



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **3 007 010**

(51) Int. Cl.:

**A01H 1/02** (2006.01)

**A01H 6/46** (2008.01)

**A01H 6/54** (2008.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2016 E 22197797 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2024 EP 4169375**

(54) Título: **Producción de semillas**

(30) Prioridad:

**25.06.2015 US 201562184596 P  
18.12.2015 US 201562269514 P  
18.12.2015 US 201562269531 P  
18.12.2015 US 201562269496 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**19.03.2025**

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

**KRONE, TODD**

(74) Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 3 007 010 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Producción de semillas

**Referencia cruzada a aplicaciones relacionadas**

La presente solicitud reivindica prioridad de la Solicitud provisional de Estados Unidos Núm. 62/184,596 presentada el 25 de junio de 2015 y titulada PRODUCCIÓN DE SEMILLAS y de la Solicitud provisional de Estados Unidos Núm. 62/269,496 presentada el 18 de diciembre de 2015 y titulada PRODUCCIÓN DE SEMILLAS y de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos Núm. 62/269,531 presentada el 18 de diciembre de 2015 y titulada PRODUCCIÓN DE GRANOS y de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos n.º 62/269,514 presentada el 18 de diciembre de 2015 y titulada PRODUCCIÓN DE GRANOS.

10 **Campo de la invención**

La presente invención se relaciona en general con una novedosa tecnología de producción de semillas y/o semillas híbridas bajo demanda (en lo sucesivo, "semillas híbridas"). Más concretamente, esta invención se relaciona con la tecnología de producción de semillas híbridas que no depende de la liberación activa de polen, la esterilidad masculina y/o el aislamiento físico.

15 **Antecedentes**

La presente invención tiene aplicación en el campo de la producción de semillas de cultivos híbridos y prácticas de cultivo de plantas, incluyendo, soja, trigo, arroz y cebada. En base a la ubicación del órgano reproductor y el momento de la fertilidad en las plantas, muchas especies dependen de la autopolinización para producir semillas fértiles. Sin aplicar algún tipo de intervención mecánica, física o genética para hacer que una planta sea androestéril, muchas plantas simplemente reproducen la genética de su planta madre. Las plantas híbridas son el resultado de la fecundación de una fuente de polen masculino de un origen genético que se cruza con los órganos reproductores femeninos de una planta con un origen genético diferente. La hibridación entre plantas de cultivo suele proporcionar una ventaja de rendimiento en la producción comercial y, por tanto, se prefiere, si es posible, a los procedimientos de polinización abierta o autógama para producir un cultivo comercial. Como muestra la Figura 1, el rendimiento de los cultivos comenzó a aumentar notablemente con la introducción generalizada de los híbridos en la década de 1940, y el rendimiento de los cultivos ha seguido aumentando de forma constante a lo largo del tiempo hasta la actualidad. Actualmente, el maíz, el arroz, el sorgo, el girasol y la colza son los principales cultivos que aprovechan las semillas híbridas. La escala de producción de semillas híbridas en otros cultivos, tales como la soja y el trigo, es muy limitada debido a la cantidad de recursos necesarios para superar los obstáculos que presentan la biología de las estructuras de los órganos reproductores y la no disponibilidad de procedimientos eficaces de esterilidad masculina. Los procesos a gran escala para producir semillas híbridas a partir de variedades de plantas que normalmente se autopolinizan son inexistentes o ineficaces, pero supondrían un gran valor si se hicieran prácticos. Es bien sabido que la siembra y el cultivo de semillas híbridas ofrecen un potencial de producción de semillas mucho mayor que la siembra y el cultivo de semillas autógamas o varietales.

35 Poco después de que se identifique una nueva variedad de semilla híbrida, los agricultores suelen estar ansiosos por explotar la semilla en sus campos. Por consiguiente, es necesario producir semillas. En la actualidad, la mayoría de las semillas son híbridos simples, en lugar de híbridos dobles, que eran los más utilizados a principios del siglo XX. No obstante, puede utilizarse cualquiera de los dos. El cambio a los híbridos monocruzados se debió al mayor rendimiento de tales semillas. Se necesita una enorme cantidad de tierra para producir todas las semillas que necesitan los agricultores cada temporada. Para producir eficazmente el híbrido deseado, las polinizaciones deben producirse por los parentales adecuados, lo que requiere un control estricto de las fuentes de polen. Para ello, a menudo es necesario impedir que el polen de la planta hembra designada se polinice a sí mismo, o se autopolinice. Normalmente, esto se consigue induciendo la esterilidad masculina. En el maíz, por ejemplo, las hembras progenitoras suelen ser deshojadas. Sin embargo, el descascarillado presenta inconvenientes. En primer lugar, es caro. En segundo lugar, la planta se lesionará, lo que se traduce en un menor rendimiento. Para paliar los inconvenientes de la eliminación de las borras, se han propuesto otras formas de esterilidad masculina. Algunos ejemplos son la esterilidad masculina citoplasmática, la esterilidad masculina génica y la esterilidad masculina inducida químicamente. Todos tienen desventajas.

50 En consecuencia, para los cultivos en los que la producción de híbridos es habitual, los procedimientos actuales de producción de semillas híbridas varían según la especie, pero típicamente implican los siguientes componentes: (1) Plantar plantas parentales femeninas y masculinas en un bloque de producción dispuestas muy cerca unas de otras; (2) ubicar el bloque de producción en un lugar aislado para reducir la exposición a otras plantas no relacionadas o no deseadas de la misma especie, y (3) impartir alguna forma de esterilidad masculina a la hembra para hacer que las plantas parentales femeninas sean estériles masculinas, evitando así la posibilidad de autopolinización, que en última instancia contaminaría la semilla híbrida. El procedimiento básico de producción de semillas de maíz híbrido mediante el uso de estos tres componentes no ha cambiado desde la primera comercialización de maíz híbrido a finales de la década de 1920 (Russell, W.A.. (1974) Proceedings of the Annual Corn and Sorghum Industrial Research Conference 29:81-101). En la producción de semillas híbridas, el término "contaminación" se relaciona con la semilla que no

contiene el cruce genético deseado y previsto entre las plantas parental femenina y parental masculina. La contaminación puede ser el resultado de la autopolinización de la planta hembra o de la polinización de la planta hembra por el polen de un progenitor masculino no deseado. Esto puede ser el resultado del movimiento del polen en el aire o introducido a través de insectos, animales salvajes, personas, vehículos u otros portadores potenciales de polen que entran en el campo de producción o estén lo suficientemente cerca de las plantas femeninas como para transferir polen inadvertidamente.

Existen desafíos para implementar con éxito el aislamiento de bloques de producción, evitar eventos de polinización indeseables e impartir esterilidad masculina. Conseguir terrenos aislados a suficiente distancia de otras plantas de la misma especie es difícil y a veces imposible. Por lo tanto, no es raro que un campo esté expuesto a polen no deseado, contaminando así un cierto porcentaje de las semillas producidas en el campo. Los procedimientos de esterilidad masculina incluyen la esterilidad genética, la eliminación física o mecánica de la parte masculina de la zona reproductiva en las plantas destinadas a ser utilizadas como fuente femenina, o un gametocida químico que mata los gametos masculinos. Los procedimientos físicos y mecánicos son muy caros, mientras que los gametocidas químicos son caros y/o poco eficaces. La esterilidad masculina genética en forma de esterilidad masculina citoplasmática se utiliza ampliamente en algunos cultivos como la canola y el girasol, pero es limitante en otros cultivos como el maíz y el arroz, en los que la utilidad es limitada porque no todo el germoplasma es compatible (Beckett, J.B.. (1971) Crop Sci. 11: 724-727; Duvick, D.N.. (1965) Avances en genética 13: 1-56). Los procedimientos de esterilidad masculina genética nuclear se encuentran principalmente en fase de desarrollo en la industria de las semillas y sólo se comercializan unas pocas formas, pero se utilizan en una pequeña minoría de hectáreas de producción de híbridos.

Aunque los procedimientos genéticos de esterilidad masculina son preferentes a los medios físicos/mecánicos y químicos, su empleo sigue exigiendo importantes recursos, aumentan la complejidad de la creación de pilas de rasgos y de la comercialización de los productos en el plazo más breve, y a veces deben pasar por complejos sistemas reguladores mundiales (para los que requieren un OMG). Intrínsecamente, todos los procedimientos de impartir esterilidad masculina en las plantas comparten el denominador común de incurrir en grandes gastos y/o recursos, así como de limitar los productos o los plazos de los productos, para completarlos adecuadamente.

Varios cultivos económicamente importantes actualmente no pueden cultivarse como híbridos (incluyendo, pero sin limitarse a, la soja y el trigo) porque no hay un procedimiento eficiente de impartir esterilidad masculina y/o las especies son tan altamente autopolinizantes y el polen viaja distancias tan cortas, que incluso con esterilidad masculina probablemente habría un éxito de polinización cruzada pobre, resultando en un bajo rendimiento de semilla híbrida de polinización cruzada, haciendo que la producción híbrida sea económicamente inviable. Además de la soja, el trigo es otro cultivo valioso que hasta la fecha ha tenido un éxito limitado empleando la producción de semillas híbridas. En términos generales, la industria de las semillas está buscando activamente procedimientos que permitan o mejoren la producción de cultivos híbridos en la mayoría de las principales especies de cultivos, impulsada por los significativos aumentos de rendimiento y la eficiencia de cultivo que permiten los sistemas de cultivos híbridos.

Para cultivos que ya utilizan producción híbrida (por ejemplo, maíz, girasol), esta invención elimina total o parcialmente la necesidad de, o reduce la dependencia de, los tres componentes costosos y dependientes de recursos mencionados anteriormente: plantación de machos en proximidad a las hembras, aislamiento y esterilidad masculina. Uno de los procedimientos más utilizados para crear plantas híbridas de maíz consiste en plantar progenitores masculinos y femeninos muy cerca unos de otros, de modo que cada progenitor tenga la composición genética adecuada para crear la semilla híbrida preferente. Como se explicará con más detalle a continuación, cada planta es capaz de aportar gametos masculinos y femeninos para producir semillas. En consecuencia, se designará una línea parental que posea las propiedades adecuadas para ser utilizada como fuente masculina, mientras que las otras plantas se designarán como las hembras. Las plantas macho suelen requerir una buena capacidad de desprendimiento de polen, mientras que las plantas hembra deben tener una exposición adecuada de los tejidos reproductivos femeninos, así como una buena producción de semillas y otras características genéticas deseables. En los procedimientos ampliamente practicados, el desprendimiento de polen del macho debe coincidir con el periodo en que la planta hembra es más fértil. Las plantas macho suelen ocupar aproximadamente el 30% del campo, aumentando este número a porcentajes mayores en los casos en que el macho es poco polinizador, mientras que las hembras ocupan aproximadamente el 70% del campo. Los machos sólo están presentes para producir polen para las plantas femeninas designadas. Por lo tanto, la tierra destinada a los machos no tiene ninguna productividad en relación con las medidas de producción de semillas o alimentos. Las plantas macho también consumen recursos valiosos, algunos de los cuales son los minerales y la humedad disponibles. Además, las plantas designadas como hembras deben esterilizarse con respecto a sus características masculinas para evitar la autopolinización o la polinización por parte de las otras hembras designadas en el campo.

Como apreciará un experto en la materia, la práctica de la invención desvelada en la presente memoria descriptiva proporcionará diferentes beneficios dependiendo de la naturaleza del cultivo. Por ejemplo, algunos cultivos tienen altos índices de autopolinización debido a que el polen se libera dentro de la flor incluso antes de que ésta se abra. Estos cultivos experimentan de forma natural tasas muy elevadas de semillas autógamas. La práctica de la invención puede reducir el porcentaje de autopolinizaciones, pero debido a que la autopolinización ocurre antes de la apertura de la flor, la tasa de polinizaciones cruzadas exitosas con polen masculino designado será menor que la tasa en cultivos que no tienen autopolinización ocurriendo dentro de la flor cerrada. Algunos cultivos no requieren largas distancias de aislamiento para evitar el entrecruzamiento debido a la naturaleza del cultivo y a sus características polínicas. En tales casos, la práctica de la invención actual puede no afectar a ningún requisito de aislamiento, pero aún así aumentará

la tasa de polinizaciones cruzadas exitosas con polen masculino designado y también disminuirá las autopolinizaciones. En consecuencia, dependiendo del cultivo, la práctica de la invención puede eliminar total o parcialmente la necesidad de, o reducir la dependencia de uno, dos o los tres componentes costosos y dependientes de los recursos mencionados anteriormente: la plantación de machos cerca de las hembras, el aislamiento y la esterilidad masculina.

