunos antecedentes genéticos (por ejemplo, el antecedente "207") que en otros, pero en general, el almacenamiento al vacío (67,4 kPa) permitió que el polen mantuviera una mayor viabilidad durante cada periodo de conservación. La tabla 2 muestra que, promediando los ocho antecedentes genéticos, incluso tras sólo tres días de almacenamiento, la viabilidad era un 48% mejor cuando el polen se mantenía a presión reducida. A los ocho días de almacenamiento, la ventaja de la conservación al vacío era del 82%, en comparación con el almacenamiento a presión atmosférica. Esto demuestra una vez más que la longevidad de la viabilidad del polen de maíz, y por tanto su fertilidad, se prolonga con la conservación a presión y/o nivel de oxígeno reducidos.

Tabla 2: Viabilidad media del polen de ocho antecedentes genéticos almacenado a presión atmosférica (101,3 kPa) o bajo ligero vacío (67,5 kPa).

Días de Almacenamiento	Germinación In Vitro (%)		Porcentaje de Mejora con Almacenamiento a 67,5 kPa
	Almacenamiento a 101,3 kPa	Almacenamiento a 67,5 kPa	
3	23,3	34,5	48,4
5	13,0	19,1	47,1
8	5,2	9,5	82,5

5 Se ha demostrado que el almacenamiento del polen de maíz es mejor al vacío. La viabilidad del polen de maíz, un miembro de la familia Gramineae, se mantiene a un nivel más alto con el almacenamiento al vacío en comparación con el almacenamiento a presión atmosférica y el mecanismo es rápidamente funcional, en tres días, o menos. Lo mejor es combinar la conservación del polen de Gramineae al vacío con el almacenamiento a alta humedad y baja temperatura, otras dos condiciones ambientales que se ha demostrado que favorecen la viabilidad del polen y reducen su deterioro cuando se conserva a temperaturas sin congelación. Dado que la viabilidad sigue siendo mayor con el polen de maíz almacenado al vacío, cabe esperar que el polen almacenado al vacío pueda conservarse durante períodos de tiempo más largos antes de que se produzca una pérdida de viabilidad. No todos los niveles de evacuación al vacío facilitan la prolongación de la viabilidad del polen durante el almacenamiento y, en el caso del maíz, las condiciones óptimas son aproximadamente 67-84 kPa de presión. Además, no todas las formas genéticas de polen de maíz responden de manera idéntica al almacenamiento al vacío y algunos antecedentes genéticos muestran más, o menos, beneficio de la manipulación de esta manera. Sin embargo, nuestras pruebas con una amplia diversidad de germoplasma de maíz y la respuesta favorable similar al almacenamiento al vacío en todos los antecedentes indican que es razonable suponer que la mayoría, si no todas, las formas de maíz mostrarán un mejor almacenamiento del polen cuando se almacenen a una presión de aproximadamente 67-94 kPa. Esta práctica permite además el desarrollo de servicios comerciales en los que se recogen grandes cantidades de polen en un momento inicial, se mantienen en condiciones ambientales controladas durante largos periodos y se utilizan posteriormente para proporcionar polinización suplementaria a cultivos de semillas o granos con el fin de mejorar el rendimiento y/o la pureza.

Ejemplo 8: Acondicionamiento del Polen en el campo: Deshidratación Antes del Almacenamiento

En este ejemplo se describen los experimentos realizados con la deshidratación del polen antes de su almacenamiento.

El polen de maíz recién vertido suele tener un PMC de aproximadamente el 60% (Fonseca y Westgate (2005) Field Crops Research 94: 114-125). El PMC puede ser inferior y el polen parcialmente deshidratado, si el polen se desprende durante períodos de estrés, como cuando existe un déficit de presión de vapor desfavorable (Ejemplo 3). El estrés suele comprometer la viabilidad del polen. En estas circunstancias, a menudo se puede mejorar el estado de hidratación del polen y reactivar la viabilidad, parcial o totalmente, mediante el acondicionamiento en el campo (Ejemplo 4, Fig. 5). Sin embargo, no siempre se consigue restablecer por completo la PMC y la viabilidad a niveles "normales", por lo que era interesante investigar cómo afectaba la deshidratación previa al almacenamiento a la viabilidad del polen.

El polen utilizado en estos experimentos se obtuvo de borlas tomadas de maíz cultivado en el campo o en invernadero. Las borlas se desprendieron de las plantas y se transportaron al laboratorio, donde se cortaron 4 cm del tallo de cada borla y se desecharon. Los extremos recién cortados de las borlas se introdujeron en un vaso de precipitados que contenía agua. Las borlas se mantuvieron en una incubadora programada a 25°/15°C de temperatura día/noche y 65%/80% de humedad relativa día/noche, así como con iluminación diurna. Las borlas se aclimataron al entorno de la incubadora durante al menos 24 horas antes de la recolección del polen. Tras la aclimatación, se sacudió el polen de las borlas recién desprendidas aproximadamente entre dos y cuatro horas después del inicio de las condiciones ambientales diurnas. Las borlas procedían de una mezcla de varios genotipos endogámicos de maíz y de una variedad de maíz dulce. Aunque en la mayoría de los casos se conocía la identidad genética de las plantas utilizadas, no se intentó determinar la contribución proporcional de cada genotipo al suministro de una agrupación de polen para uso diario. El polen recogido se separó de los residuos mediante tamizado (tamaño de poro de 150 micras), se colocó inmediatamente en acondicionamiento de campo (Ejemplo 1) y se mantuvo así durante 2-24 horas.

En el experimento A, el polen acondicionado en el campo se deshidrató en diversos grados haciendo pasar gas nitrógeno seco sobre el polen a 9°C. El polen se mantuvo en una malla (45 micras de tamaño de poro) en un desecador pequeño (1,0 L) y se hizo pasar nitrógeno continuamente a través del desecador de forma similar a la utilizada por otros (Barnabas, B. y Rajki, E. (1981). Ann Bot, 48(6), pp.861-864). Se tomaron submuestras de polen del desecador a intervalos de 30 minutos, se analizó su viabilidad y se cargaron en tubos de microcentrifuga de polietileno de 0.5 ml sin tapón hasta que el tubo se llenó aproximadamente un 20%. Los tubos se colocaron en una cámara sellada de acero inoxidable de 3,78 L que tenía una presión de 67,4 kPa (es decir, vacío) y se almacenó a 5°C. Se retiró la cámara tras 6, 9 y 17 días de almacenamiento para volver a comprobar la viabilidad.

En el experimento-B, se midió el PMC y la viabilidad del polen acondicionado en el campo antes de tratarlo con condiciones variables de humedad relativa. El polen se esparció como una capa fina en botes de pesaje de aluminio (4,3 cm de diámetro) que se colocaron en una plataforma elevada en recipientes de almacenamiento de vidrio de 0,5 L que cierran herméticamente. Los recipientes de vidrio contenían aproximadamente 200 ml de agua o una solución saturada de sulfato de potasio, nitrato de potasio o nitrato de estroncio (grado reactivo ACS) que, respectivamente, producen una humedad relativa calculada del 100%, 98,5%, 96,5% o 92,4% en un recipiente cerrado a 5°C (Greenspan, L., (1977) J Res Nat Bur Stand, 81(1), pp.89-96). Los recipientes de vidrio se almacenaron a 5°C y se abrieron durante menos de 20 segundos tras 6 y 11 días de incubación para tomar submuestras de polen y volver a analizar la PMC y la viabilidad.

La viabilidad en los experimentos A y B se midió mediante Citometría de Flujo por Impedancia (IFC) en un instrumento AmphZ30 de Amphasys AG (Lucerna, Suiza). Este dispositivo singulariza los granos de polen a medida que fluyen a través de un chip microfluídico provisto de microelectrodos. Los cambios en la impedancia eléctrica (resistencia) del medio fluídico se miden cuando las células pasan a través del campo eléctrico aplicado y la discriminación de células de polen vivas frente a muertas se consigue mediante cambios en el ángulo de fase de la señal de impedancia detectada (Heidmann, I., Schade-Kampmann, G., Lambalk, J., Ottiger, M. y Di Berardino, M., 2016. Citometría de Flujo por Impedancia: Una Técnica Novedosa para el Análisis del Polen. PloS one, 11(11), p.e0165531). Para cada ensayo se midieron aproximadamente 3.000 granos de polen. Para la determinación de PMC, las muestras se manipularon como se describe en el Ejemplo 3.

La deshidratación del polen con gas nitrógeno en el experimento-A causó una disminución constante del PMC durante un periodo de cuatro horas (Fig. 12). El PMC era del 59,2% al inicio del tratamiento de deshidratación y del 13,1% al finalizarlo. A mitad de la deshidratación con nitrógeno, el PMC había descendido al 45.6%.

Una submuestra de polen, en cada paso de la deshidratación, se colocó en un lugar de almacenamiento a baja temperatura y baja presión en una cámara sellada y se mantuvo allí durante 17 días. Dado que no se intentó controlar el nivel de vapor de agua en la cámara durante el almacenamiento, es posible que las submuestras de polen se deshidrataran, o hidrataran, aún más durante el almacenamiento. La humedad relativa en la cámara sellada venía determinada principalmente por las condiciones del aire ambiente del laboratorio en el momento en que se cerraba la cámara. El aire del laboratorio tenía normalmente una humedad relativa de alrededor del 30% en la época del año en que se realizó el experimento-A.

La velocidad a la que las submuestras de polen dentro de la cámara de almacenamiento del experimento-A podrían haberse deshidratado, o hidratado, durante el almacenamiento también se habría visto afectada por la forma de contención del polen dentro de la cámara. Las submuestras se almacenaron en la parte inferior de un tubo cónico de plástico, por lo que toda la superficie del polen no estaba expuesta por igual al vapor de agua de la cámara, como habría ocurrido si las muestras se hubieran esparcido en un estrato fino.

En el experimento-A, la viabilidad del polen disminuyó durante el periodo de almacenamiento de 17 días, independientemente del PMC inicial (Fig. 12). Pero fue muy sorprendente ver que la viabilidad de las submuestras de polen, que se deshidrataron hasta un 50-55% de PMC antes del almacenamiento, se deterioró más lentamente que el polen no deshidratado antes del almacenamiento o el polen deshidratado hasta niveles de PMC inferiores al 45% aproximadamente. De hecho, el polen sólo ligeramente deshidratado antes del almacenamiento, de un PMC del 59,2% para el polen acondicionado en el campo al 55,0% tras un tratamiento de deshidratación de 30 minutos, seguía teniendo un 19,1% de viabilidad viva tras 17 días de conservación.

El nivel de hidratación del polen llegará normalmente al "contenido de humedad de equilibrio" (EMC), que está controlado por la temperatura y la humedad relativa del entorno (Connor, K.F. y Towill, L.E. (1993) Euphytica, 68(1), pp.77-84). Dado que la tasa de pérdida de viabilidad del polen de maíz almacenado fue más lenta en el experimento-A, que en el típico era razonable plantear la hipótesis de que el polen almacenado no alcanzó la EMC con el aire seco (30% HR) de la cámara. Tal vez se debiera a la colocación del polen en un tubo cónico de plástico. En el experimento B se puso a prueba la idea de que sólo es necesaria una ligera deshidratación del polen fresco para preservar la viabilidad del material.