Además, a menudo puede ser difícil encontrar suficiente aislamiento de plantas no relacionadas de la misma especie que tengan el potencial de causar polinizaciones cruzadas no deseadas en relación con las polinizaciones cruzadas objetivo. Facilitar este aislamiento también puede resultar caro. Por ejemplo, en la producción de semillas de maíz híbrido es habitual rodear el maíz con otros cultivos, como la soja, para lograr un aislamiento suficiente. Como se muestra en la Figura 2, un campo típico de producción de semillas híbridas de maíz **100** suele estar rodeado por aproximadamente 201 metros (660 pies) de cultivo de soja **102** en todos sus lados con el fin de lograr el aislamiento. El cultivo de soja se representa en el cuadrado exterior ligeramente sombreado de la Figura 2. El campo interior de producción de semillas híbridas **104** tiene un borde de 4 a 8 hileras de plantas progenitoras masculinas **106** en todos los lados, como se representa en el cuadrado negro de la Figura 2. La parte más interna del campo de producción de semillas híbridas se planta en hileras de plantas parentales masculinas alternadas con plantas parentales femeninas. En la Figura 2, esto se muestra en el patrón común de 2 filas de machos entre 4 filas de hembras. Este patrón no pretende ser limitativo: se utilizan muchos patrones de forma que las filas de machos se intercalan entre las filas de hembras en un intervalo común. Los cultivadores utilizan diversos patrones de plantación en función de las características de las plantas parentales masculinas y femeninas y de otros factores que puedan darse en un lugar determinado. La figura 2 da como resultado un campo con aproximadamente un 35% de plantas progenitoras masculinas y un 65% de plantas progenitoras femeninas. Sobre la base de un campo de aproximadamente 610 metros (2000 pies) de longitud con una anchura de 800 filas, la disposición de la Figura 2 daría lugar a aproximadamente 37 hectáreas (92 acres) de producción de semillas rodeadas de 65 hectáreas (161 acres) de producción de soja que actuarían como aislamiento. Esto requiere una considerable superficie de terreno para una superficie relativamente pequeña de producción de semillas. Otros ejemplos de campos de producción de semillas híbridas pueden utilizar diferentes combinaciones de plantas parentales masculinas y femeninas, y la decisión de qué patrón se utilizará depende a menudo de las características de las plantas parentales.

Practicar tal procedimiento a escala de producción o comercial es caro y a menudo insuficiente para dar la pureza genética requerida. La pureza genética es una medida de la pureza de la semilla. En referencia a las semillas híbridas, la pureza genética es la medida de las semillas que tienen el cruce genético previsto entre las plantas progenitoras masculina y femenina, y suele expresarse en porcentaje. Las semillas resultantes de la autopolinización (mismos) o de la polinización con polen no deseado (sin-cruzar) se consideran contaminantes y no son semillas híbridas. La semilla híbrida de maíz debe tener normalmente un 95% de pureza genética (es decir, un 95% de semilla híbrida) para poder venderse como semilla híbrida certificada. La certificación de semillas en Estados Unidos es un esquema de cuatro generaciones que es responsabilidad de cada estado individual, y dentro de cada estado, hay una agencia designada para certificar semillas basándose en la ley de semillas del estado individual. Las cuatro generaciones son la semilla de obtentor, la semilla de fundación, la semilla registrada y la semilla certificada. Las semillas certificadas se producen a partir de semillas de fundación o registradas y son el producto final del programa de certificación de semillas de cuatro generaciones. Aunque cada estado tiene su propia ley de semillas, los requisitos de pureza genética del 95% son habituales. Incluso cuando se utilizan las distancias de aislamiento recomendadas, es habitual que el polen indeseable contamine el campo debido al polen transportado por el viento, los insectos y otros factores de la naturaleza, procedente de otros campos cercanos.

Entre los procedimientos para inducir la esterilidad masculina en las plantas parentales femeninas de maíz, el desflorado se utiliza para la mayor parte de la producción mundial de semillas y es bastante caro debido a la necesidad de mano de obra y/o equipos costosos para eliminar las borlas de las plantas femeninas. Desde la amplia adopción de híbridos de maíz en la década de 1930 (Crow, J.F. (1998) Genetics 148:923-928) la producción de semillas se ha producido en su mayor parte de una manera muy similar que implica la plantación de un bloque de producción de semillas de un macho y una hembra aislados y el deshojado de las hileras de hembras. La invención descrita en la presente memoria descriptiva tiene valor económico en la medida en que puede disminuir el coste de los bienes vendidos (CBV) para el proceso de producción de semillas. En primer lugar, la invención ahorrará dinero en costes de descorteza. La invención podría permitir desgasificar a una media del 50% de la intensidad empleada actualmente. Suponiendo un coste actual de desgasificación de 350 \$/A (Borrador de evaluación medioambiental [en línea], 2010.). Pioneer Hi-Bred International, Inc. Tecnología de producción de semillas (SPT) Proceso DP-32138-1 Maíz [recuperado el 2016-06-19]. Obtenido de Internet: <URL: [https://www.aphis.usda.gov/brs/aphisdocs/08\\_33801p\\_fea.pdf](https://www.aphis.usda.gov/brs/aphisdocs/08_33801p_fea.pdf)> ) y aproximadamente un millón de acres de producción de semillas híbridas sólo en EE.UU. (Weber et al., 2009.). Revista de Agronomía y Ciencias de los Cultivos 193: 79-92), la invención actual tendría un valor anual para la industria semillera en costes de descerdado reducidos de 175 millones de dólares (350 dólares/acre x 50% de adopción x 1 millón de acres). Además, se captaría valor adicional disminuyendo las distancias de aislamiento y reduciendo la cantidad de macho que se planta en el campo de producción de semillas. Los procedimientos de esterilidad masculina genética son menos costosos que el descerdado, pero siguen acarreando costes sustanciales a la industria de semillas para desarrollar las líneas femeninas con los genes/citoplasma correctos, recibir la aprobación reglamentaria del gobierno para utilizar los genes si se consideran OMG, e introducir productos que se retrasan ligeramente debido al calendario del proceso de desarrollo. Por estas razones, la esterilidad masculina genética se utiliza en una minoría del

total de unidades híbridas de maíz producidas en Estados Unidos. Del mismo modo, la inducción química de la androesterilidad se utiliza en unos pocos cultivos y se considera cara, relativamente ineficaz y no de aplicación generalizada.

En consecuencia, existe una necesidad en la industria de una invención que reduzca el impacto de, o elimine por completo, los inconvenientes anteriores. Esta invención reduciría o eliminaría por completo la necesidad de plantar plantas parentales masculinas cerca de plantas parentales femeninas, o reduciría el número de plantas parentales masculinas necesarias. Además, la invención aliviaría o reduciría significativamente la necesidad de plantar el campo de producción de semillas aislado de otras plantas no relacionadas de la misma especie mediante procedimientos de polinización más controlados. Asimismo, la invención permitiría utilizar distancias de aislamiento más cortas. Además, la invención reduciría o eliminaría el requisito de emplear alguna forma de esterilidad masculina en los progenitores femeninos designados con el fin de evitar la autopolinización, reduciendo así en gran medida o eliminando por completo el proceso de descascarillado, que requiere mucho trabajo, o el uso de otros procedimientos de esterilidad masculina.

Además, para los cultivos que no pueden cultivarse como híbridos, o que son difíciles de hibridar debido a desafíos de estructura morfológica o a las prácticas de cultivo actuales, la invención actual podría permitir la producción de semillas híbridas y permitir la producción de cantidades de nivel comercial a un coste que haría de la producción híbrida una opción económicamente viable para la industria de semillas. Los esfuerzos por hibridar el trigo se han prolongado durante más de 80 años con escaso éxito en la producción económica de semillas, a pesar del potencial de aumento del rendimiento del vigor híbrido en el trigo superior al 20% (Pickett, A. A. (1993) Adv.. Plant Breed, Suppl. J. Plant Breed. 15: 1-259). Un sistema que produzca económicamente semillas híbridas, como la invención en la presente memoria descriptiva, tendría un enorme valor. Suponiendo un modesto aumento del rendimiento del 10% para el trigo híbrido en comparación con el trigo varietal, y suponiendo que un tercio de las hectáreas de trigo se convirtieran a híbridos, habría un valor anual de 4.300 millones de dólares a nivel mundial para toda la cadena de valor. Esta cifra se basa en una producción mundial de trigo en 2014 de 729MM de toneladas métricas (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAOSTAT)) y un precio del trigo básico de 180,32 dólares por tonelada métrica (13 de junio de 2016 precio del trigo, [en línea, recuperado el 2016-06-13] Recuperado de internet: < URL: <https://www.ams.usda.gov/market-news/livestock-grain-market-news-publications>>) (Cálculo: 180,32 \$/TM x 729 millones de toneladas x 10% de aumento del rendimiento x 33% de adopción de híbridos). Este valor total es conservador, ya que las afirmaciones de la industria de las semillas son que la captura potencial de valor global solo a través de la venta de semillas con aproximadamente un 33% de adopción de trigo híbrido es de aproximadamente 3.000 millones de dólares anuales (Presentación de Syngenta en el Día del Inversor 2015 [en línea], página 20, [recuperado el 2016-06-19]. Descargado de Internet:< URL: <http://www4.syngenta.com/~/media/Files/S/Syngenta/events-and-presentations/plenary-presentation-rnday2015-trish-malarkey.pdf>>La cifra a escala mundial es aún mucho mayor.

### **35 Breve descripción de las figuras**

Figura 1: Esta cifra indica el aumento del rendimiento medio en fanegas por acre de los cultivos de maíz en Estados Unidos desde 1866 hasta 2011. Fuente: Página web de la Extensión de la Universidad de Missouri.

Figura 2: Esta figura representa una vista de arriba abajo de un campo típico de producción de semillas híbridas de maíz. El cuadrado sombreado claro exterior es el borde de aislamiento, normalmente plantado con soja. El cuadrado negro interior representa plantas progenitoras masculinas, y el campo interior es un patrón de hileras alternas de plantas progenitoras masculinas y femeninas.

### **Sumario de la invención**

Se proporciona un procedimiento de selección de una ventana de tiempo diaria durante la cual las plantas parentales femeninas designadas están listas para la polinización cruzada objetivo con polen de planta masculina designada y por lo tanto adecuadas para la producción de semillas híbridas de interés, en el que las plantas parentales femeninas designadas se seleccionan del grupo que consiste en trigo, cebada, soja y arroz, en el que las plantas parentales femeninas designadas se exponen a polen no deseado, siendo dicho polen no deseado:

a. polen de componentes masculinos de dichas plantas madre femeninas designadas, cuyo polen tiene el potencial de causar una autopolinización no deseada de las plantas madre femeninas designadas; y/o

b. polen de plantas no relacionadas de la misma especie transportado por el viento, los insectos y otros factores de la naturaleza, cuyo polen tiene el potencial de causar polinizaciones cruzadas no deseadas en relación con las polinizaciones cruzadas objetivo

el procedimiento comprende: establecer que los componentes femeninos de las plantas madre femeninas designadas son receptivos para recibir polen; y seleccionar la ventana de tiempo diaria con respecto a las plantas madre femeninas designadas, donde la ventana de tiempo diaria que se selecciona:

i. es antes de la parte del día durante la cual comienza a desprenderse el polen no deseado, por ejemplo durante la primera o la segunda parte de la mañana y/o por la noche;

- ii. es anterior a la parte del día después de la cual se seca el rocío diario; y/o
- iii. es en el mismo momento en que los componentes femeninos de las partes designadas de la planta se vuelven receptivos por primera vez para recibir polen.