El polen de maíz del experimento-B se almacenó con la intención de que el PMC en el EMC alcanzara aproximadamente el 45-55%. Esto se aproxima a los niveles de PMC del polen que permaneció más viable durante el almacenamiento en el experimento-A. Los niveles de humedad relativa controlada empleados en las cámaras de almacenamiento del experimento-B se eligieron cuidadosamente y emplearon soluciones saturadas de sulfato potásico, nitrato potásico y nitrato de estroncio (así como agua pura). Por lo tanto, el intervalo de humedad relativa utilizado como tratamiento fue del 92,4-100%. En el pasado, durante más de 100 años, los investigadores han almacenado polen de maíz fresco a distintos niveles de humedad y han evaluado el valor de dicho tratamiento para prolongar la viabilidad (es decir, la capacidad de almacenamiento) durante la conservación (Andronescu, Demetrius I., The physiology of the pollen of Zea mays with special regard to vitality. Tesis Doctoral Universidad de Illinois. 1915); (Knowlton, H.E., 1922. Estudios sobre el polen, con especial referencia a la longevidad. (Vol. 52). Cornell University); (Sartoris, G.B., (1942) Am J Bot, pp.395-400); (Jones, M.D. y Newell, L.C., (1948) J Amer Soc Agron 40:195-204). Su trabajo enseñó que el almacenamiento a alta humedad, normalmente evaluando el 90 o el 100% de humedad, preserva la viabilidad del polen mejor que el almacenamiento a menor humedad. Pero incluso con el almacenamiento a 90 o 100% de humedad, la viabilidad o fertilidad del polen sólo se mantuvo durante unos pocos días, hasta 10, y la viabilidad de las muestras disminuyó bruscamente durante el periodo de prueba. Nunca antes se había informado o conocido que el almacenamiento y la conservación del polen de maíz a una

humedad relativa (por ejemplo, 95-98%) que provoca una EMC de aproximadamente 45-55% es, de hecho, una condición muy singular del polen y que proporciona un mantenimiento de la viabilidad en el almacenamiento indiscutiblemente superior al del almacenamiento que produce una PMC mayor o menor.

5 La PMC del polen almacenado a humedad relativa variable en el experimento-B disminuyó de forma estricta y lineal a medida que disminuía la humedad de almacenamiento (Figs. 13A y 13B). Apenas se produjeron cambios en el PMC más allá de los seis días de almacenamiento, lo que significa que el EMC se alcanzó, o casi, en ese tiempo. El almacenamiento a una humedad relativa de 96.5 y 98.5% produjo un PMC de equilibrio (es decir, EMC) de 43,8 y 53,5%, respectivamente, tal como se había previsto. Las figuras 14A y 14B muestran que el polen de maíz almacenado en condiciones de humedad
10 relativa que producían un PMC de equilibrio de 44 o 54% conservaba casi toda su viabilidad durante un periodo de conservación de 11 días. El polen almacenado al 100% o al 92,4% de humedad relativa perdió el 78 y el 91% de su viabilidad, respectivamente, al cabo de 11 días.

15 Es lógico creer que los procedimientos practicados y los resultados obtenidos en el experimento-B permiten comprender cómo prolongar la viabilidad del polen de maíz, sin congelación, durante periodos de tiempo prolongados que hasta ahora eran inalcanzables. Incluso el trabajo de Nath y Anderson (Nath, J., y Anderson, J. O. (1975). Efecto de la congelación y la liofilización sobre la viabilidad y el almacenamiento del polen de *Lilium longiflorum* L. y *Zea mays* L. *Criobiología*, 12(1), 81-88) no consiguieron evitar el deterioro de la viabilidad en el polen no congelado y no está del todo claro que sus observaciones se basaran en la germinación del polen in vitro, por oposición a la pseudogerminación (Andronescu, Demetrius I., *The physiology of the pollen of Zea mays with special regard to vitality*. Tesis Doctoral Universidad de Illinois. 1915). La capacidad de mantener la viabilidad del polen no congelado de una manera análoga a la demostrada en el Ejemplo 8 permite además prácticas destinadas a preservar el polen de Gramineae de modo que pueda utilizarse para la polinización y la fertilización de óvulos de una manera temporal excluida por los periodos normales de receptividad de las inflorescencias femeninas en las plantas de cultivo. También puede aportar flexibilidad en la práctica de la
20 crioconservación y mejorar la calidad del polen destinado a tal uso.
25

Ejemplo 9: Conservación del polen de arroz

Para validar que el protocolo de conservación desarrollado para el maíz es compatible con el polen de otras especies vegetales, se realizaron pruebas utilizando arroz como fuente de polen.

30 Para el experimento, se recogió polen de 2 genotipos de arroz diferentes, uno de Asia y el otro del sur de los Estados Unidos, de plantas de arroz en muda activa y se agruparon. El polen de la masa se alícuota en 2 tipos diferentes de recipientes de destino. En el primer tipo de recipiente, se aplicó una ligera capa de polen en el fondo de dos placas de Petri marca VWR de 100 mm de ancho por 15 mm de profundidad. Las tapas de las placas de Petri se dejaron intencionadamente fuera para permitir que el polen interactuara con el entorno de conservación del polen. En el segundo
35 tipo de recipiente, se añadió suficiente polen de arroz a un tubo de tapa abatible de 0.5 ml para llenar la zona redondeada del fondo del tubo. Este volumen de polen se estimó en 5 µl en cada tubo. Las tapas de los tubos se cerraron después de añadir el polen. Con las tapas en posición cerrada, se podía modificar la temperatura del tubo, pero no la humedad relativa.

40 Cada recipiente de conservación de polen se colocó en un recipiente de almacenamiento Rubbermaid de 887 ml con tapa precintable. Se añadió suficiente H₂O para llenar el fondo de cada recipiente Rubbermaid antes de sellarlo.

45 Cada contenedor Rubbermaid sellado se colocó en un ambiente a 4°C durante un periodo de conservación de 20 horas. Los recipientes de conservación del polen recibieron uno de dos tratamientos. En el tratamiento 1, las placas de Petri se trataron a 4°C con una humedad relativa del 100% durante 20 horas. En el tratamiento 2, los tubos flip cap de 0,5 ml se trataron a 4°C durante 20 horas. Tras 20 horas de almacenamiento, cada muestra de polen se colocó en un medio de germinación que permite el crecimiento del tubo polínico si el polen es viable. Tras 60 minutos de permanencia en el medio, se capturaron las imágenes. En cada imagen se puntuó el número de tubos polínicos en relación con el número total de granos de polen presentes.

50 Resultados: El polen de arroz almacenado en las placas de Petri mostró una tasa global de germinación del 25% y del 1% respectivamente tras 20 horas de almacenamiento a 4°C y 100% de humedad relativa. Los inventores han especulado con la posibilidad de que el precinto del recipiente Rubbermaid que produjo un 1% de germinación no estuviera correctamente sellado. Si no se sella correctamente, la humedad real del recipiente se situará muy por debajo del total del 100%.

55 El polen de arroz almacenado en los tubos de tapa abatible mostró una tasa global de germinación inferior al 1% tras 20 horas de almacenamiento a 4C, y sin control de la humedad relativa. Cabe señalar que este porcentaje de germinación es coherente con el polen de la placa de Petri almacenado a 4°C y 100% de humedad relativa que germinó en cultivo tras 20 horas de conservación y que arrojó un 1% de germinación, ya que ambos escenarios reflejarían un entorno que no consigue mantener la humedad cerca del 100%. La Fig. 15 proporciona una imagen del arroz germinado de la placa de Petri con un porcentaje de germinación del 25%, mientras que la Fig. 16 proporciona una imagen del polen de arroz almacenado a 4° C sin control de la humedad relativa.
60

Ejemplo 10: Conservación del polen de maíz con una humedad del 75% y un flujo de aire positivo

En este ejemplo se describen los experimentos realizados para preparar el polen para su conservación. El polen utilizado en estos experimentos procedía de borlas tomadas de maíz cultivado en campo y en invernadero. Las borlas se desprendieron de las plantas y se transportaron al laboratorio, donde se cortaron 4 cm del tallo de cada borla y se desecharon. Los extremos recién cortados de las borlas se introdujeron en un vaso de precipitados que contenía agua. Las borlas se mantuvieron en una incubadora programada a 25°/15°C de temperatura día/noche y 65%/80% de humedad relativa día/noche, así como con iluminación diurna. Las borlas se aclimataron al entorno de la incubadora durante al menos 24 horas antes de la recolección del polen. Tras la aclimatación, se sacudió el polen de las borlas recién desprendidas aproximadamente entre dos y cuatro horas después del inicio de las condiciones ambientales diurnas. En todos los experimentos, las borlas procedían de 21 genotipos endogámicos e híbridos de maíz diferentes (un total de 21 genotipos). El polen recogido de cada genotipo se mantuvo e identificó por genotipo como muestras de polen separadas. Cada muestra de polen se separó de los residuos mediante tamizado (tamaño de poro de 150 micras).

Después de la recogida del polen, cada muestra fue submuestreada inmediatamente y se midió (tiempo 0) para determinar su viabilidad utilizando amphasys, que se discute en detalle más arriba. Las lecturas iniciales de viabilidad confirmaron que todas las muestras de polen tenían una viabilidad inicial elevada, superior al 60%. A continuación, el polen restante de cada muestra se colocó en un aparato de secado por aire forzado con una humedad aproximada del 75% (activada por una solución saturada de NaCl) a 5°C y se secó durante aproximadamente 20 horas. Las muestras se almacenaron a -80°C durante periodos de tiempo que oscilaron entre 4 horas y 38 días, y se procedió a su recuento. Hubo una gran variación en el tiempo de almacenamiento debido al hecho de que había un número limitado de hembras disponibles en el invernadero para utilizar en polinizaciones cruzadas con el polen almacenado en un día determinado, y por lo tanto varias de las muestras tuvieron que esperar en condiciones de -80°C hasta que una hembra estuviera disponible.

Las muestras se sacaron de las condiciones de almacenamiento a -80°C, se colocaron en hielo seco y se transportaron al invernadero para realizar las polinizaciones. Sólo se utilizaron como hembras espigas debidamente embolsadas para evitar cualquier riesgo de escapes. Dos o tres semanas después de la polinización, se observaron las espigas para determinar si se habían formado granos, lo que indicaba que el polen era viable tras recibir el tratamiento descrito anteriormente. El polen de 18 de los 21 genotipos ensayados dio lugar a la formación de granos, lo que indica que el polen seguía siendo viable tras su almacenamiento a -80°C.

Las Figuras 17A, 17B, y 17C proporcionan ejemplos de viabilidad confirmada de polen conservado almacenado a -80°C. Específicamente, las fotografías mostradas en las Figuras 17A, 17B y 17C reflejan los resultados de polinizaciones realizadas con polen preservado tras periodos de almacenamiento de 4 horas a 38 días. La presencia de granos en desarrollo se evaluó entre dos y tres semanas después de la polinización o en el momento de la madurez del grano, como se indica en la Tabla 3.