Dicho procedimiento de selección de una ventana de tiempo diaria es particularmente útil en el contexto de informar a los usuarios de un momento optimizado cuando desean llevar a cabo un proceso de producción de semillas de trigo, cebada, soja o arroz, tal como se describe en la presente memoria descriptiva (aunque dicho proceso de producción de semillas en sí no forma parte de la invención actualmente reivindicada), en el que se mejora la pureza genética de la semilla resultante disminuyendo la contaminación que comprende cultivar una planta parental femenina designada que incluye componentes tanto femeninos como masculinos; polinizar intencionalmente, en una o más ocasiones, dicha planta parental femenina designada con polen de planta masculina designada cuando dichos componentes masculinos de dicha planta parental femenina designada no liberan polen viable y cuando otras fuentes de polen biológicamente compatibles tampoco liberan polen viable; cultivar la planta femenina designada hasta la madurez; y cosechar la semilla producida por dicha planta femenina designada. Además, por medio de la selección de una ventana de tiempo diaria de acuerdo con la presente invención, se proporciona un momento óptimo a los usuarios del proceso de producción de semillas (no reivindicado en la actualidad) que reduce o elimina la necesidad de una o más de las siguientes condiciones: esterilidad masculina de dicha planta femenina designada; aislamiento físico y/o temporal de dicha planta femenina designada de cualquier fuente de polen biológicamente compatible; y plantas polinizadoras masculinas que se cultiven en las proximidades de dicha planta femenina designada.

En una realización de la invención, dicho polen de planta macho designado puede ser polen de planta macho designado fresco o conservado. El polen puede haber sido recolectado en uno o varios de los siguientes lugares: 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. El polen conservado puede haberse conservado por cualquier medio que permita que el polen conserve su viabilidad, incluidas, entre otras, varias formas de refrigeración o congelación, tales como el enfriamiento, la crioconservación, la liofilización o el almacenamiento en nitrógeno líquido. Además, el polen, ya sea fresco o conservado, puede haberse recogido de una fuente con ritmo circadiano alterado, una fuente con floración circadiana normal, pero en la que dichos componentes masculinos de las plantas madre femeninas designadas se retrasan, o una fuente con floración circadiana normal en la que se permite que los componentes masculinos de las plantas madre femeninas designadas se desprendan sin retraso. El polen, fresco o conservado, puede haber sido recogido de una o más fuentes genéticas y puede haber sido combinado con polen de otras fuentes genéticas antes de su aplicación.

El procedimiento de selección de una ventana de tiempo diaria de acuerdo con la presente invención es particularmente útil en el contexto de informar a los usuarios de un momento optimizado a la hora de determinar cuándo realizar un procedimiento de producción de semillas (aunque dicho procedimiento de producción de semillas en sí no forma parte de la invención actualmente reivindicada), incluyendo el procedimiento de producción de semillas la aplicación intencionada de polen masculino designado a una planta femenina designada en la que la planta madre femenina designada se encuentra en un estado en el que los componentes femeninos están listos para recibir polen pero los componentes masculinos no están liberando polen. Además, el progenitor femenino designado no necesita incluir esterilidad masculina y no necesita estar aislado de fuentes de polen biológicamente compatibles indeseables.

La fuente de polen masculino designada puede ser de polen previamente conservado o recién cosechado de material fuente masculino.

#### **Descripción detallada**

A continuación se describe detalladamente una realización de tecnología y procedimientos para seleccionar una ventana de tiempo diaria de acuerdo con la presente invención. Dicho procedimiento es particularmente útil en el contexto de informar a los usuarios de un momento optimizado a la hora de determinar cuándo realizar un procedimiento que permita mejorar la producción de semillas híbridas y, aunque dicho procedimiento de producción de semillas híbridas en sí no forma parte de la invención que se reivindica, también se trata con más detalle a continuación para la divulgación asociada del contexto en el que el resultado del procedimiento reivindicado de seleccionar una ventana de tiempo diaria de acuerdo con la presente invención puede entonces emplearse de forma útil. Dicha tecnología y procedimientos pueden utilizarse para la creación de semillas híbridas a partir de cualquier planta. Para facilitar la discusión y la comprensión, la siguiente descripción detallada se relaciona con menudo a los procedimientos para su uso con especies de referencia ejemplares maíz (también denominado maíz), que no forma parte de la invención, sino que simplemente sirve como ejemplo a través del cual se pueden entender los procedimientos de la invención, es decir, los que utilizan trigo, cebada, soja y arroz. La tecnología de la presente invención puede utilizarse para informar a los usuarios de cuándo realizar un procedimiento de producción de semillas híbridas con el fin de disminuir la contaminación y aumentar la pureza genética en la producción de progenitores y/o la producción de semillas en general. La contaminación puede reducirse en cualquier cantidad, incluyendo pero no limitándose al 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, o cualquier otra cantidad. En las realizaciones preferentes, la contaminación puede reducirse al menos en un 30%, tal como por ejemplo en un 30% o más, en un 40% o más, o en un 50% o más.

Las semillas, incluidas las semillas híbridas, se producen para diversos fines. En primer lugar, se producen semillas con diversos fines de investigación para evaluar el valor de nuevas combinaciones genéticas. Las empresas de semillas dedican miles de millones de dólares a la investigación para desarrollar una mejor genética vegetal. Otra razón para producir semillas híbridas es la venta comercial de dichas semillas a productores, como los agricultores.

- 5 Además, se producen semillas para crear las semillas parentales que se utilizan para cultivar los parentales en un campo de producción de semillas híbridas. Independientemente del uso final de la semilla, la producción de semillas híbridas depende de que el polen masculino apropiado fecunde a la hembra adecuada. Un procedimiento mejorado de producción de semillas híbridas incluye la recogida, el almacenamiento y la entrega de polen de las plantas parentales masculinas a las plantas parentales femeninas. Algunos procedimientos de recogida de polen son 10 conocidos en la técnica. Por ejemplo, la patente estadounidense 4.922.651 desvela un aparato para efectuar o mejorar la polinización de las plantas.

Además, se conocen en la técnica algunos procedimientos de administración de polen, tales como Patente de EE.UU. 4,922,651. Además, se conocen varios procedimientos de almacenamiento del polen. Por ejemplo, la Patente de EE.UU. 5.596.838, que cubre un procedimiento e instrumento para la preparación de polen para su almacenamiento 15 criogénico, enseña que el polen puede almacenarse durante períodos de meses y seguir siendo viable. Aunque se conocen algunos procedimientos de entrega de polen, estos procedimientos no enseñan, sugieren o motivan al usuario a entregar intencionalmente el polen de tal manera que se elimine la necesidad de aislamiento y/o esterilidad masculina que siempre es necesaria en la técnica actual para apoyar la utilización en la investigación de campo a gran escala o la producción de semillas híbridas comerciales. La invención actual proporciona un procedimiento de selección de una 20 ventana de tiempo diaria durante la cual las plantas parentales femeninas designadas de trigo, cebada, soja o arroz están listas para la polinización cruzada objetivo con polen designado de plantas masculinas y, por lo tanto, son adecuadas para la producción de semillas híbridas de interés, y esto es particularmente útil en el contexto de informar a los usuarios de un momento optimizado al determinar cuándo realizar un procedimiento que da lugar a polinizaciones 25 que se producen fuera del período activo en el que la planta podría estar sujeta a autopolinización y/o estar expuesta a otra polinización indeseable, y por lo tanto no requiere el uso de esterilidad masculina o aislamiento, aunque uno o ambos pueden ser empleados sin apartarse del alcance de la invención. Además, en algunas plantas, tales como el trigo, el polen masculino no viaja lo suficientemente lejos como para producir híbridos de forma eficaz (Loureiro, I. et al. (2007) Euphytica 156: 25-37; Dong, S. et al.. (2016) PLoS ONE 11(3): e0151373. doi:10.1371/journal.pone.0151373). La presente invención remedia este problema en la industria proporcionando un procedimiento de 30 selección de una ventana diaria de tiempo durante la cual la polinización intencional se puede realizar de manera óptima en la que el polen se entrega efectivamente a la planta madre femenina.

Como se ha discutido anteriormente, la invención actual de seleccionar una ventana de tiempo diaria durante la cual las plantas parentales femeninas designadas de trigo, cebada, soja o arroz están listas para la polinización cruzada objetivo con polen de planta masculina designada y por lo tanto adecuadas para la producción de semillas híbridas de interés, es aplicable en el contexto de la práctica común de plantar semillas parentales femeninas que germinarán y se convertirán en plantas portadoras de semillas que darán lugar a la semilla híbrida que se venderá finalmente a los agricultores u otros clientes, o para producir semillas para su uso en programas de investigación. Sin embargo, en lugar de plantar la semilla parental masculina muy cerca de las plantas femeninas, como es el caso de las prácticas actuales, esta invención de seleccionar una ventana de tiempo diaria durante la cual las plantas parentales femeninas 35 designadas de trigo, cebada, soja o arroz están listas para la polinización cruzada con polen de planta masculina designada y, por lo tanto, son adecuadas para la producción de semillas híbridas de interés, también es útil en el contexto de la aplicación de los resultados del procedimiento reivindicado para determinar específicamente cuándo aplicar intencionadamente polen masculino a las plantas femeninas. El uso del término "intencionado" con respecto a la aplicación de polen significa la aplicación específica de polen de una forma que no incluye la polinización natural 40 por el viento, la actividad de los insectos u otras condiciones que se dan de forma natural. El polen aplicado intencionadamente es el que se ha aplicado a una planta como resultado de una actividad, decisión o intervención humana deliberada, y puede aplicarse a mano o por otros medios. Un ejemplo de aplicación intencionada de polen es la aplicación "prescriptiva" de polen, que es el uso de polen para abordar una necesidad o condición específica en el campo. En todos los aspectos de la invención, el polen puede obtenerse de una o múltiples fuentes genéticas.

45 50 La adquisición del polen masculino [a veces "polen<sup>M</sup>"] necesario para hacer la semilla híbrida, puede ser a través de un banco de polen. Un banco de polen es una fuente de polen almacenado que ha sido recogido de una o más fuentes de polen y almacenado de tal manera que el polen conserva su viabilidad. Las plantas que se han utilizado como fuente de polen para dicho banco de polen pueden haber sido cultivadas y cosechadas en cualquier condición, incluyendo pero no limitándose a, un campo, una cámara de crecimiento, un invernadero, un invernadero de cristal, una casa de sombra, una casa de aro, una instalación de cultivo vertical o una instalación hidropónica. El polen de un banco de polen puede proceder de diferentes fuentes. Por ejemplo, en una realización, se puede cosechar polen fresco de machos cultivados en un entorno controlado en el que el ritmo circadiano se adelanta entre 2 y 8 horas al de las plantas hembra que crecen de forma natural en el campo. Este procedimiento se detalla más adelante. En otra realización, el polen que se almacena en el banco puede ser polen conservado que se recogió días, semanas, meses 55 o años antes de su eventual retirada del banco con fines polinizadores. El polen conservado puede haberse conservado por cualquier medio que permita que el polen conserve su viabilidad, incluidas, entre otras, varias formas de refrigeración o congelación, tales como el enfriamiento, la crioconservación, la liofilización o el almacenamiento en nitrógeno líquido.

En una o más realizaciones, el polen puede cosecharse de un estudio de anteras. El estudio de las anteras permite unas condiciones de crecimiento óptimas para los tejidos reproductores masculinos de cualquier especie o variedad de planta. Los tejidos se cortan de plantas que crecen en condiciones estándar al aire libre, tal como en el campo, o de las que crecen en condiciones controladas, como el invernadero o una cámara de crecimiento. Los tejidos se cortan preferentemente antes de que la planta comience a desprender polen y se colocan en el estudio de anteras. A continuación, el tejido puede cultivarse en un medio nutritivo que permita un mayor crecimiento. En el estudio de anteras se pueden alternar cíclicamente al menos una iluminación especializada, la temperatura y/o la humedad, lo que permite el crecimiento continuo del tejido. El crecimiento puede modularse para aumentar o disminuir el ritmo de crecimiento y modular así la duración de la disponibilidad de polen. Esto permite disponer de polen a demanda para polinizaciones que pueden realizarse en cualquier momento del día o de la noche. Esto tiene utilidad para la polinización que permite varios procesos beneficiosos y valiosos relacionados con la producción de semillas y granos. También proporciona fuentes concentradas de polen para su conservación. El polen recogido del estudio de las anteras y conservado podría utilizarse de la misma manera que el polen recién recogido, pero con una duración muy posterior a la muerte del polen fresco, que no ha sido conservado. (R.I. Greysen (1994) Cultivo de inflorescencias de maíz, p. 712-714. En: M. Freeling, V. Walbot (eds), *The Maize Handbook*; Springer-Verlag, Nueva York; J.B. Schoper, R.J. Lamber, B.L. Vasilas, y M.E. Westgate (1987) Plant factors controlling seed set in maize. The influence of silk, pollen, and ear-leaf water status and tassel heat treatment at pollination, *Plant Physiol.* 83: 121-125)

La entrega del polen<sup>M</sup>, que puede ser por medios mecánicos, presión positiva, presión negativa, neumática, medios, o de otro modo, se produce tan pronto como las hembras son receptivas al polen, que es siempre anterior a que el polen del progenitor femenino designado [a veces polen<sup>F</sup>] sea viable en un día determinado, permitiendo así la selección de una ventana de tiempo durante la cual puede producirse una polinización cruzada exitosa con todas las hembras receptivas. En otras palabras, el componente femenino de la planta está abierto a recibir polen de un macho antes de que el componente masculino de la misma planta esté realmente preparado para producir polen. En el ejemplo de referencia del maíz, las hembras son receptivas al polen antes de la emergencia de las sedas y durante muchos días después de la emergencia de las hojas. Además, en el ejemplo de referencia del maíz, existen dos posibilidades: que el polen se desprenda antes de la aparición de la seda (protandria) o que la aparición de la seda sea anterior a la desprendimiento del polen (protoginia). En cualquier caso, una vez que las sedas son receptivas, serán receptivas al polen antes de que éste se desprenda en un día determinado. Esta invención es aplicable a ambas situaciones. Además, en algunos ejemplos, las sedas son receptivas al polen todo el día durante unos siete días. En consecuencia, el polen puede aplicarse intencionadamente cualquier número de veces, incluyendo pero no limitándose a, una vez al día, dos veces al día, o en una aplicación continua. Sin el uso de la esterilidad masculina, el polen<sup>F</sup> típicamente comenzará a desprenderse a media mañana, y continuará hasta última hora de la mañana o primera hora de la tarde, después de lo cual todo el polen<sup>F</sup> encuentra una hembra viable y germina, permitiendo una autopolinización exitosa, o muere en 60 minutos o menos si no aterriza en una hembra viable (Luna V. et al.). (2001) Crop Sci. 41(5): 1551-1557). De este modo, la planta hembra dispone de una ventana de tiempo diaria durante la cual el polen masculino puede ser entregado y durante la cual el polen<sup>F</sup> no se desprende. Esta ventana se repetirá durante varios días. Dado que la invención actual puede utilizarse para seleccionar una ventana diaria de tiempo durante la cual es posible polinizar cruzadamente casi todas las hembras viables, siendo ésta una ventana de tiempo durante la cual el polen<sup>F</sup> no se desprende o no es viable, no se requiere la esterilidad masculina para evitar la autopolinización de las semillas.

En consecuencia, un aspecto de la invención es la selección de una ventana de tiempo diaria durante la cual cronometrar la entrega intencionada de polen a las hembras progenitoras. En todos los cultivos, existe un ciclo diario durante la ventana de polinización (el tiempo durante el cual la hembra es receptiva al polen y durante el cual puede producirse una polinización con éxito) en el que las hembras maduran y crecen de forma relativamente continua, mientras que los machos tienen un ciclo distinto en el que el polen se hace viable y se desprende o se dehesa de las anteras que comienza a media mañana y termina a última hora de la mañana o a primera hora de la tarde. En algunos casos, el polen<sup>F</sup> puede volverse viable antes de que las hembras sean fértiles, pero siempre habrá una primera mañana en la que las hembras viables se vuelven fértiles antes de que el polen<sup>F</sup> viable comience a desprenderse ese día. Por lo tanto, el polen<sup>F</sup> que puede haberse desprendido el día anterior hace tiempo que ha muerto y se ha vuelto inviable antes de que las hembras sean viables a la mañana siguiente. Por lo tanto, las primeras horas de la mañana son ideales para la aplicación de polen<sup>M</sup> para polinizar fortuitamente todas las hembras viables justo antes de que el polen<sup>F</sup> comience a desprenderse, aunque se puede optar por aplicar polen varios días antes de que el polen<sup>F</sup> comience a desprenderse o en varios momentos del día o de forma continua para aumentar la probabilidad de crear con éxito semillas híbridas puras. En un ejemplo, el polen puede entregarse a las 6:00 a.m. Sin embargo, la entrega de polen puede ocurrir a cualquier hora del día, lo que proporciona una gran ventaja sobre los procedimientos tradicionales. Así, haciendo uso de la ventana de tiempo que es seleccionada por el procedimiento de la presente invención, con el fin de determinar cuándo es óptimo aplicar intencionadamente el polen de la planta macho designada, entonces cuando el polen<sup>F</sup> comienza a desprenderse, todas las hembras viables ya han sido polinizadas por la fuente de polen seleccionada y el polen<sup>F</sup> muere tras un corto periodo de tiempo sin encontrar hembras viables, evitando así la autopolinización de las hembras que ha necesitado alguna forma de esterilidad masculina en sistemas híbridos anteriores. Las distintas especies de polen tienen una vida útil diferente, que puede verse afectada además por las condiciones ambientales (Dafni, A. & D. Firmage (2000) Plant Systematics and Evolution 222(1): 113-132). Una mayor humedad y temperaturas más bajas pueden prolongar la longevidad del polen. Por ejemplo, en el arroz (*Oryza sativa*), se ha observado que la longevidad del polen es de tan sólo 4 minutos (Koga et al.). (1971) Cytologia 36: 104-110) o

hasta 20 minutos para que muera el 50% del polen (Khatum, S. y T.J. Flowers (1995) J. Exp. Bot. 46: 151-154). En cambio, se demostró que el polen de rábano (*Raphanus sativus*) cultivado en el campo tiene una vida útil de 5 días (Siddiqui, B.A.). (1983) Acta Bot. Ind. 11: 150-154).

Por lo tanto, la presente invención aprovecha el hecho de que una vez establecida la receptividad de la hembra al polen, los componentes femeninos de las plantas son generalmente receptivos al polen antes de que el polen se libere en un día dado, incluso en los casos en los que el polen se libera primero en general antes de que la hembra sea receptiva al polen. En la mayoría de las plantas, si no en todas, esto ocurre en un ritmo diario, tal como en el maíz, en el que los componentes femeninos son receptivos al polen y los masculinos no están listos hasta al menos después de que se seque el rocío diario, que en algunos ejemplos puede ser a las 10:00 a.m. o tan tarde como la 1:00 p.m. en un día nublado o lluvioso. Además, en algunos días de mal tiempo o de lluvia, los componentes masculinos pueden sufrir graves retrasos o no llegar a desprender polen. En muchos cultivos, como la soja, los componentes femeninos pueden estar listos un día antes que los masculinos. A menudo, la hembra está preparada antes que el macho en general y a diario. Por consiguiente, la polinización a primera hora de la mañana suele dar lugar a la polinización por el polen deseado. Además, tener la capacidad de polinizar en el mismo momento en que la hembra se vuelve receptiva por primera vez, independientemente de la hora del día, es una enorme ventaja con respecto a las prácticas actuales.

Por medio de la entrega de polen en el momento adecuado y durante la duración apropiada de la ventana de fertilidad de una planta, se puede lograr una pureza adecuada sin el uso de ninguna forma de esterilidad masculina en las plantas femeninas. Esta es la primera vez que se ha logrado seleccionar en cualquier cultivo, en el contexto de la producción comercial de semillas híbridas, un periodo de tiempo diario durante el cual las plantas madre femeninas de trigo, cebada, soja y arroz están listas para la polinización cruzada con polen de plantas masculinas y, por lo tanto, son adecuadas para la producción de semillas híbridas de interés, sin el uso de alguna forma de esterilidad masculina. Por lo tanto, este es un aspecto novedoso de la presente invención. Además, dado que varios cultivos, tales como la soja, no tienen una forma de esterilidad masculina que sea económicamente viable, esta invención permite la producción de semillas híbridas en especies en las que no ha sido posible (por ejemplo, la soja) o ha sido difícil (por ejemplo, el trigo). De la misma manera, esta invención permite la selección de una ventana diaria de tiempo, durante la cual las plantas progenitoras femeninas designadas de trigo, cebada, soja y arroz están listas para la polinización cruzada objetivo con polen designado de plantas masculinas y, por lo tanto, adecuadas para la producción de semillas híbridas de interés, por primera vez en el contexto de la producción eficaz de semillas híbridas sin el uso de aislamiento, físico o temporal, de fuentes biológicamente compatibles indeseables (polen<sup>U</sup>). Así, la presente invención proporciona una ventana diaria de tiempo, que puede ser tenida en cuenta por el usuario para determinar el momento de la polinización intencional con polen de planta macho designado, de tal manera que cuando el polen<sup>U</sup> comienza a desprenderse, el usuario sea capaz de asegurar que todas las hembras objetivo viables ya han sido polinizadas por la fuente de polen seleccionada y el polen<sup>U</sup> muera después de un corto período de tiempo (1-4 horas) dependiendo de la especie y de las condiciones ambientales, (Luna V. et al. (2001) Crop Sci. 41(5): 1551-1557; Stanley, R.G. & Linskens, H.F. (1974) Polen: Biología, Bioquímica, Gestión. Springer-Verlag, Heidelberg.; Shivanna, K.R.. (2003) Biología y biotecnología del polen. Science Publishers, Inc.) sin encontrar ninguna hembra objetivo viable, evitando así la polinización cruzada de hembras que ha necesitado alguna forma de aislamiento en sistemas híbridos anteriores.

La capacidad de suministrar polen viable a demanda para efectuar polinizaciones oportunas de sedas receptoras aborda una serie de limitaciones comunes a la producción de semillas híbridas y grano a escala de campo. Específicamente, el uso prescriptivo de la invención supera los bajos niveles de producción de polen, elimina la escasa sincronía reproductiva entre flores masculinas y femeninas, y disminuye el elevado gasto del aislamiento físico en la producción de semillas híbridas.

Las realizaciones de la invención incluyen una gama de opciones para abordar las técnicas de aislamiento tradicionales. Como se ha comentado anteriormente, las técnicas tradicionales de aislamiento pueden incluir el aislamiento físico. La gama de opciones que abordan el aislamiento físico puede incluir la eliminación completa del aislamiento del polen<sup>U</sup>, así como una reducción de las distancias de aislamiento necesarias para reducir la contaminación por polen<sup>U</sup>. Una distancia estándar que se utiliza para el aislamiento en la industria estadounidense de semillas híbridas de maíz para aislar un campo de producción de semillas híbridas, que contiene las líneas parentales masculinas y femeninas, de otro maíz es de 201 metros (660 pies) o más (Manual de requisitos de certificación de semillas de Iowa, Iowa Crop Improvement Association, 2009). Aunque esta distancia puede variar en base al estado, suele ser significativa para evitar la deriva del polen facilitada por el viento, así como la polinización facilitada por insectos. Por medio de la utilización de las técnicas de la invención desveladas en la presente memoria descriptiva, en combinación con la reducción o eliminación opcional de la distancia de aislamiento de los parentales de semillas híbridas, se puede lograr un continuo de mejoras incrementales de pureza genética. Por ejemplo, la combinación de los procedimientos de polinización descritos en la presente memoria descriptiva, que pueden llevarse a cabo teniendo en cuenta la ventana de tiempo diaria que se selecciona de acuerdo con la presente invención, con una reducción de las distancias de aislamiento daría como resultado un nivel de pureza genética mejorado de la semilla híbrida resultante. La distancia de aislamiento puede reducirse de 201 metros a 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5 o 1 metro de distancia de aislamiento, o la distancia de aislamiento puede eliminarse por completo, de forma que la planta parental híbrida se plante directamente junto a otras plantas que no sean el parental de cruce previsto. A medida que se reduce la distancia de aislamiento, existe un mayor potencial para un menor nivel de pureza, pero debido a la eficacia de las técnicas de polinización desveladas en la presente memoria descriptiva, los niveles de pureza alcanzados pueden seguir estando dentro de la norma requerida

para la producción y venta de semillas híbridas. El requisito tradicional de aislamiento físico de las fuentes de polen adventicio añade un gasto importante a la producción de semillas híbridas. La aplicación directa de polen de acuerdo con la invención a sedas receptivas en dosis suficientes para asegurar altos niveles de fertilización antes de la caída local de polen supera la necesidad de practicar el aislamiento del campo de semillas.