Tabla 3: Presencia de granos en desarrollo para el ejemplo 10 en el que el genotipo indica la fuente de polen y la hembra indica la endogamia polinizada por el polen conservado.

Figura	16A	16B	16C
Días de Polen almacenado a -80°C	1	1	38
Hembra	78	H99	H99
Edad de los Granos (DAP)	21	69	19

Ejemplo 11: Conservación del polen de maíz mediante gas nitrógeno y presión positiva

Este ejemplo describe un experimento realizado para preparar polen para su conservación. El polen utilizado en este experimento procedía de borlas tomadas en el campo. Se desprendieron las borlas de un solo híbrido de maíz dulce y se transportaron al laboratorio, donde se cortaron 4 cm del tallo de cada borla y se desecharon. Los extremos recién cortados de las borlas se introdujeron en un vaso de precipitados que contenía agua. Las borlas se mantuvieron en una incubadora programada a 25°/15°C de temperatura día/noche y 65%/80% de humedad relativa día/noche, así como con iluminación diurna. Las borlas se aclimataron al entorno de la incubadora durante al menos 24 horas antes de la recolección del polen. Tras la aclimatación, se sacudió el polen de las borlas recién desprendidas aproximadamente entre dos y cuatro horas después del inicio de las condiciones ambientales diurnas. Las muestras de polen se separaron de los residuos mediante tamizado (tamaño de poro de 150 micras).

Tras la recogida del polen, se midió la viabilidad de una submuestra (tiempo 0) utilizando amphasys como se ha descrito anteriormente, lo que confirmó que el polen tenía una viabilidad inicial elevada, superior al 95%. A continuación, la muestra restante se colocó en un aparato de secado forzado con nitrógeno a 5-10°C (temperatura variable). El gas nitrógeno cumplía la doble función de eliminar el oxígeno del ambiente y reducir la humedad. La humedad relativa varió durante el secado del 40% en el momento 0 al 12% después de 110 minutos. Se extrajeron tres submuestras de polen a los 80, 85, 90, 95, 100 y 110 minutos. La primera submuestra se utilizó para medir el contenido de humedad del polen (PMC) de la muestra. Este PMC figura en la Tabla 4. La segunda submuestra se utilizó para medir la viabilidad del polen antes de la

congelación. La tercera submuestra se almacenó a -80°C durante 120 minutos y se utilizó para medir la viabilidad del polen tras la congelación. La tabla 4 muestra el porcentaje de viabilidad del polen utilizado en este experimento. Los resultados muestran que existe una gama de PMC de 15 a 35 en la que el polen es más estable y puede almacenarse de forma más eficaz minimizando la caída de la viabilidad.

5

Tabla 4. Porcentaje de viabilidad del polen secado a diferentes porcentajes de contenido de humedad (PMC).

Muestra	Tiempo en el secador (min)	Lectura de humedad (%)	PMC (%)	% viable antes de la congelación	% viable tras congelación	% de disminución de la viabilidad
201-1	0	40	64,4	97,1	28,2	71,0
201-2	80	27	35,0	67,4	28,6	57,6
201-3	85	26	31,1	71,6	37,1	48,2
201-4	90	21	28,5	70,7	24,7	65,1
201-5	95	19	24,1	34,0	18,0	47,1
201-6	100	17	19,1	53,6	15,9	70,3
201-7	110	12	17,4	31,7	5,7	82,0

Ejemplo 12, Polen de maíz conservado mediante gas nitrógeno, presión positiva y humedad y temperatura regulables,

El polen recogido de las plantas con muda activa se introduce en la cámara de conservación, Un flujo constante de gas nitrógeno fluye hacia la cámara, El gas nitrógeno tiene el doble propósito de agotar el oxígeno del ambiente, necesario para que se produzca el metabolismo, al tiempo que disminuye la humedad, lo que en consecuencia comienza a reducir el contenido de humedad del polen a niveles bajos, tal como un nivel objetivo de alrededor del 30%, A medida que disminuye el contenido de humedad del polen, la temperatura de la cámara puede ajustarse lentamente hasta muy por debajo de 0°C (-5°C , por ejemplo) sin congelar el polen, Del mismo modo, los niveles de humedad relativa en la cámara también pueden ajustarse para aumentar o disminuir la tasa de deshidratación del polen, Al mismo tiempo, la humedad de la cámara también puede ajustarse para estabilizar el contenido final de humedad del polen en torno al 30%, Utilizando $PV=nRT$, se puede calcular un valor de humedad final para mantener el polen conservado en un contenido de humedad de polen de equilibrio del 30%, Este procedimiento puede realizarse en aproximadamente 100 minutos,

10

15

Ejemplo 13, Polen de maíz conservado en nitrógeno líquido

Para probar el potencial de usar polen de maíz que ha sido congelado rápidamente como fuente de polen conservado, se realizó un experimento para determinar qué porcentaje de polen de maíz sobrevive después de ser congelado rápidamente en nitrógeno líquido, Según Nath y Anderson (Nath, J., & Anderson, J, O, (1975), Efecto de la congelación y la liofilización sobre la viabilidad y el almacenamiento del polen de *Lilium longiflorum* L, y *Zea mays* L, *Criobiología*, 12(1), 81-88), "La congelación rápida del polen a tasas de aproximadamente 200 grados C/min mantiene el mayor grado de polen viable en combinación con tasas de descongelación rápida de 218 C/min", El enfriamiento rápido y el calentamiento lento provocaron una pérdida sustancial de la viabilidad del polen, Esto podría indicar que los cristales de hielo intracelulares formados durante el enfriamiento rápido quizás crezcan hasta convertirse en masas de hielo más grandes durante el calentamiento lento o el almacenamiento a temperaturas superiores a -50°C "

20

25

Para el experimento, se recolectó polen de maíz de varios genotipos de excreción activa diferentes y se agrupó en un único tubo fuente, Para conseguir una congelación rápida del polen, se vertieron 50 ml de nitrógeno líquido en un vaso de precipitados de borosilicato de 100 ml, A continuación, el polen fresco se dejó caer en el nitrógeno líquido para conseguir la congelación rápida, El polen permaneció en el nitrógeno líquido hasta que se evaporó todo el volumen de 50 ml, El polen rápidamente congelado se añadió inmediatamente a un medio de germinación de polen de maíz a temperatura ambiente para conseguir una rápida tasa de descongelación del polen,

30

35

Los resultados de la prueba de germinación se capturaron en imágenes que posteriormente se puntuaron según el porcentaje de crecimiento del tubo polínico en comparación con el número total de granos de polen, La gran mayoría del polen se degradó rápidamente durante el ensayo de germinación del tubo polínico, Se observó una fuga significativa del contenido celular al hacerse evidente una gran cantidad de restos en el medio durante el procedimiento de germinación, El porcentaje final de germinación se anotó en 1/221 granos de polen, es decir, menos del 0,5%, La Fig. 18 muestra los resultados finales de los medios de germinación del polen de maíz congelado rápidamente y descongelado rápidamente descritos anteriormente, La germinación global fue inferior al 0,5%,

40

Por consiguiente, como se ha indicado anteriormente, los procedimientos de la presente invención proporcionan una serie de ventajas de las que hasta ahora carecía la industria, La presente invención proporciona procedimientos de conservación del polen a gran escala, Los procedimientos de la presente invención mantienen y aumentan la viabilidad del polen durante la recolección, así como durante la conservación, Además, los procedimientos de la presente invención

45

5 son aplicables a, pero no limitados a, dos situaciones ventajosas específicas, En primer lugar, el procedimiento es aplicable a los casos en los que el polen se utilizará en los 30 días siguientes a la recogida en apoyo del ciclo de crecimiento en curso en el momento de la recogida, En segundo lugar, la invención permite una duración de almacenamiento indefinida, lo que permite almacenar el polen durante años antes de entregarlo como se desee a las plantas femeninas receptoras,

10 Además, la mayoría de los procedimientos anteriores de conservación del polen se basan en la congelación y posterior liofilización del polen (incluyendo, pero sin limitarse a, los procedimientos de Greaves, et al, y Nath y Anderson descritos anteriormente) para lograr la deshidratación del polen a condiciones en las que el polen pueda almacenarse, Sin embargo, el largo tiempo necesario para liofilizar el polen reduce la cantidad de tiempo en que el polen puede utilizarse para aplicaciones de campo, Además, los procedimientos de la técnica anterior no controlan el contenido de humedad del polen, que en algunas realizaciones puede ser importante para conservar el polen, Si el polen no entra en el intervalo de humedad sensible que permite su conservación, se produce una pérdida significativa de viabilidad, Además, los requisitos de presión de la presente invención permiten una mayor escalabilidad y portabilidad con respecto a los procedimientos de la técnica anterior, que requieren condiciones de presión más extremas, Los procedimientos de la invención actual proporcionan una deshidratación rápida del polen y también permiten que el polen se mantenga en el contenido óptimo de humedad del polen,

20 Aunque varias realizaciones representativas de esta invención se han descrito anteriormente con un cierto grado de particularidad, los expertos en la materia podrían hacer numerosas alteraciones a las realizaciones divulgadas sin apartarse del alcance de la materia inventiva expuesta en la especificación y las reivindicaciones,

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de conservación del polen de plantas de la familia *Poaceae* (*Gramineae*) que comprende:
 - (a) recogida de polen fresco de *Poaceae* (*Gramineae*); y
 - (b) someter dicho polen fresco a condiciones de acondicionamiento de campo durante un período de tiempo adecuado para mejorar la viabilidad del polen, incluyendo:
 - (i) humedad relativa que oscila entre aproximadamente 50% y aproximadamente 100%;
 - (ii) temperatura que oscila entre aproximadamente -10°C y aproximadamente 10°C; y
 - (iii) presión de aire comprendida entre aproximadamente 15 kPa y aproximadamente 150 kPa; y
 - producir así polen acondicionado en el campo con mayor viabilidad polínica; y
 - (c) someter el polen acondicionado en el campo a una etapa de conservación,
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa de conservación comprende conservar el polen acondicionado en el campo en un entorno controlado con una temperatura que oscila entre aproximadamente -10°C y aproximadamente 10°C; y una presión de aire ajustable; en el que el polen acondicionado en el campo se deshidrata en el entorno controlado para lograr un contenido de humedad del polen de aproximadamente 15% a aproximadamente 35%, y la temperatura y la humedad relativa en el entorno controlado son ajustables y mantienen el contenido de humedad del polen en aproximadamente 15% a aproximadamente 35%,
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que el procedimiento es un procedimiento de conservación de polen de cultivos de cereales,
4. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que el entorno controlado incluye un flujo de uno o más gases seleccionados, continuamente refrescados, en el que dicho gas desplaza al oxígeno,
5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el polen fresco se recoge de plantas que están mudando activamente,
6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el polen fresco se recoge de las anteras aplastándolas, triturándolas o rompiéndolas de cualquier otra forma para obtener el polen,
7. El procedimiento de la reivindicación 2, o cualquier reivindicación dependiente de la reivindicación 2, en el que la deshidratación del polen se lleva a cabo utilizando uno o más procedimientos del grupo que consiste en:
 - (a) secado térmico;
 - (b) secado mediante una solución salina saturada;
 - (c) secado de sílice;
 - (d) secado al sol;
 - (e) secado por microondas;
 - (f) secado al vacío; y
 - (g) secado mediante una combinación de humedad y ventilación controladas,
8. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 2, o cualquier reivindicación dependiente de la reivindicación 2, en el que el entorno controlado es un contenedor sellado o un contenedor ventilado,
9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 2, o cualquier reivindicación dependiente de la reivindicación 2, en el que el entorno controlado es una habitación con una atmósfera controlada,
10. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el nivel de humedad relativa se controla utilizando:
 - (a) una solución salina saturada;
 - (b) un procedimiento de dos presiones;
 - (c) un procedimiento a dos temperaturas; o
 - (d) uno o varios aparatos seleccionados del grupo formado por:
 - (i) un generador de punto de rocío;
 - (ii) un atomizador;
 - (iii) un generador de flujo mixto; y
 - (iv) un sonicador,
11. El procedimiento de la reivindicación 4 en el que el gas seleccionado es gas nitrógeno y la concentración del gas nitrógeno en la atmósfera controlada es de aproximadamente 78% a aproximadamente 100%,

12. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que se proporciona un flujo de aire continuo, ajustable, positivo o negativo, de tal manera que el aire puede ser intercambiado de la cámara a una velocidad de 1 o más veces por hora,

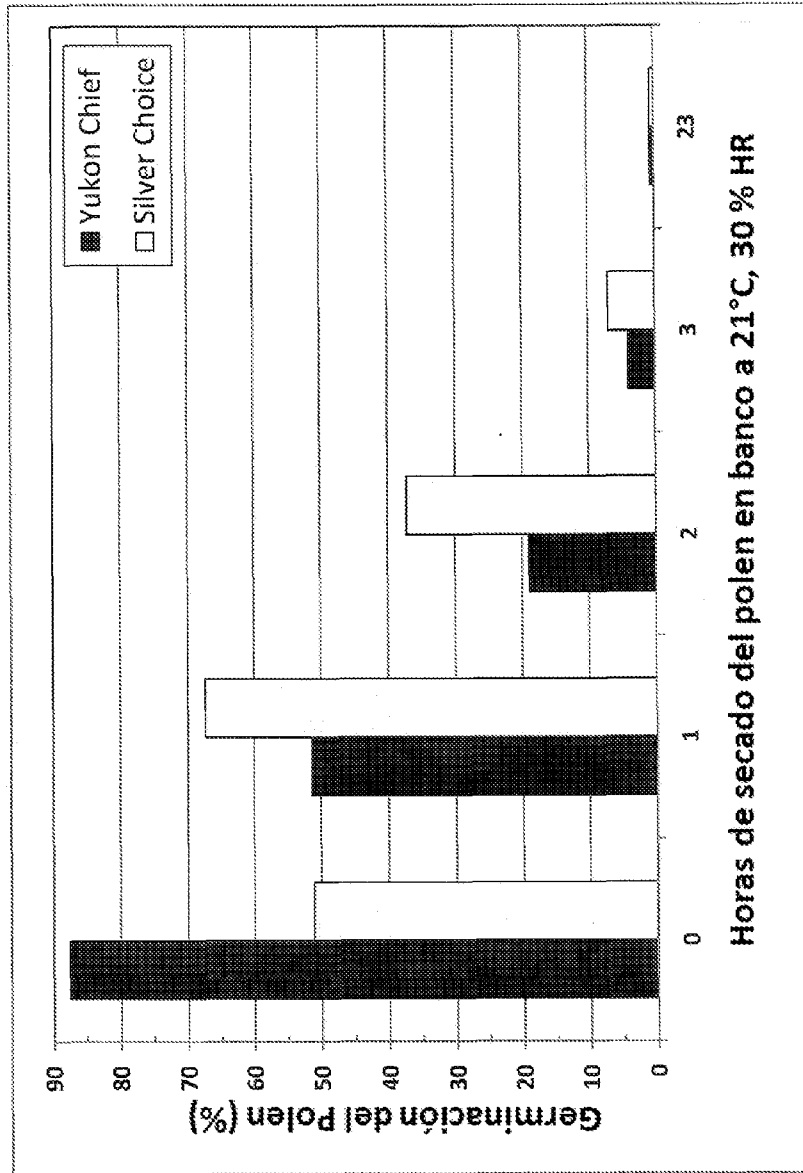


Fig. 1

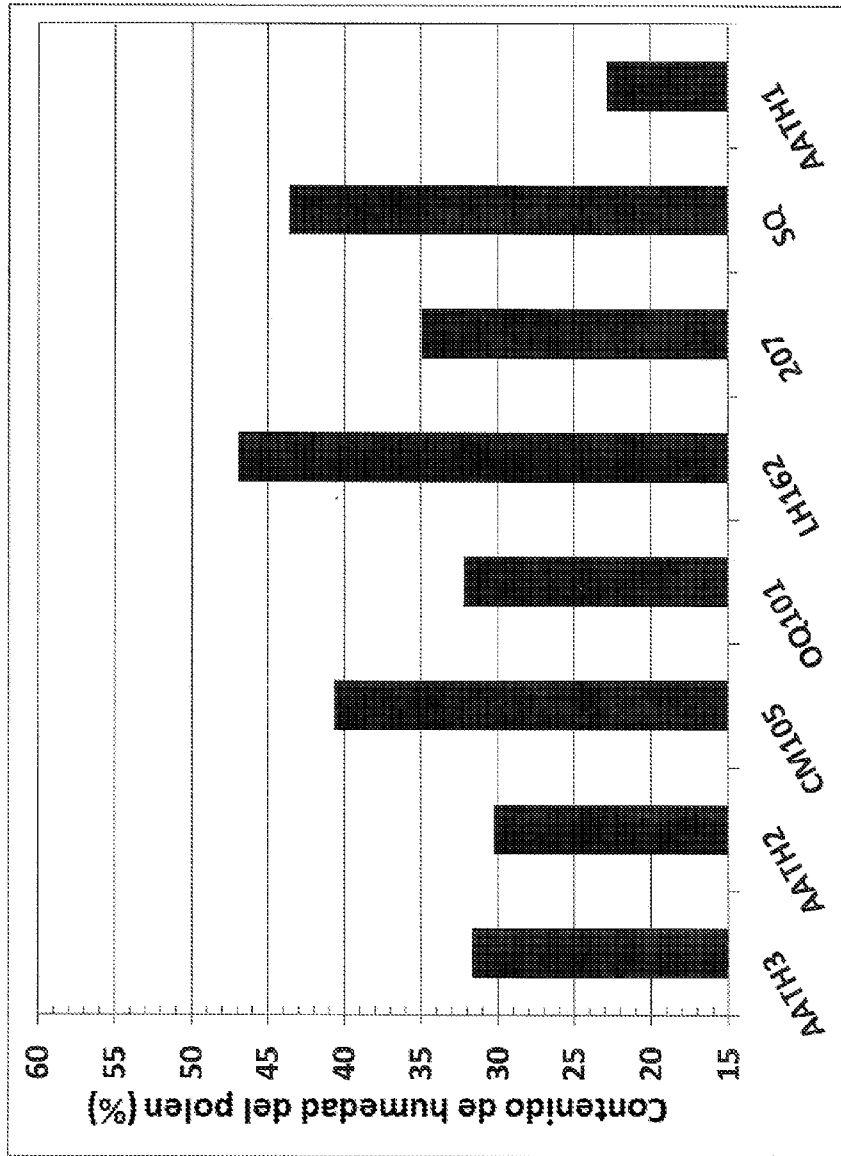


Fig. 2

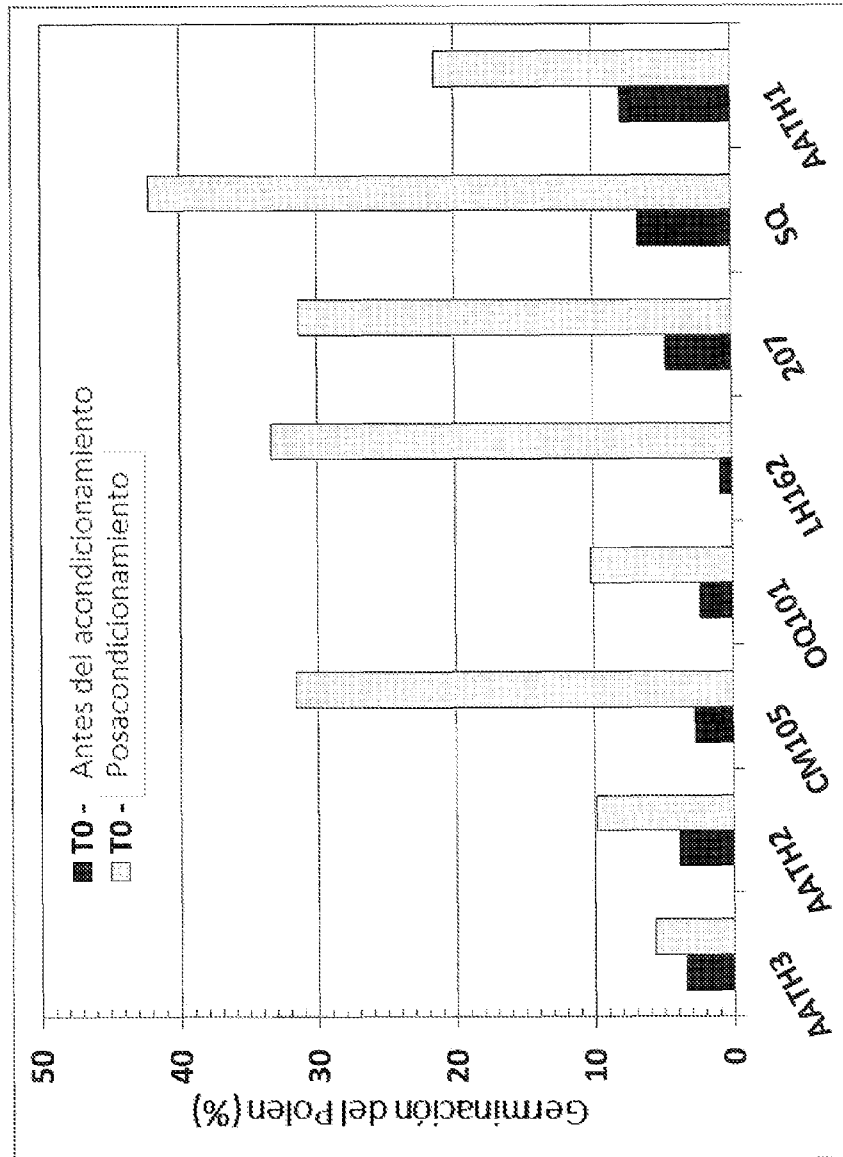


Fig. 3

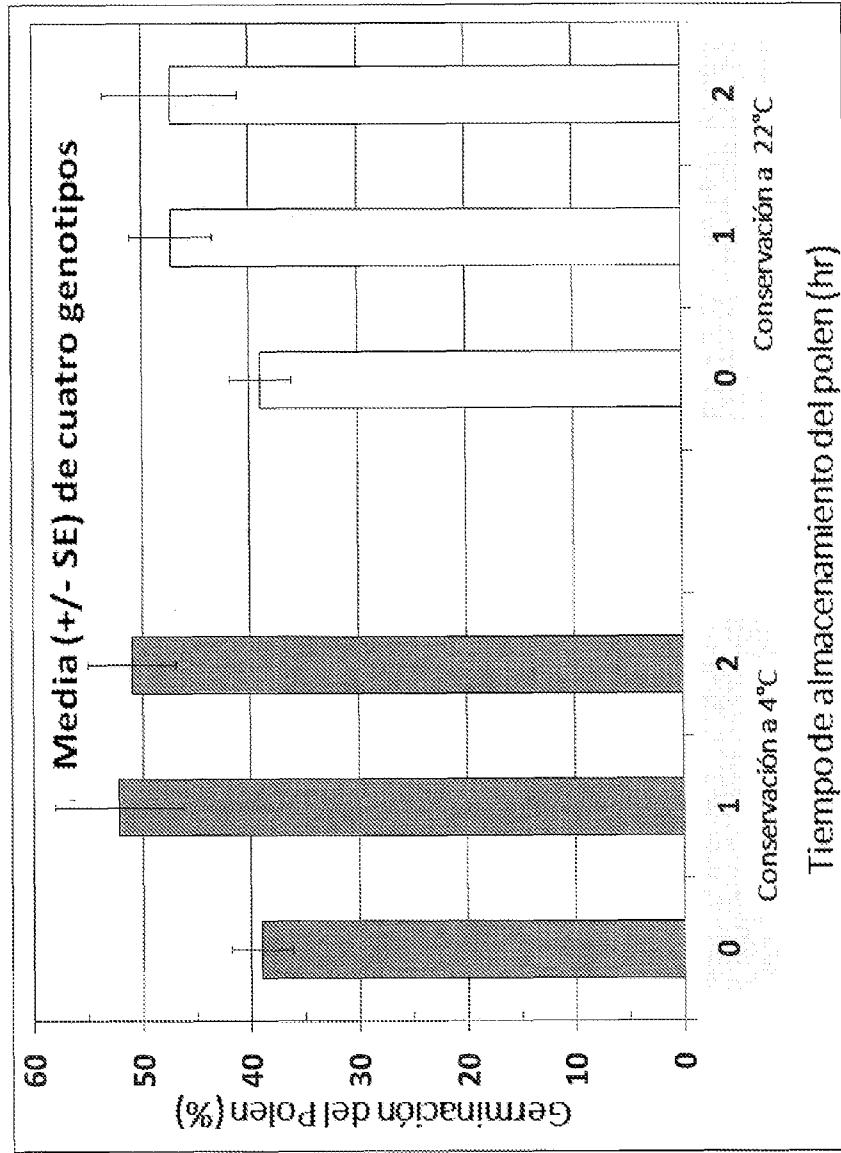


Fig. 4

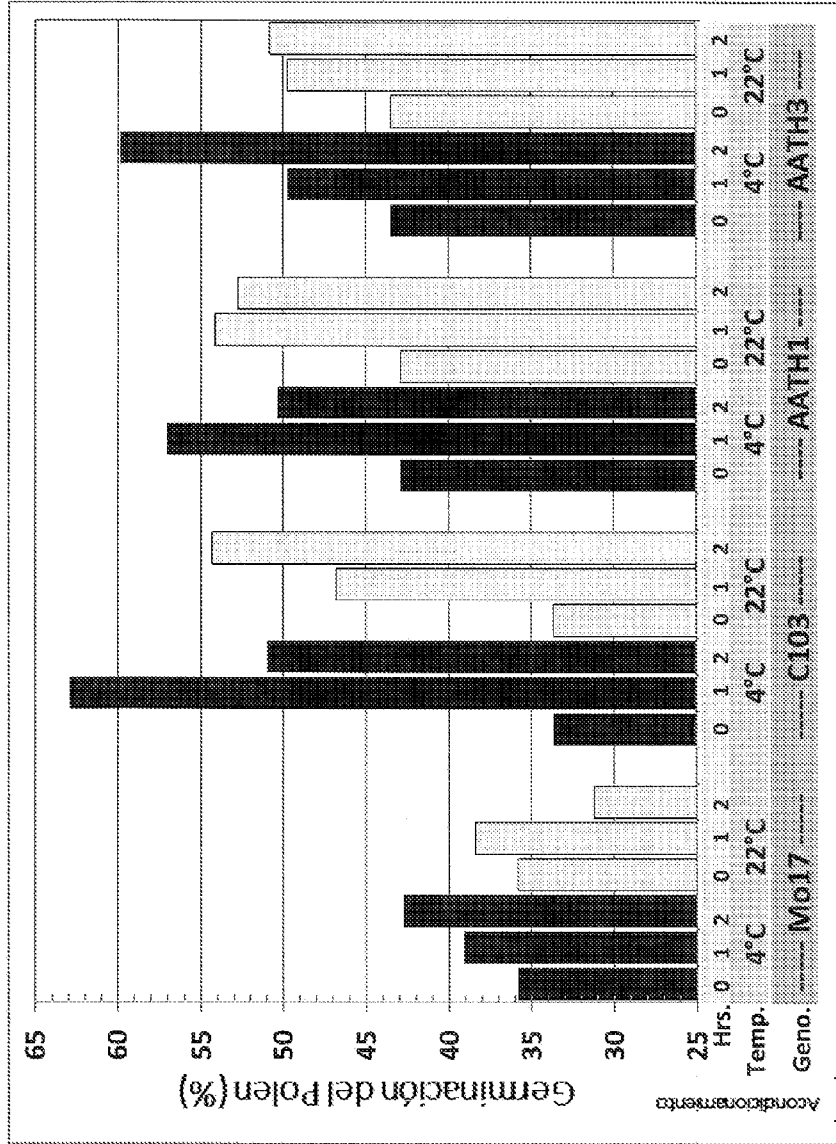


Fig. 5

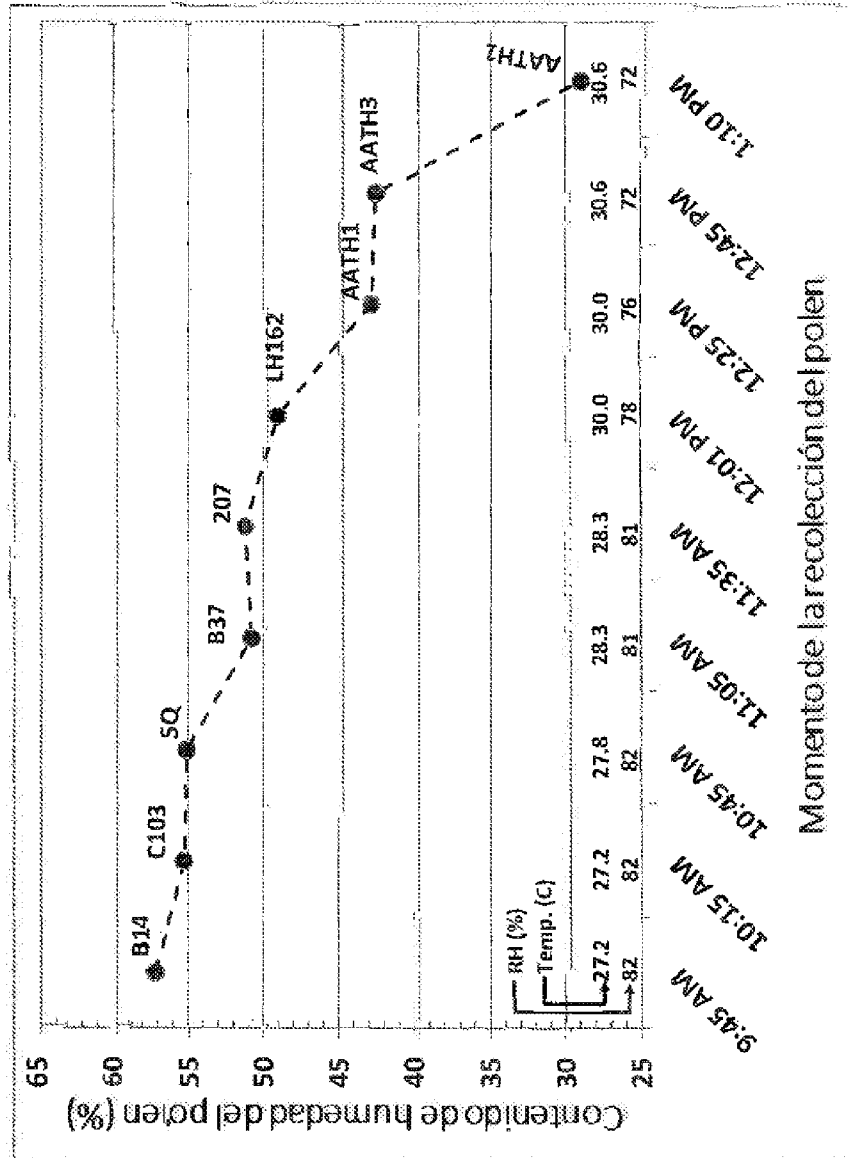