- 5 Además del aislamiento físico, el aislamiento temporal es una técnica que puede utilizarse para aislar a las hembras de la contaminación por polen<sup>U</sup>. El aislamiento temporal se produce cuando las hembras y los machos indeseables se siembran en momentos diferentes, de forma que las sedas femeninas y el polen<sup>U</sup> están disponibles en momentos diferentes. En un ejemplo no limitativo, las hembras y los machos pueden plantarse con un mes de diferencia. Esta 10 técnica se utiliza sobre todo en climas tropicales y subtropicales. Las realizaciones de la invención incluyen también una serie de opciones para abordar el aislamiento temporal. La gama de opciones que abordan el aislamiento temporal puede incluir la eliminación completa del aislamiento del polen<sup>U</sup>, así como una reducción de los tiempos de aislamiento o de las cantidades necesarias para reducir la contaminación por polen<sup>U</sup>. Debido a la eficacia de las técnicas de polinización desveladas en la presente memoria descriptiva, los niveles de pureza alcanzados pueden seguir estando dentro de la norma exigida para la producción y venta de semillas híbridas.
- 15 Una estrecha sincronía entre la antesis de las flores masculinas y femeninas, y una densidad mínima de polen por seda expuesta son requisitos fundamentales para altos niveles de producción de semillas y pureza genética. El polen previamente recogido y conservado, o el polen fresco, puede aplicarse a las sedas receptoras durante un período de siete a diez días, asegurando el cuajado de la semilla en condiciones de menor viabilidad del polen, de retraso de la 20 sedimentación en relación con el desprendimiento de polen, o de escaso "nick" entre razas endogámicas masculinas y femeninas. En la industria agronómica, "nick" es un término utilizado en la producción de semillas híbridas que se relaciona con la sincronía de los tipos de flores masculinas y femeninas (es decir, el pico de emisión de polen por parte del macho alineado con el pico de emergencia de la seda en la hembra) desarrollándose en el momento ideal para que los granos de polen polinicen con éxito, dando lugar a la fecundación. Para los productores de semillas, la "muesca" perfecta se produce cuando el 50% de la población masculina empieza a soltar polen el mismo día en que 25 el 50% de la población femenina empieza a desplegar sedas.

Un continuo similar de mejoras de pureza se aplica si las técnicas de polinización descritas en la presente memoria descriptiva, que se pueden realizar teniendo en cuenta la ventana de tiempo diaria que se selecciona de acuerdo con la presente invención se utilizan en tandem con una reducción de la cantidad de deshojado en un campo. Las prácticas estándar de desflorado exigen que no más del 1% de las borlas femeninas puedan desprender polen (Manual de 30 requisitos de certificación de semillas de Iowa, Iowa Crop Improvement Association, 2009). Para lograrlo, es posible que una cuadrilla de deshojadores tenga que pasar por un campo en 4 o 5 días consecutivos y a varios niveles de intensidad (velocidad a la que los deshojadores se mueven por el campo en cada pasada). Mediante el uso de las técnicas de la invención descritas en la presente memoria descriptiva, se pueden reducir los pases y/o la intensidad 35 del desflorado, permitiendo que se desprenda más del 1% de las borlas femeninas y obteniendo al mismo tiempo una pureza genética aceptable. El porcentaje de desprendimiento puede aumentarse del 1%, 2%, 3%, 4%, 5% al 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100%. En el caso del 100%, no sería necesario desgasificar.

Un continuo similar de mejoras de pureza se aplica si las técnicas de polinización descritas en la presente memoria descriptiva, que pueden realizarse teniendo en cuenta la ventana de tiempo diaria que se selecciona de acuerdo con la presente invención, se utilizan en tandem con una reducción del número de plantas macho que se requiere plantar para polinizar con éxito un campo de hembras para obtener el nivel necesario de pureza genética. En un campo típico de producción de semillas híbridas de maíz, la presencia de plantas parentales masculinas oscila entre el 20% y el 40% de las plantas del campo (Basra, A. S. (1999) Heterosis and Hybrid Seed Production in Agronomic Crops, p. 48). El porcentaje de plantas progenitoras macho necesario dependerá de una serie de factores, tales como el vigor y la 45 viabilidad previstos del polen de las plantas progenitoras macho, así como de factores relacionados con la zona y el clima concretos. La práctica de la presente invención permitirá reducir significativamente el porcentaje de plantas macho necesarias en un campo, o permitirá eliminarlas por completo. Por ejemplo, en lugar de necesitar un 40% de plantas progenitoras masculinas en un entorno de producción, podría utilizarse un porcentaje menor, tal como un 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% o incluso 0% de plantas progenitoras masculinas en el campo. La aplicación 50 prescriptiva de polen como se describe en la presente memoria descriptiva, que puede realizarse teniendo en cuenta la ventana de tiempo diaria que se selecciona de acuerdo con la invención, tiene el potencial de eliminar por completo al polinizador macho de un campo de semillas.

Además, un continuo similar de mejoras de pureza también puede aplicarse a cultivos en los que una o más plantas pueden autopolinizarse antes de que la planta florezca y sea capaz de recibir otras fuentes de polen. Un ejemplo no limitativo de este tipo de cultivo es el trigo. La presente invención puede ser ventajosa para dichos cultivos. Por ejemplo, puede aplicarse la esterilidad masculina limitada y/o el aislamiento. Además, las hembras podrían criarse para florecer antes o someterse a perturbaciones mecánicas o físicas para provocar la apertura de las flores. En algunas ocasiones, el polen también puede introducirse a la fuerza en una flor. Incluso en los casos en los que es inevitable que se produzca cierta autopolinización, puede producirse una polinización híbrida adecuada en las plantas en las que las flores se abren antes de la autopolinización. En tal caso, se mejora la pureza genética.

- 60 Los granos de polen son pequeños y pueden ser muy delicados. Su capacidad para polinizar con éxito a una hembra puede verse comprometida por una serie de tensiones ambientales, y también pueden ser cualidades inherentes

transmitidas por la planta que produce el polen. El rendimiento del polen (es decir, la velocidad de germinación, el vigor del crecimiento del tubo) puede denominarse vigor del polen, mientras que la capacidad del polen para engendrar con éxito semillas viables puede denominarse viabilidad del polen (Shivanna, KR et al.. (1991) Theor. Appl. Genet. 81(1):38-42). El vigor y la viabilidad del polen pueden variar significativamente entre especies, cultivares y variedades de plantas. En algunos casos, puede ser deseable practicar etapas de polinización intencional como las descritas en la presente memoria descriptiva, que pueden realizarse teniendo en cuenta la ventana de tiempo diaria que se selecciona de acuerdo con la invención, mediante el uso de un polen que típicamente tiene un vigor y/o viabilidad pobres. En tales circunstancias, aunque se espera que la práctica de la invención permita a los usuarios aumentar el rendimiento y mejorar la pureza, el porcentaje de mejora en cada una de estas características puede ser bajo en comparación con el uso de polen con mayor vigor o viabilidad. En consecuencia, existe un continuo de mejora tanto para la pureza como para el rendimiento que puede lograrse mediante la práctica de la presente invención que puede depender de una amplia gama de factores, incluyendo el vigor y la viabilidad del polen. En el caso de que las mejoras de pureza sean pequeñas, se pueden tomar medidas adicionales para mejorar los niveles de pureza como se describe más adelante en esta divulgación.

Como apreciará un experto en la técnica, la selección del polen de planta macho designado, tal como se define en la presente invención es un factor significativo en el beneficio potencial reconocido por la práctica de la invención. El vigor y la viabilidad del polen son factores a tener en cuenta, junto con los diversos rasgos y características que puede conferir el polen. Puede haber circunstancias en las que utilizar un polen con menor vigor o viabilidad siga siendo una buena elección debido a los rasgos que conferirá a la semilla resultante. En tales circunstancias, cuando se sabe que un polen tiene menor vigor o viabilidad, cabe esperar una disminución más moderada de la contaminación resultante, junto con un menor aumento potencial del rendimiento. Tales decisiones pueden ser tomadas por el cultivador basándose en las características particulares del cultivo, la semilla deseada y las condiciones existentes en el momento previsto de la polinización con respecto al medio ambiente y otras presiones bióticas y/o abióticas que afecten al cultivo. Por consiguiente, la capacidad de seleccionar el polen en el momento de la polinización es otro factor significativo del beneficio potencial reconocido por la práctica de la invención. En la Tabla 1, que figura a continuación, se describen algunas de las posibles ventajas de la invención.

**Tabla 1:** Ejemplos de ventajas de la selección de polen

Problema de producción	Aplicación de la invención	Beneficio previsto
Escasa producción de polen por el macho endogámico, no apto para la producción de semillas híbridas a escala de campo.	Utilización de polen fresco o conservado aplicado a las sedas receptivas a demanda, aumentando así la polinización.	Mayor potencial para utilizar las razas endocriadas macho de élite en el desarrollo de híbridos
Bajo nivel de producción de semillas en los campos de semillas parentales	Utilización de polen fresco o conservado aplicado a las sedas receptivas a demanda, aumentando así la polinización.	Mayor producción de semillas por las razas endocriadas macho y hembra de élite
La escasa sincronía reproductiva entre machos y hembras endocriados en la producción de semillas híbridas da lugar a una baja producción de semillas y a un nivel de contaminación genética superior al aceptable.	Utilización de polen fresco o conservado aplicado a las sedas receptivas a demanda, aumentando así la polinización.	Aumento de la producción de semillas por hectárea, disminución de la autopolinización de las razas endocriadas femeninas, disminución de los cruces externos de fuentes adventicias.
Alto coste de la producción de semillas híbridas debido al requisito de aislamiento físico de las fuentes de polen adventicio.	Utilización de polen fresco o conservado aplicado a las sedas receptivas a demanda, aumentando así la polinización.	La aplicación directa de polen a las sedas receptivas en dosis suficientes para garantizar una fertilización de hasta el 100% antes de la liberación local de polen evita la necesidad de practicar el aislamiento de los campos de siembra.
Efecto de endogamia de un monocultivo en el que la polinización se realiza por medio de una planta de idéntica composición genética, como la	Utilización de polen fresco o conservado aplicado a las sedas receptivas a demanda,	Aumento de la producción de semillas por hectárea, disminución de la autopolinización de las razas endocriadas femeninas, disminución de los cruces externos de fuentes adventicias.

autopolinización o la polinización entre hermanos.	aumentando así la polinización.	
--	---------------------------------	--

El siguiente ejemplo no limitativo proporciona un escenario potencial en el que puede practicarse la invención, y esboza los beneficios. La invención puede practicarse en el caso de un híbrido que consista en un macho de escasa dispersión que requiera un 35% o más de presencia de machos en un campo de producción de semillas híbridas mediante el uso de procedimientos convencionales, y que aun así resulte en una contaminación aceptable al límite (~5%). La invención podría permitir disminuir la presencia masculina a la mitad, hasta un 17% de presencia, disminuyendo al mismo tiempo la contaminación a un nivel aceptable (2-3%), y disminuyendo el coste de las mercancías vendidas. Alternativamente, si el macho es un desprendedor de polen por encima de la media, y el polen fue capturado y conservado en aumentos previos de los padres, la invención podría permitir la eliminación de los machos y la disminución de la intensidad de deshojado (y los costes) en un 50%, lo que resulta en una disminución del coste de los productos vendidos, manteniendo al mismo tiempo la contaminación a niveles iguales a la práctica convencional (2-3%), pero a niveles de contaminación dramáticamente más bajos que los mismos parámetros (50% de intensidad de deshojado, y sin presencia de machos) sin practicar la invención.