Fig. 6

Momento de la recolección del polen

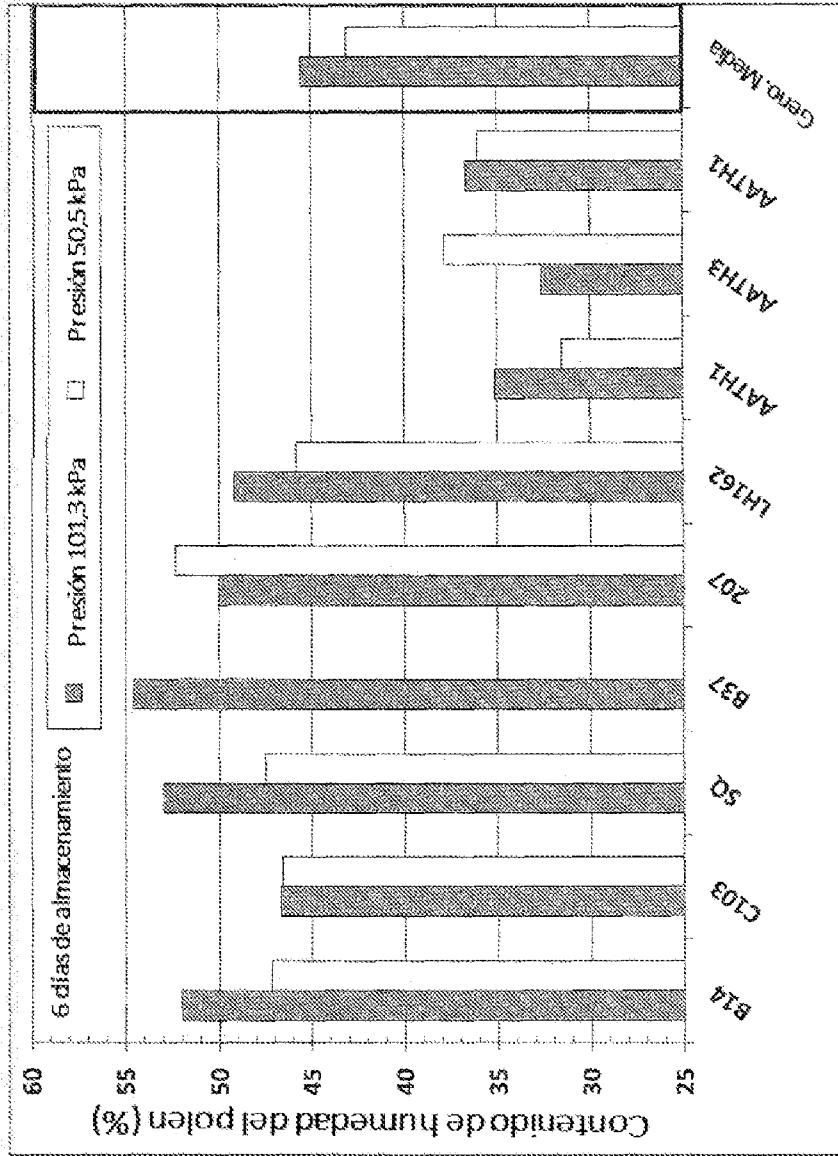


Fig. 7

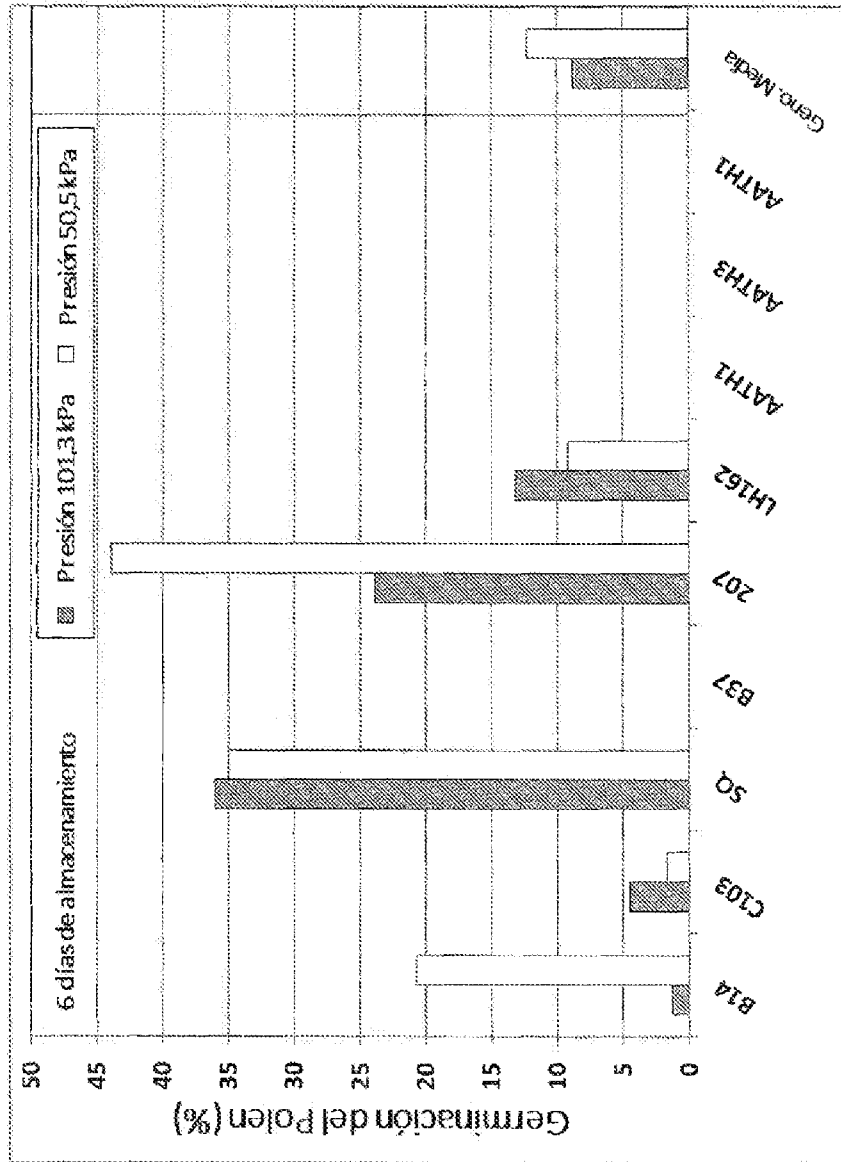


Fig. 8

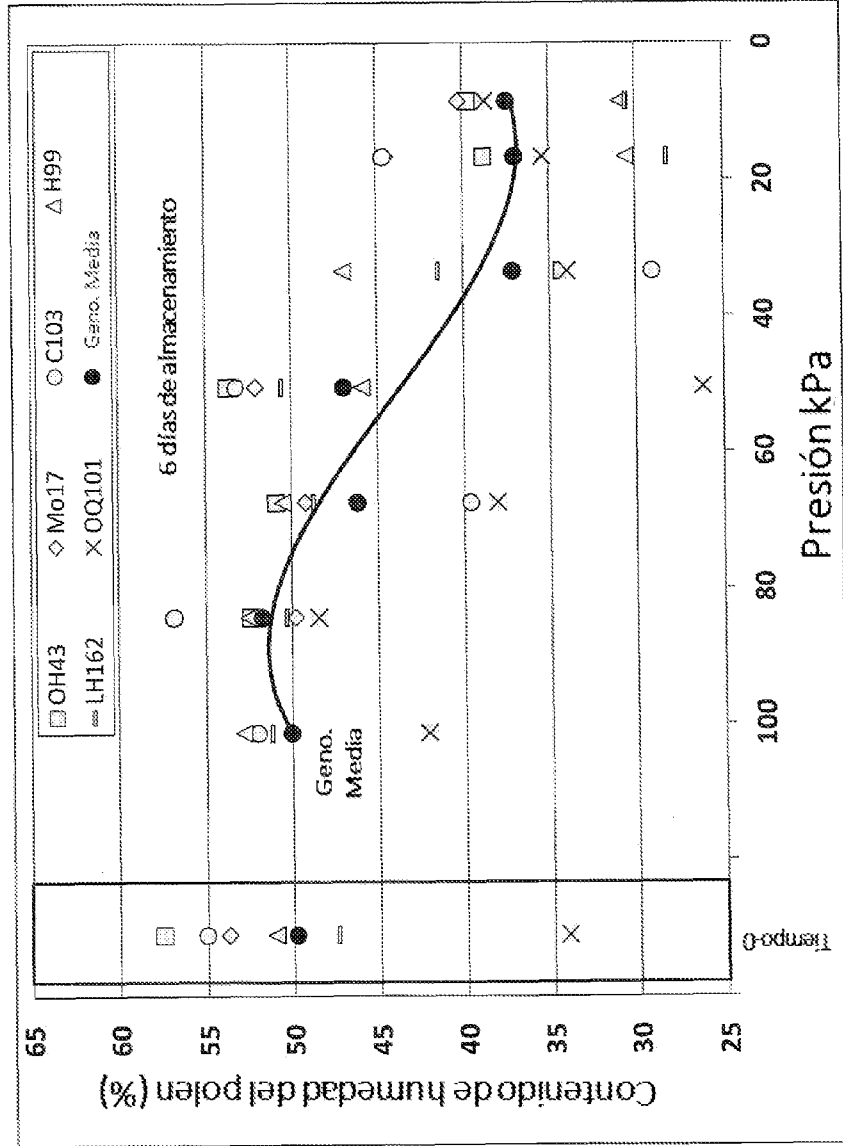


Fig. 9

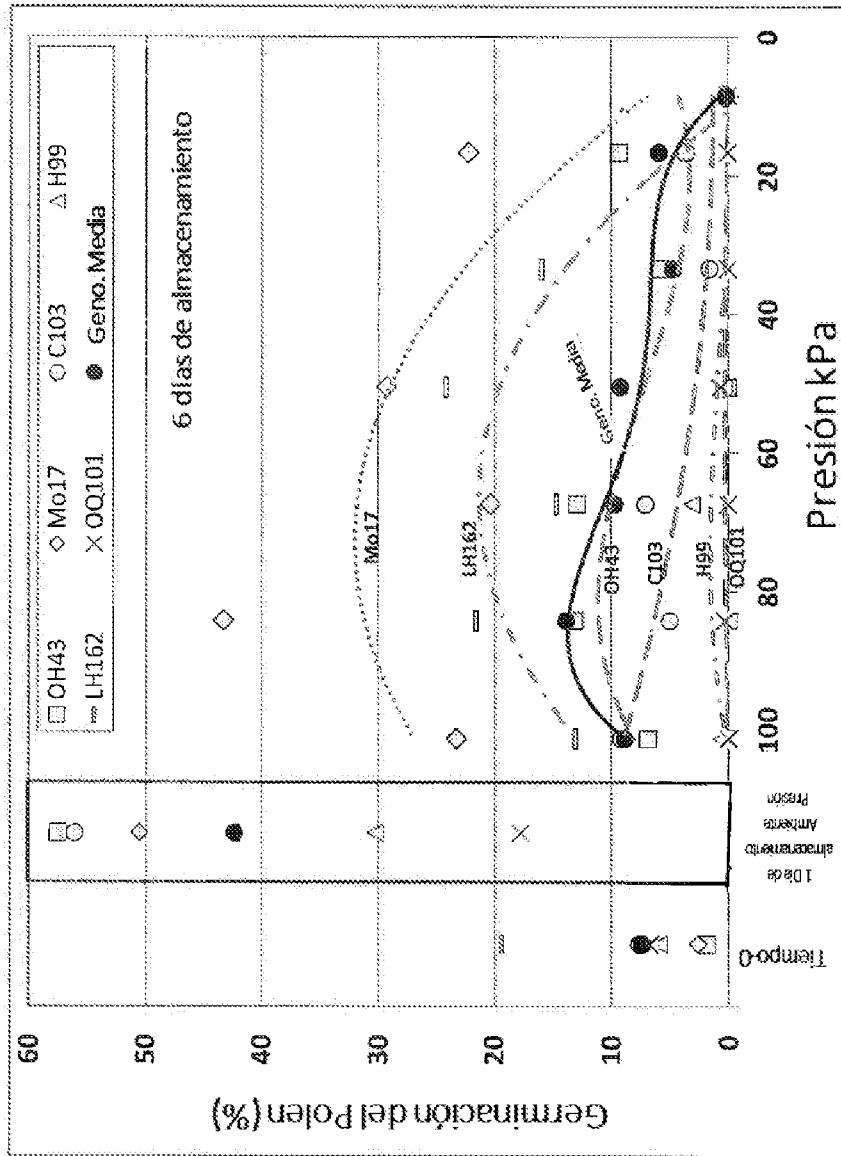


Fig. 10