El polen<sup>M</sup> puede ser entregado de cualquier número de maneras, incluyendo, pero no limitado a, entrega manual, entrega manual con un pequeño dispositivo mecánico manual para dispersión semiautomatizada, mediante maquinaria impulsada por el campo que contiene maquinaria de dispersión de polen o mpor medio de dispersión totalmente automatizada por un aparato autopropulsado y/o guiado por el hombre, tal como un dron que tiene un dispositivo de dispersión de polen montado en él, en el que la dispersión de polen se realiza por medios automáticos, incluidos, entre otros, medios mecánicos, presión positiva, presión negativa o medios neumáticos. El uso de un dron sería especialmente novedoso y práctico en este procedimiento. Pequeños drones, que no necesitan estar regulados, para ser utilizados en el procedimiento, y que pueden ser guiados mediante el uso de coordenadas GPS para enfocar la dispersión del polen directamente sobre las plantas femeninas. Mediante el uso de cualquiera de estos procedimientos, los inventores han estimado que unos 140 gramos (5 onzas) de polen<sup>M</sup> suministrado fortuitamente durante 3-4 días consecutivos es suficiente para polinizar cruzadamente con éxito una hectárea (2.47 acres) de plantas parentales femeninas de maíz con la pureza adecuada para cumplir con las leyes estatales actuales de semillas en los EE.UU., como se ha descrito anteriormente en este documento, que generalmente requieren menos de o igual al 5% de contaminación (auto-polinización y semillas contaminantes sin-cruce combinadas) para que las semillas puedan ser certificadas y vendidas comercialmente. Esta estimación se basa en la literatura que proporciona el número de granos de polen de maíz por mg, y estimando aproximadamente de 3 a 5 granos o polen por seda, o menos, para una polinización exitosa (3-4 granos de polen por seda es comúnmente aceptado por los expertos en el arte de la polinización como la cantidad necesaria para asegurar una polinización exitosa (M.E. Westgate, J. Lizaso, W., Batchelor (2003) Quantitative relationships between pollen shed density and grain yield in maize, Crop Science 43. (2003): 934-942; M. Uribelarrea, J. Carcova, M.E.. Otegui, M. Westgate (2002) Pollen production, pollination dynamics, and kernel set in maize (Producción de polen, dinámica de la polinización y cuajado del grano en el maíz), Crop Science 42. (2002): 1910-1918).). Véase, por ejemplo, Porter (1981) Environ. Health Perspectives 37: 53-59; Miller (1982) En el maíz para la investigación biológica.. W.F. Sheridan (ed.), pp. 279-293. El momento de la entrega de polen, la cantidad de polen necesaria y el número de días de entrega de polen pueden ajustarse según sea necesario en función de las circunstancias que varían, tales como la variación en la cantidad de polen que producen los distintos progenitores femeninos y los patrones meteorológicos (es decir, la frecuencia o cantidad de lluvia, la velocidad y dirección del viento, etc.). Por ejemplo, el procedimiento puede ajustarse y personalizarse para cualquier conjunto de progenitores en función de la capacidad de producción de polen del macho y la hembra. Además, se prevé que la eficacia de estos procedimientos de suministro reducirá la cantidad de polen necesaria para la polinización de híbridos. Los inventores estiman que estos procedimientos más eficaces pueden utilizar, por término medio, 1/1000 o menos de la cantidad de polen producida actualmente para la producción de semillas híbridas. Las investigaciones de los inventores indican que el cuajado perfecto de los granos de maíz requiere unos 3.000 granos de polen por seda, tal y como se desprenden normalmente en el campo de las borlas del maíz. Los estudios de polinización manual y los estudios en campo abierto indicaron que alrededor de 3 a 4 granos de polen por seda aseguran el cuajado de los granos. (M.E. Westgate, J. Lizaso, W., Batchelor (2003) Quantitative relationships between pollen shed density and grain yield in maize, Crop Science 43. (2003): 934-942; M. Uribelarrea, J. Carcova, M.E.. Otegui, M. Westgate (2002) Pollen production, pollination dynamics, and kernel set in maize (Producción de polen, dinámica de la polinización y cuajado del grano en el maíz), Crop Science 42. (2002): 1910-1918). El resultado es una proporción de aproximadamente 1/1000<sup>o</sup> de la cantidad de polen que se necesita actualmente para la producción de semillas híbridas.

Por lo tanto, la práctica de la presente invención elimina simultáneamente la necesidad de que las plantas parentales masculinas estén presentes en proximidad a las plantas parentales femeninas, así como la necesidad de que cualquier forma de esterilidad masculina esté presente entre las plantas parentales femeninas. Además, un experto en la materia puede variar fácilmente de los ejemplos enumerados anteriormente según sea necesario, siempre que la ventana de tiempo diaria que se seleccione: i. sea anterior a la parte del día durante la cual el polen no deseado comienza a desprenderse, por ejemplo durante la mañana temprano o media mañana y/o por la noche; ii. sea anterior a la parte del día tras la cual se seca el rocío diario; y/o iii. sea en el mismo momento en el que los componentes femeninos de

las partes de la planta designadas se vuelven receptivos por primera vez para recibir polen. Por ejemplo, en algunas situaciones, puede ser ventajoso polinizar por la noche. En otros, puede ser ventajoso polinizar durante todo el día. Se prevé que cualquier liberación de polen programada para que se produzca antes del desprendimiento natural de polen de las hembras progenitoras será eficaz.

- 5 Esta invención puede operar en cualquier planta de cultivo de trigo, cebada, soja o arroz para permitir al usuario seleccionar una ventana de tiempo en la que se puede actuar para mejorar o permitir la producción de semillas híbridas. Puede funcionar en cualquier entorno, incluidos, entre otros, los entornos de cultivo ideales u objetivo, los entornos fuera de temporada o los entornos controlados (por ejemplo, invernaderos de sombra/vidrio/verde/casas aro, cámaras de crecimiento, instalaciones de cultivo vertical, instalaciones hidropónicas, instalaciones aeropónicas, etc.).
- 10 El polen<sup>M</sup> puede aplicarse tan pronto como las hembras sean viables e independientemente de la viabilidad del polen<sup>F</sup> u otro polen indeseable, siempre que todas las hembras viables actuales sean polinizadas cruzadamente durante un período en el que el polen<sup>F</sup> u otro polen de fuentes indeseables no esté desprendiéndose activamente. Esta invención también se puede utilizar para permitir al usuario seleccionar una ventana de tiempo en la que se pueden tomar medidas para mejorar las prácticas actuales de producción de semillas, incluso cuando todos los componentes convencionales están presentes, mejorando así los niveles de pureza de las semillas híbridas en situaciones de producción difíciles aunque se emplee la esterilidad masculina y/o el aislamiento y/o las plantas macho. Esta invención podría aplicarse en campos de aumento de progenitores, es decir, campos en los que se plantan semillas endogámicas de un genotipo específico y se deja que se autopolinicen. El conjunto de semillas resultante de esta autopolinización da lugar a cantidades mucho mayores de semillas endogámicas, que se utilizarán como fuente parental para fabricar híbridos más adelante. El uso de la invención para seleccionar una ventana de tiempo diaria en el contexto de campos de aumento de progenitores femeninos estériles evita la necesidad de que haya líneas de aislamiento o mantenedoras (similares a las líneas citoplasmáticas de esterilidad masculina, pero que tienen polen viable y producen semillas normales). Del mismo modo, la invención puede aplicarse para seleccionar una ventana de tiempo diaria en el contexto de los campos de producción normal de los padres para mejorar la pureza de la semilla resultante. Esta invención también podría aplicarse en entornos de investigación para seleccionar una ventana de tiempo diaria en la que se pueda actuar para eliminar la necesidad de embolsar diariamente los brotes para evitar la contaminación cruzada o para evitar el deshoje en bloques de cruce aislados (para crear semillas híbridas experimentales en pequeñas cantidades).
- 15 En los casos en los que se requieren niveles de pureza muy altos, o en los casos en los que no se espera que la pureza sea tan alta como se desea, se pueden tomar medidas adicionales para purificar lotes de semillas híbridas a cualquier nivel deseado de semillas autocontaminadas y contaminadas cruzadamente que se encuentran en una mezcla de semillas que se ha cosechado de cualquier bloque de producción híbrido, incluyendo sistemas híbridos convencionales en cualquier cultivo. Del mismo modo, puesto que puede seleccionarse una ventana de tiempo diaria de acuerdo con la invención descrita en la presente memoria descriptiva, en la que pueden tomarse medidas para ejecutar la producción de semillas híbridas de interés (dicha producción de semillas no forma parte de la invención que se reivindica en la actualidad) a distintos niveles de competencia, pueden utilizarse etapas adicionales para purificar los lotes de semillas a cualquier nivel de pureza deseado (de nuevo, para evitar dudas, dichas etapas adicionales no forman parte de la invención que se reivindica en la actualidad, que se relaciona con la selección de una ventana de tiempo diaria). Por ejemplo, el empleo de un marcador genético en la línea parental masculina que se transmite en el polen<sup>M</sup> y se exprese en la semilla resultante como un fenotipo distinto y distinguible permitiría una mayor purificación del lote de semillas mediante clasificación. En la publicación internacional WO 2014/147005 se dan a conocer ejemplos de un procedimiento de este tipo. Además, las técnicas de esta naturaleza se utilizan normalmente en la industria del maíz de semilla blanca, en la que el maíz blanco y el amarillo pueden clasificarse fácilmente con clasificadoras de semillas automatizadas. El marcador genético puede conferir un fenotipo que se distinga por el color de la semilla, la intensidad o el patrón del color de la semilla, la forma de la semilla, el tamaño de la semilla, la densidad de la semilla u otras características de la semilla. Una empresa de semillas podría emplear su propio marcador específico a diferencia de otras empresas, tales como rasgos distintivos de semillas autóctonas o marcadores de color modificados genéticamente que serían potencialmente invisibles a simple vista. A continuación, las semillas pueden clasificarse visual o mecánicamente en función del fenotipo marcador. Véase, por ejemplo, Raboy et al. (2000) Plant Physiol. 124: 355-368; Evans, M.M.S. & Kermicle, J.L. (2001) Genética 159: 303-315; Jenkins, M.T. (1925) J. Heredity 16: 307-310; y Chase, S. (1949) Genetics 34: 328-332). En algunos cultivos de los países en desarrollo, en los que la mano de obra es muy barata, esto podría hacerse manualmente, mientras que en otras situaciones sería más económico disponer de un clasificador de semillas automatizado o semiautomatizado, como un clasificador de semillas Satake, por ejemplo, o un sistema de escaneado óptico capaz de escanear y clasificar las semillas.
- 20 En el maíz, por ejemplo, el rasgo nativo plúmula púrpura (PP) (Chase (1949) Genetics 34: 328-332) puede utilizarse como marcador fenotípico masculino que se cría en todas las endogamias masculinas y se hereda a través del polen<sup>M</sup>, con un clasificador de semillas automatizado como procedimiento de clasificación. La invención puede proceder como se ha descrito anteriormente, pero con el polen designado de la planta macho incluyendo un marcador que podría utilizarse para medir el nivel resultante de pureza híbrida. En los ejemplos que utilizan maíz, que no forman parte de la invención, después de la cosecha, un ensayo rápido de una submuestra de semillas podría determinar si la semilla de PP tiene una pureza lo suficientemente alta como para evitar una selección de semillas para aumentar la pureza. Si no alcanza el nivel prescrito, las semillas se pasarán por un clasificador automático de semillas, por ejemplo, para separar las semillas PP, que representan las semillas híbridas, de las semillas de embriones incoloros, que representan
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60

las semillas de contaminación autopolinizadas y alógamas. Esto puede hacerse en línea con los procesos normales de acondicionamiento en una planta de producción de semillas. Además, la semilla embrionaria no híbrida e incolora podría venderse como grano o desecharse.

Ejemplos de marcadores que pueden utilizarse en soja incluyen, pero no se limitan a, cotiledones verdes y amarillos.

5 Los marcadores transgénicos no específicos de cultivo incluyen, entre otros, genes marcadores de color (tales como DsRed2) o cualquier transgén que altere cualquier fenotipo normal de la semilla, tal como los transgenes que aumentan la antocianina u otros pigmentos en una parte de la semilla o los transgenes que alteran el color de los cotiledones. Pueden encontrarse más ejemplos de tales marcadores en la Publicación Internacional WO 2014/147005.

10 El uso añadido de la etapa de clasificación por medio de un marcador es más apropiado y económico cuando se consiguen resultados de pureza híbrida que son significativamente mejores que los que se obtendrían por medio de procedimientos convencionales sin esterilidad masculina y/o con un aislamiento inferior al estándar, pero no alcanzan niveles de pureza suficientemente altos para la venta comercial. Por ejemplo, se estima, basándose en los datos del inventor, que la contaminación (procedente principalmente de la autopolinización femenina) en un lote de semillas híbridas para la producción de maíz sin el uso habitual de la esterilidad masculina o el aislamiento sería superior al

15 70%, mientras que los niveles de contaminación para un lote de semillas cultivadas mediante el uso de las técnicas de la presente invención, también sin esterilidad masculina o aislamiento, reducirían la contaminación a la mitad o más, a un 35% de contaminación o menos. Aunque una contaminación del 35% no es tan baja como la que se requeriría para algunos cultivos, tales como el maíz, para los cultivos actuales no híbridos, tales como la soja, podría ser adecuada para empezar a producir el cultivo como híbrido. Por ejemplo, en un procedimiento anterior relativo a la

20 soja, se alcanzó aproximadamente un 70% de pureza en los cruces manuales para desarrollar cruces de reproducción. En el maíz, también hay pruebas de campo de una menor contaminación por polen adventicio en niveles de rendimiento más altos (Astini, J.P. et al.). (2009) *Agronomy J.* 101: 373-380). Normalmente, las semillas no híbridas que se seleccionan en cualquiera de las fases de selección se venden como grano. Sería posible clasificar las semillas

25 no híbridas en dos categorías: una para grano (outcrossings y otros contaminantes no autógamos) y una segunda parte (autógamos) que podría venderse como variedad autógama, proporcionando un subproducto de valor añadido del proceso de clasificación.