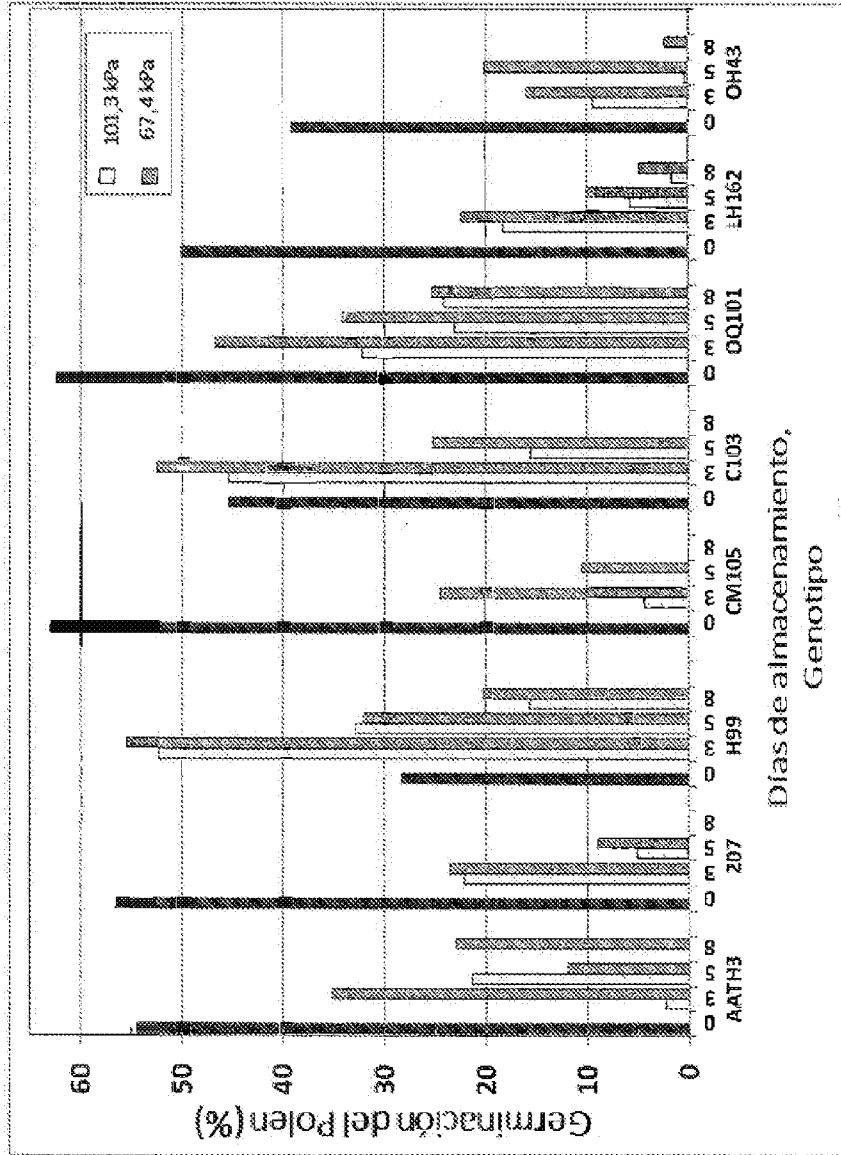


Fig. 11

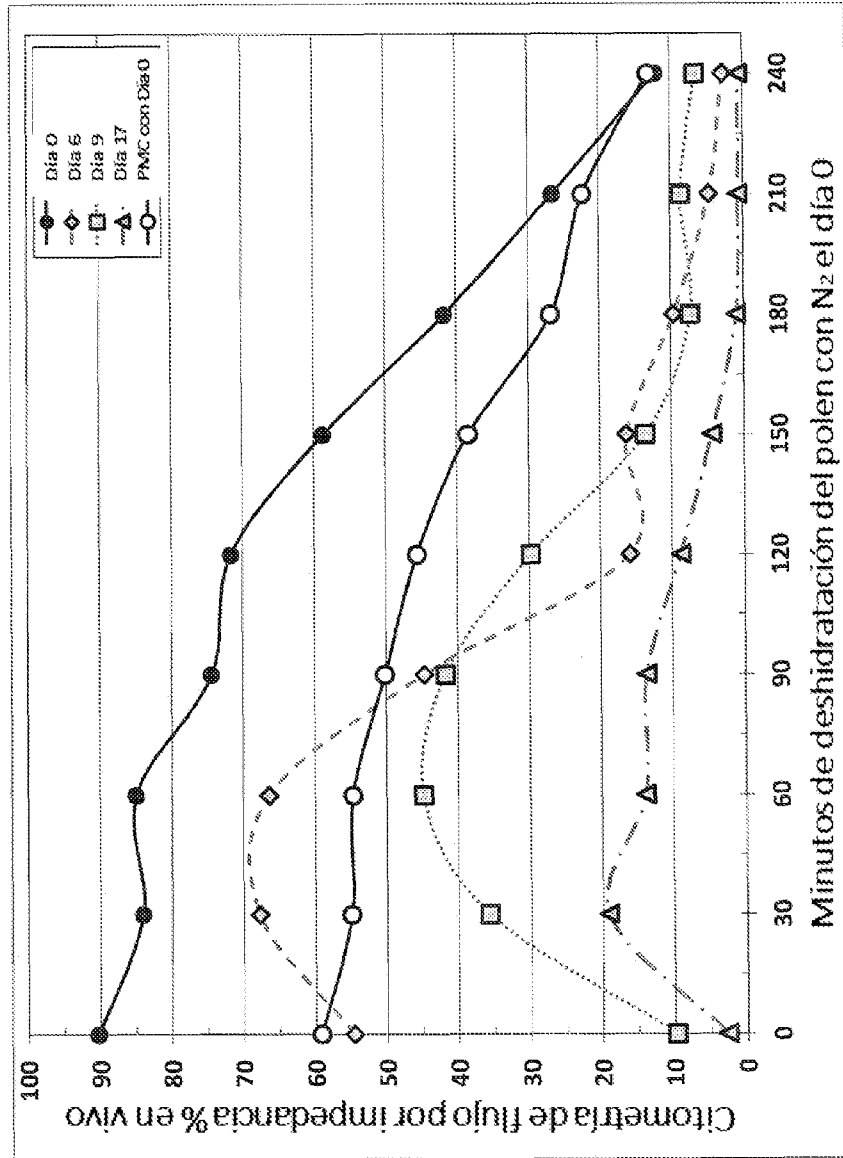


Fig. 12

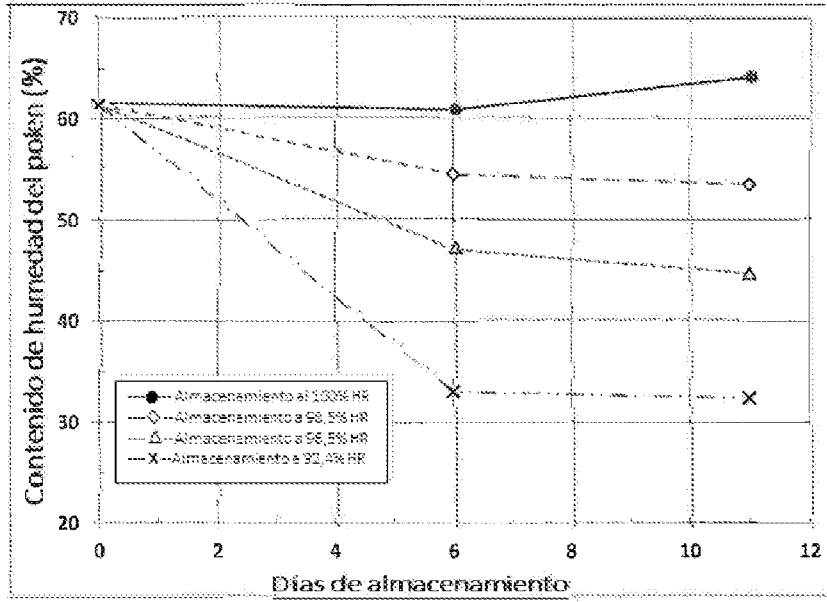


Fig. 13A

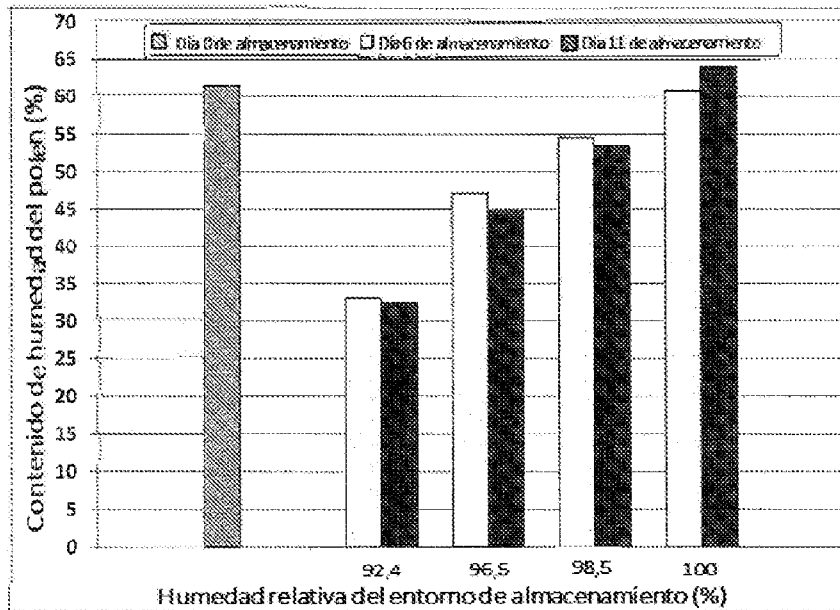


Fig. 13B

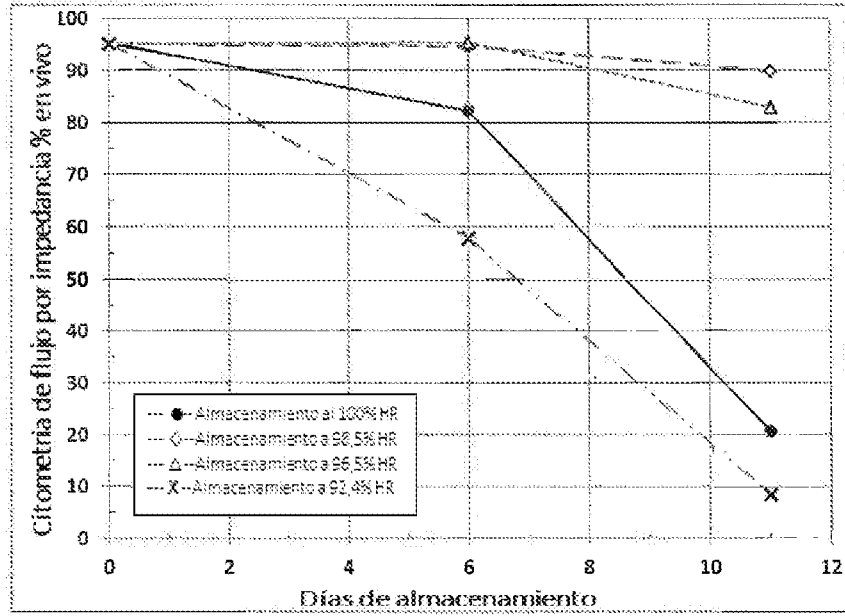


Fig. 14A

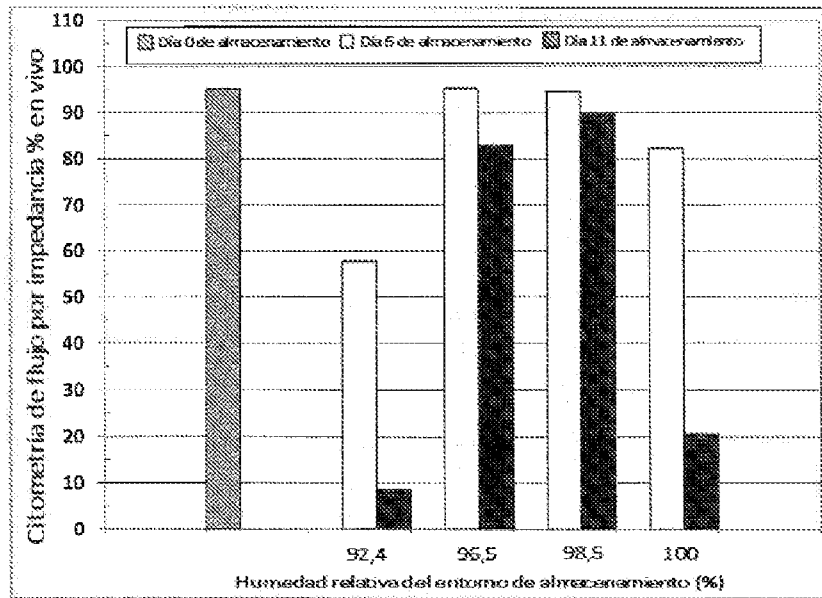


Fig. 14B

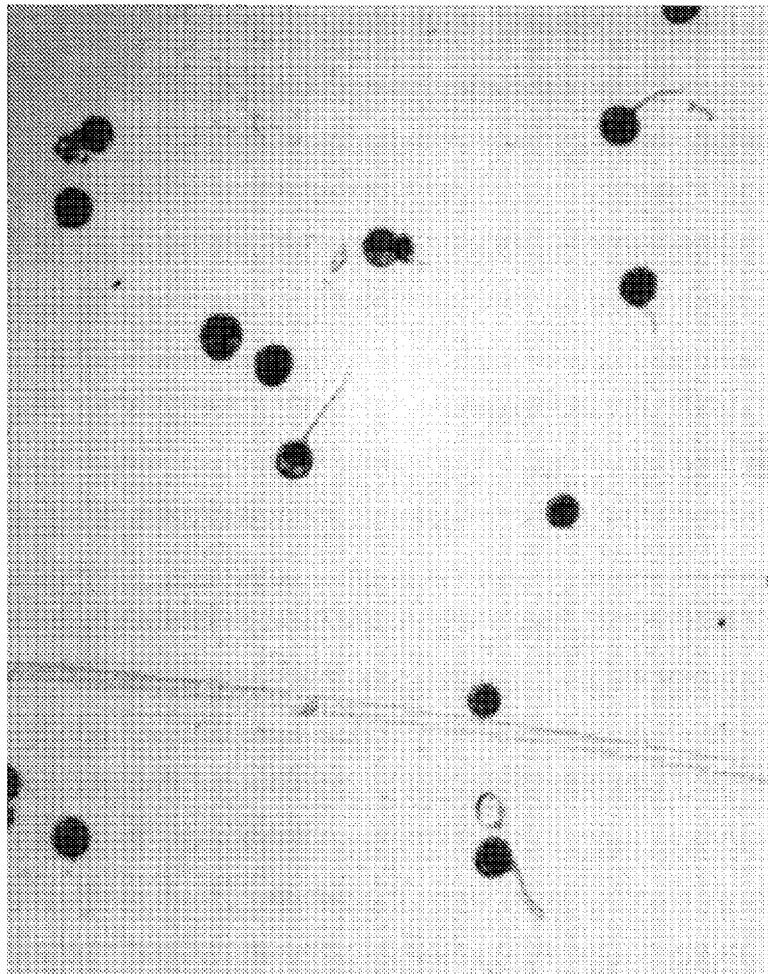


Fig. 15

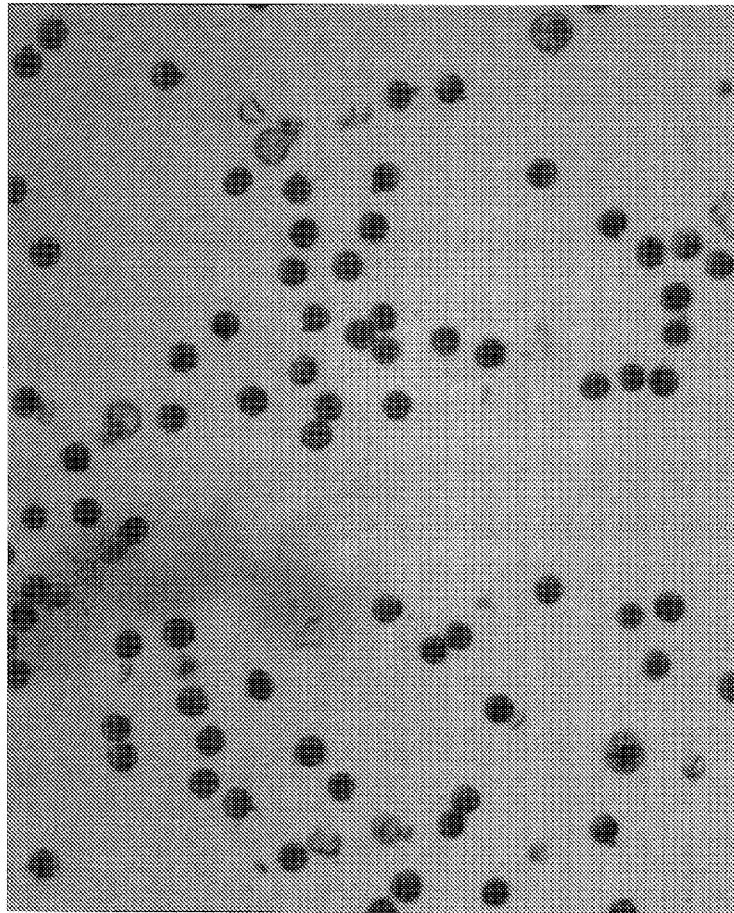


FIG. 16

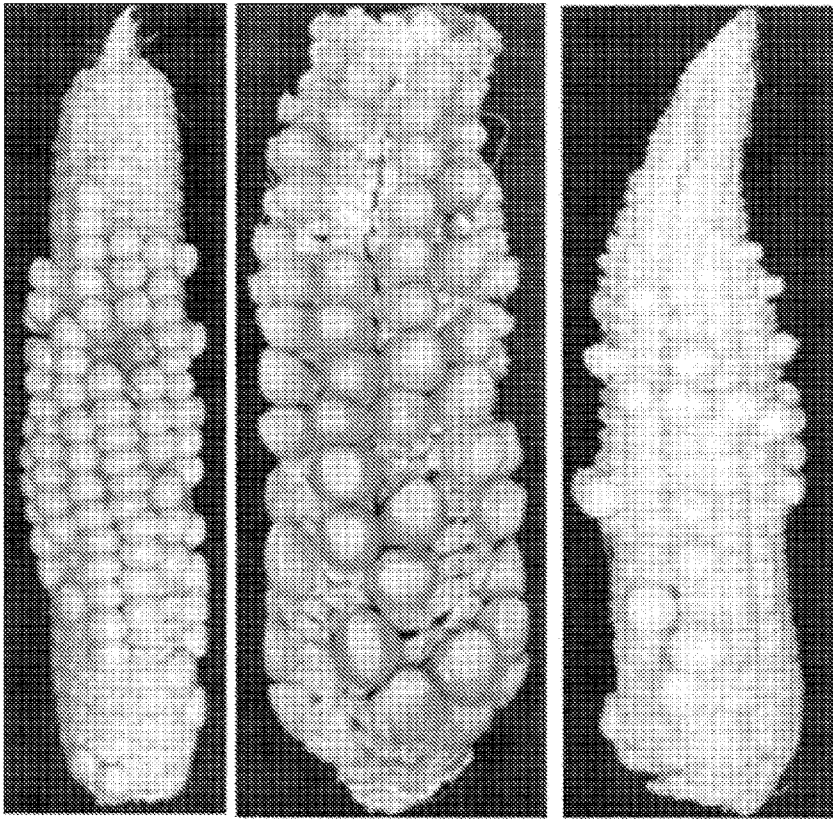


FIG. 17A

FIG. 17B

FIG. 17C

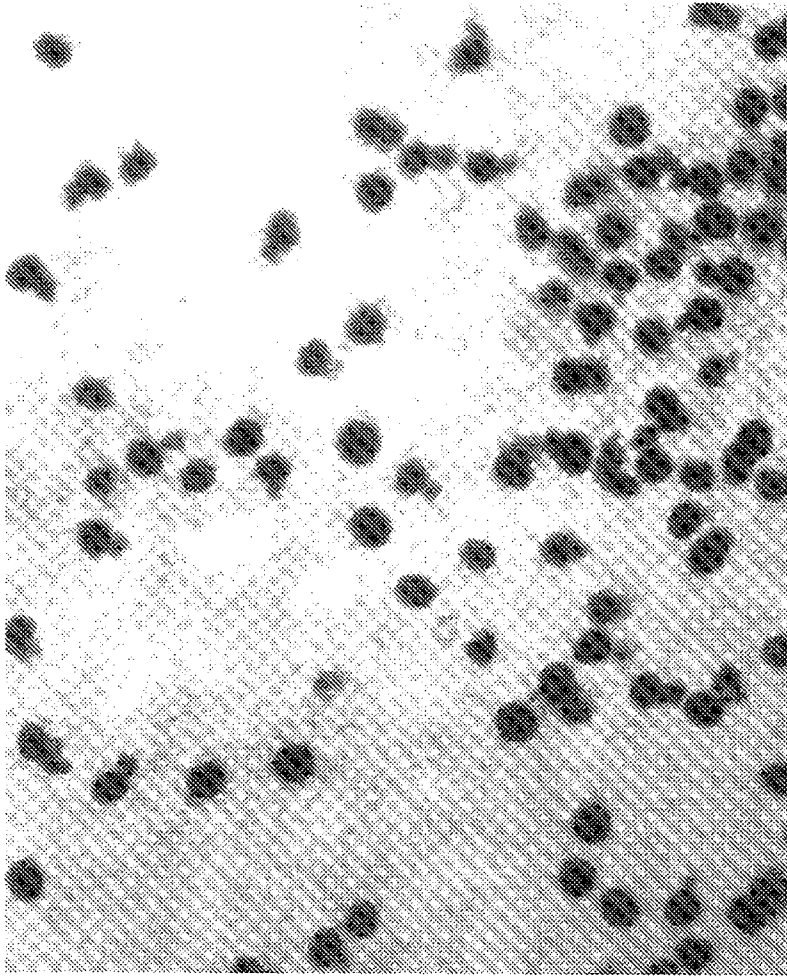


FIG. 18