Como apreciará un experto en la materia, un beneficio añadido resultante de la práctica de la presente invención es permitir al usuario seleccionar una ventana de tiempo en la que se puede actuar para obtener un mayor rendimiento de semillas. La aplicación deliberada e intencionada de polen a la planta madre hembra fértil dará lugar a un aumento

30 de los eventos de polinización en comparación con las polinizaciones que se producen de forma natural. Dependiendo del polen<sup>M</sup> seleccionado para su uso en la práctica de la invención, esto puede permitir al usuario seleccionar una ventana de tiempo en la que se pueden tomar medidas para lograr tasas de polinización que se incrementan considerablemente y, como resultado, para lograr un rendimiento que será significativamente mayor de lo que se lograría de otro modo. Por término medio, los inventores esperan que se produzca un aumento del rendimiento de al

35 menos el 15%, cuando se actúe en una ventana de tiempo seleccionada como resultado de la práctica de la invención. Dependiendo del estado de las plantas madre femeninas, de la elección del polen utilizado, de las condiciones medioambientales y de otros factores, se esperan aumentos de rendimiento significativamente superiores al 10%, incluyendo aumentos de rendimiento superiores al 100% en algunas circunstancias, en comparación con el rendimiento esperado sin practicar el procedimiento de la invención.

40 Los siguientes ejemplos ilustran la presente invención con más detalle y son ilustrativos de cómo los procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva podrían implementarse en maíz de la especie de referencia. El procedimiento básico podría aplicarse a cualquier cultivo con modificaciones específicas del cultivo según proceda. Los ejemplos 1 a 4 se produjeron en campos del centro de Iowa durante el verano de 2015.

### **Ejemplo 1**

45 La invención en la presente memoria descriptiva se practicó mediante el uso de un híbrido de maíz dulce que era homocigótico recesivo para un gen que causa un fenotipo de grano arrugado en la madurez (el locus encogido o azucarado(Jennings, P.H. y C.L. McCombs, (1969) *Fitoquímica* 8(8): 1357-1363) y homocigoto recesivo para el loci *amarillo* que da lugar a endospermo blanco (Buckner, B. et al.. (1990) *The Plant Cell*, Vol 2, 867-876). Este híbrido de maíz dulce se utilizó como hembra y se cultivó en dos hileras de 36,5 metros (120 pies) sin aislarlo de las plantas

50 normales de maíz de grano básico (granos de endospermo amarillo) y no se volvió androestéril (es decir, no se deshojó). Los machos que presentaban el endospermo blanco y no arrugado característico estaban presentes en diez hileras de 4,5 metros (15 pies) que se cultivaban, de media, a 6 metros (20 pies) de las hileras de maíz dulce hembra. La invención se practicó coaccionando el polen de las borlas de los machos de endospermo blanco (polen<sup>M</sup>) en la parte más temprana del periodo natural de desprendimiento de polen, aproximadamente a las 8:30 de la mañana. El polen se recogió embolsando las borlas y recogiendo el polen en las bolsas. A continuación, el polen<sup>M</sup> se dirigió

55 inmediatamente a las sedas hembras de maíz dulce mediante técnicas bien conocidas en la técnica que consisten en golpear suavemente la bolsa de polen para liberar los granos de polen sobre las sedas. Con este procedimiento, los granos arrugados representan granos contaminantes autopolinizados, los granos amarillos representan granos contaminantes de cruces externos y los granos blancos representan el cruce F1 previsto. Con este procedimiento se generó un total de 30.821 núcleos. Varias hembras de maíz dulce no tuvieron polen<sup>M</sup> dirigido hacia ellas y se les

permitió polinizar abiertamente. De estas mazorcas de polinización abierta se generó un total de 28.896 granos, que se utilizaron como control.

La Tabla 2 muestra que hubo una disminución de los contaminantes totales procedentes tanto de la autocontaminación como de la contaminación cruzada del 18%. La disminución de la contaminación fue menor de lo esperado, pero aún así representa una mejora sustancial de los niveles de pureza. Tras la reflexión, el análisis y un examen más detallado de este ejemplo, se hizo evidente que había varios factores que limitaban el sistema para lograr una contaminación aún menor. El maíz dulce utilizado en este ejemplo se utilizó por conveniencia porque proporcionaba un marcador fácil para identificar contaminantes, pero tenía borlas muy grandes, con 5-10x o más polen que un progenitor hembra medio de un híbrido. El efecto de esta gran cantidad de polen puede apreciarse fácilmente por el alto porcentaje de autopolinizaciones en las mazorcas de polinización abierta que sirvieron de control, que fue del 93% en este ejemplo y del 96% en el ejemplo 2 siguiente. En el caso de las hembras de maíz de grano normal, esta cifra se situaría entre el 50% y el 80% con prácticas de cultivo similares. En el ejemplo 4, mediante el uso de una hembra de grano blanco, el porcentaje de autofecundación fue sólo del 78%. Otro factor que afecta al resultado de este ejemplo es que no intentamos aplicar plenamente la invención polinizando mucho antes de que las hembras empezaran a soltar polen. Simplemente intentamos aplicar la invención realizando las polinizaciones dirigidas al principio del desprendimiento natural de polen para intentar superar a los contaminantes. Este enfoque pretendía simplemente mostrar el potencial de la invención mediante el uso de sólo una implementación parcial. Por último, otro factor que limitó la disminución de contaminantes fue que el polen del maíz blanco procedía de variedades endogámicas, y se ha demostrado que es menos competitivo en comparación con el polen híbrido (es decir, el polen del maíz dulce). A la luz de estos factores, una disminución del 18% de contaminantes es una mejora razonable de los niveles de pureza.

**Tabla 2.** Disminución de la contaminación por autopolinización y contaminación por cruzamiento de la hembra parental de maíz dulce blanco cuando se utilizan machos blancos con la invención en la presente memoria descriptiva.

Tipo de polinización	De polinización abierta		Invención a la carta	
	Control *	% del total	Maíz dulce blanco sobre blanco	% del total
	-----# de granos-----			
Cruce F1 previsto (blanco)	539	2%	7242	23%
Contaminantes autógamos (marchitos)	26798	93%	22730	74%
Contaminantes cruzados (amarillo)	1532	5%	849	3%
Total:	28869		30821	
<b>Disminución de la contaminación a la carta</b>	<b>18%</b>			

Ejemplo 2. En otro ejemplo de trabajo, la invención en la presente memoria descriptiva se practicó mediante el uso de un híbrido de maíz dulce que era homocigótico recesivo para un gen que causa un fenotipo de grano arrugado en la madurez (el locus encogido o azucarado) y homocigótico recesivo para el loco *amarillo* que da lugar a endospermo blanco. Este híbrido de maíz dulce se utilizó como hembra y se cultivó en dos hileras de 69 metros (225 pies) sin aislarlo de las plantas normales de maíz de grano básico (endospermo amarillo) y no se volvió androestéril (es decir, no se deshoyó). Se utilizaron como machos las plantas de maíz de grano básico normal circundantes, que presentaban un endospermo de características normales (no arrugado) y estaban presentes en todas las hileras adyacentes a las hembras. Además, se roció agua sobre las borlas de las hileras femeninas hacia las 8:15 h de la mañana para retrasar el desprendimiento de polen de estas hileras femeninas hasta las 8:45 h aproximadamente. Después de pulverizar el agua sobre las borlas de las hembras, se practicó inmediatamente la invención coaccionando el polen<sup>M</sup> de las borlas de los machos de endospermo amarillo embolsando las borlas y recogiendo el polen en las bolsas. A continuación, el polen<sup>M</sup> se dirigió inmediatamente a las sedas hembras de maíz dulce mediante técnicas bien conocidas en la técnica que consisten en golpear suavemente la bolsa de polen para liberar los granos de polen sobre las sedas. Este paso se realizó antes de que estas hembras desprendieran polen. Con este procedimiento, los granos arrugados representan granos contaminantes autopolinizados y los granos amarillos representan el cruce F1 previsto. No hay ninguna medida de contaminación cruzada. Con este procedimiento se generaron un total de 34473 núcleos. Varias hembras de maíz dulce no tuvieron polen<sup>M</sup> dirigido hacia ellas y se les permitió polinizar abiertamente. De estas mazorcas de polinización abierta se generó un total de 4914 granos, que se utilizaron como control.

La Tabla 3 muestra que hubo una disminución de los contaminantes totales procedentes tanto de la autocontaminación como de la contaminación cruzada del 31%. Esta disminución de la contaminación es sustancial, sobre todo teniendo en cuenta el difícil prototipo que representa este ejemplo, ya que el desprendimiento de borlas y polen de las plantas

5

hembra designadas es inmenso (5-10 veces o más que el de un progenitor híbrido hembra normal). Estos resultados reflejan la aplicación de la invención tal como se describe en la presente memoria descriptiva, pero podría aplicarse un rigor aún mayor para mejorar aún más los resultados. Si se utilizó una fuente de polen preservado, las polinizaciones podrían haberse realizado a una hora más temprana de la mañana para dar al polen previsto más tiempo para crecer por las sedas y fecundar los óvulos de la hembra.

**Tabla 3.** Disminución de la contaminación por autopolinización del parental hembra de maíz dulce blanco al utilizar machos amarillos con la invención en la presente memoria descriptiva.

Tipo de polinización	De polinización abierta		Invención a la carta	
	Control *	% del total	Maíz amarillo sobre blanco	% del total
	-----# de granos-----			
Cruce F1 previsto (amarillo)	192	4%	12837	37%
Contaminantes autógamos (marchitos)	4722	96%	21636	63%
Contaminantes cruzados (sin diagnóstico)	0	0%	0	0%
Total:	4914		34473	
<b>Disminución de la contaminación a la carta</b>	<b>31%</b>			

10 Ejemplo 3. En este ejemplo, la invención se simuló mediante el uso de un progenitor femenino homocigótico cero y una mezcla de progenitores masculinos que contenían el alelo funcional o de tipo salvaje en el locus cero (Nelson, O.E.. (1968) Genética 60: 507-524).. El alelo cero es recesivo y cuando se encuentra en estado homocigótico, representando contaminantes de autopolinización, da un fenotipo opaco característico a los granos que es fácilmente reconocible a simple vista. Las hembras se cultivaron en tres hileras de 4,6 metros (15 pies) sin aislamiento y no se volvieron estériles masculinas (es decir, no se deshojaron). Los machos estaban presentes en las proximidades y adyacentes a todos los lados de las hileras de hembras. La invención se practicó embolsando las borlas de las plantas macho y coaccionando el polen<sup>M</sup> de los machos en la parte más temprana del periodo natural de desprendimiento de polen, aproximadamente a las 8:30 de la mañana, recogiéndolo así en las bolsas. A continuación, el polen<sup>M</sup> se dirigió inmediatamente a las sedas femeninas cerasas a mano mediante técnicas bien conocidas en la técnica que consisten en golpear suavemente la bolsa de polen para liberar los granos de polen sobre las sedas. En este ejemplo se obtuvieron 14 mazorcas, con un total de 3217 granos. La tabla 4 muestra los resultados de este ejemplo. Aunque no se incluyó un control directamente en este experimento, las expectativas a-priori de la literatura son que habría un mínimo del 50% de contaminación por autopolinización de la hembra sin utilizar el invento (Véase, por ejemplo, Patemiani E. & Stort, A.C.. (1974) Euphytica 23: 129-134; Ma, B.L. et al.. (2004) Crop Sci. 44: 1273-1282). Mediante el uso del control del ejemplo 4, se esperarían niveles de contaminación de alrededor del 78% sin utilizar la invención. En este ejemplo, la contaminación por autopolinización se redujo al 2%. Esto representa una reducción del 97% del nivel de contaminación por autopolinización. En este ejemplo, se habrían fabricado semillas híbridas que cumplen la norma del 95% de pureza.

**Tabla 4.** Disminución de la contaminación por autopolinización del parental hembra cero al utilizar machos de tipo salvaje con la invención en la presente memoria descriptiva.

Tipo de polinización	De polinización abierta		Invención a la carta	
	Control *	% del total	tipo salvaje en cera	% del total
	-----# de granos-----			
Cruce F1 previsto (vítreo)	1337	22%	3217	98%
Contaminantes autógamos (céreos)	4724	78%	66	2%
Contaminantes cruzados (sin diagnóstico)	ND	ND	ND	ND
Total:	6061		3283	
<b>Disminución de la contaminación a la carta</b>	<b>97%</b>			

\*Utilizó el control amarillo/blanco para el control ceroso. Las plantas cerasas autógamas controladas en las mismas hileras eran cerasas al 100%.

**Ejemplo 4.** La invención en la presente memoria descriptiva se simuló además mediante el uso de una hembra homocigótica de endospermo blanco [es decir, homocigótica recesiva en el loci *amarillo* (*y/y*)] parental y una mezcla de parentales masculinos que eran de endospermo amarillo. Las hembras se cultivaron en un campo de Iowa en el verano de 2015 en una hilera de 4,6 metros (15 pies) sin aislamiento y las plantas no se volvieron estériles para los machos (es decir, no se deshojaron). Los machos estaban presentes en las proximidades y adyacentes a todos los lados de las hileras de hembras. La invención se practicó embolsando las borlas de los machos y coaccionando el polen<sup>M</sup> de los machos en la parte más temprana del periodo natural de desprendimiento de polen, aproximadamente a las 8:30 de la mañana. A continuación, el polen<sup>M</sup> se dirigió inmediatamente a las sedas femeninas cerasas a mano mediante técnicas bien conocidas en la técnica que consisten en golpear suavemente la bolsa de polen para liberar los granos de polen sobre las sedas. En este ejemplo se obtuvieron 5 mazorcas, con un total de 888 granos. Había varias plantas dentro de esta hilera y en otras hileras cercanas con hembras de endospermo blanco a las que se permitió la polinización abierta y que se utilizaron como control, constituyendo un total de 6061 granos. La tabla 5 muestra que en este ejemplo se redujo la contaminación en un 79%. Este ejemplo sería un caso en el que se podría utilizar el marcador de color del endospermo para mejorar la pureza mediante la selección de los granos de endospermo blanco (es decir, las autopolinizaciones) para elevar la pureza al nivel estándar del 95%.

**Tabla 4.** Disminución de la contaminación por autopolinización del parental hembra de endospermo blanco al utilizar machos de endospermo amarillo con la invención en la presente memoria descriptiva.

Tipo de polinización	De polinización abierta		Invención a la carta	
	Control *	% del total	Amarillo sobre blanco	% del total
	-----# de granos-----			
Cruce F1 previsto (amarillo)	1337	22%	744	84%
Contaminantes autógamos (blanco)	4724	78%	144	16%
Contaminantes cruzados (sin diagnóstico)	ND	ND	ND	ND
Granos totales	6061		888	
<b>Disminución de la contaminación a la carta</b>	<b>79%</b>			

**Ejemplo 5.** Un bloque de producción de semillas híbridas de maíz se planta exactamente de la misma manera que se practica actualmente, excepto que las distancias de aislamiento se reducen en un 50% o más, el deshoje de las hembras progenitoras se practica a un nivel reducido para permitir que el 10% de las hembras tengan borlas de deshoje (en lugar del 1% estándar de borlas de deshoje), y el porcentaje de plantas macho se reduce en un 50% o más. El polen de los parentales masculinos se recoge y conserva y se obtiene de un almacén y se aplica a las sedas de los parentales femeninos a las 6 de la mañana.

Los resultados previstos son que la contaminación se reduciría en un 50% o más en comparación con las mismas prácticas de producción sin implementar la invención. Los parámetros de este ejemplo podrían aplicarse adecuadamente a los bloques de producción de semillas híbridas que utilizan un macho que libera una cantidad de polen media o ligeramente superior a la media, y una hembra que libera una cantidad de polen media.

**Ejemplo 6.** Un bloque de producción de semillas híbridas de maíz se planta exactamente de la misma manera que se practica actualmente, incluyendo la distancia de aislamiento estándar y las prácticas de deshojado estándar (para permitir que el 1% o menos de las hembras tengan una borla de desprendimiento) y para incluir el macho en el porcentaje estándar basado en la cantidad de polen que desprende el macho. Por ejemplo, supongamos que se determina que el macho es un macho "pobre" y desprende menos de 2 millones de granos de polen por borla. En este caso, algunos estándares de las empresas de semillas considerarían que este macho no es de calidad y lo descartarían, independientemente de lo productivos que puedan ser los híbridos que produce. Otras empresas de semillas podrían arriesgarse con este macho y plantarlo en una proporción elevada con respecto a la hembra en el bloque de producción de semillas híbridas.

En este ejemplo, el macho se planta en una proporción de 2:4 (2 filas de macho por cada 4 filas de hembra) con un borde de 10 filas de macho alrededor de todo el bloque de producción. La invención se practica mediante el uso de polen parental masculino que se ha recogido y conservado y se obtiene de un almacén y se aplica con precisión a las sedas parentales femeninas a las 6 de la mañana.

Los resultados previstos son que la contaminación se reduciría a niveles que cumplen las normas para la certificación y venta de semillas híbridas. En condiciones normales de producción, los campos de producción descritos en este ejemplo pueden presentar una contaminación media del 5% debido al macho pobre que se está utilizando. El intervalo en torno a esta media puede oscilar entre el 1% y el 8% de contaminación, dependiendo de las condiciones

5 ambientales de cada campo (por ejemplo, el viento y la proximidad de un campo de maíz vecino). Esto implica que la mitad de los campos de producción con este escenario producirían semillas híbridas de calidad inferior (<95% de pureza) que potencialmente tendrían que desecharse. Para los campos en los que se ha aplicado la invención, la disminución de la contaminación en un 50% implica que la contaminación media sería ahora del 2,5%, con un rango potencial del 0% al 5%. En este caso, con una distribución normal, cabría esperar que el 90-100% de los campos de

10 producción de este ejemplo produjeran semillas que cumplieran la norma del 95%.

Ejemplo 7. Un campo de producción de semillas de maíz parental es un campo aislado (201 metros (660 pies) o más) que contiene sólo un parental de un híbrido dado. Al parental se le permite la polinización abierta, o esencialmente la autopolinización, para aumentar su semilla de modo que haya suficiente semilla parental para utilizar el parental en la producción de semillas híbridas. Se necesitan varias generaciones de aumentos de semillas parentales para producir suficientes semillas parentales para utilizarlas finalmente en un bloque de producción de semillas híbridas.

15 En este ejemplo de producción de semilla parental, no habría aislamiento de otros maíces potencialmente contaminantes. La invención se practica mediante el uso del polen de los parentales que se ha recogido y conservado y se obtiene de una instalación de almacenamiento y se aplica a las sedas de los parentales a las 6 de la mañana. Los resultados previstos son que la contaminación se reduciría en un 50% o más en comparación con las mismas prácticas de producción sin aplicar la invención. Los parámetros de este ejemplo podrían aplicarse cuando las distancias de aislamiento son imposibles de alcanzar y, sin embargo, es necesario aumentar un parental para fabricar semillas híbridas para un producto importante. Esta situación puede darse en lugares de cultivo de contraestación (por ejemplo, Hawái) cuando una empresa de semillas intenta aumentar un progenitor para la próxima temporada de cultivo.

20 25 **Sumario de ejemplos de trabajo.** Los ejemplos 1-4 ilustran cómo esta invención puede funcionar con distintos niveles de éxito dependiendo de las características masculinas del hombre y la mujer designados. En estos cuatro ejemplos, aunque se observó una disminución de la contaminación mediante el uso de una simulación de la invención o mediante el uso de la propia invención, habría sido ideal utilizar polen conservado que estuviera disponible a demanda para ilustrar la utilidad y el potencial de esta invención. Esto habría permitido la aplicación del polen a las sedas en un momento más ideal en el que podría evitar toda competencia con la nube de polen natural y tendría una ventaja tan grande creciendo hacia abajo de la seda objetivo, de tal manera que la probabilidad de que otro polen contaminante fertilizara a la hembra se reduciría en gran medida, disminuyendo así el porcentaje de contaminación a un nivel aún 30 más bajo que estos ejemplos.

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de selección de una ventana de tiempo diaria durante la cual las plantas parentales femeninas designadas están listas para la polinización cruzada con polen de planta masculina designada y, por lo tanto, son adecuadas para la producción de semillas híbridas de interés,
- 5 en el que las plantas parentales femeninas designadas se seleccionan del grupo que consiste en trigo, cebada, soja y arroz,
- en el que las plantas madre femeninas designadas se exponen a polen no deseado, siendo dicho polen no deseado:
  - a. polen de componentes masculinos de dichas plantas madre femeninas designadas, cuyo polen tiene el potencial de causar una autopolinización no deseada de las plantas madre femeninas designadas; y/o
- 10 b. polen de plantas no relacionadas de la misma especie transportado por el viento, los insectos y otros factores de la naturaleza, cuyo polen tiene el potencial de causar polinizaciones cruzadas no deseadas en relación con las polinizaciones cruzadas objetivo
- 15 el procedimiento comprende:
  - establecer que los componentes femeninos de las plantas madre femeninas designadas son receptivos para recibir polen; y
  - seleccionar la ventana de tiempo diaria con respecto a las plantas madre femeninas designadas, en la que la ventana de tiempo diaria seleccionada:
    - i. es antes de la parte del día durante la cual comienza a desprenderse el polen no deseado, por ejemplo durante la primera o la segunda parte de la mañana y/o por la noche;
    - ii. es anterior a la parte del día después de la cual se seca el rocío diario; y/o
    - iii. es en el mismo momento en que los componentes femeninos de las partes designadas de la planta se vuelven receptivos por primera vez para recibir polen.
- 20 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el polen designado de la planta macho se compone de uno o más de los siguientes:
  - a. polen fresco; y/o
  - b. polen conservado.
- 25 3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho polen de planta macho designado es polen fresco que ha sido cosechado de uno o más de un campo, una cámara de crecimiento, un invernadero, un invernadero de cristal, una casa de sombra, una casa de aro, una instalación de cultivo vertical o una instalación hidropónica.
- 30 4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho polen de planta macho designado es polen conservado que ha sido previamente recogido y conservado por enfriamiento, refrigeración, crioconservación, congelación, liofilización o almacenamiento en nitrógeno líquido.
- 35 5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el polen designado de la planta macho se ha recogido de uno o más de:
  - i. una fuente con ritmo circadiano alterado;
  - ii. una fuente con floración circadiana normal, pero en la que se retrasan los componentes masculinos de dichas plantas parentales femeninas designadas; y
  - iii. una fuente con floración circadiana normal en la que se permite que los componentes masculinos de las plantas parentales femeninas designadas se desprendan sin demora.
- 40 6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la madurez de los componentes masculinos de dichas plantas parentales femeninas seleccionadas se retrasa con un tratamiento.
7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho polen designado de planta macho se obtiene de una única fuente genética.
- 45 8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho polen designado de planta macho se obtiene de múltiples fuentes genéticas y se combina antes de su aplicación.

9. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que una pluralidad de dichas ventanas diarias identificadas se seleccionan en una pluralidad de días.
- 5 10. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que una ventana diaria seleccionada se produce después de que las plantas madre femeninas designadas sean receptivas para recibir polen y antes de que se desprenda polen no deseado.
- 10 11. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que una ventana diaria seleccionada se produce después tanto de la receptividad al polen como del desprendimiento de polen de la planta madre femenina designada, pero en un momento en el que no se está produciendo activamente un desprendimiento de polen no deseado.
12. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la ventana de tiempo diaria seleccionada es un tiempo durante el cual las plantas parentales femeninas designadas son receptivas para recibir polen y están listas para la polinización cruzada objetivo durante una ventana diaria que comienza a las 6:00 am.
13. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la ventana de tiempo diaria seleccionada es un tiempo durante el cual las plantas madre femeninas designadas son receptivas para recibir polen en un momento antes de que se seque el rocío diario, y antes de una hora seleccionada entre las 13:00 o las 10:00 horas.
- 15 14. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las plantas parentales femeninas designadas son androestériles.
15. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las plantas progenitoras femeninas designadas se cultivan en un campo, o en un entorno controlado, que está expuesto al polen no deseado.

## RENDIMIENTO PROMEDIO DEL MAÍZ EN ESTADOS UNIDOS

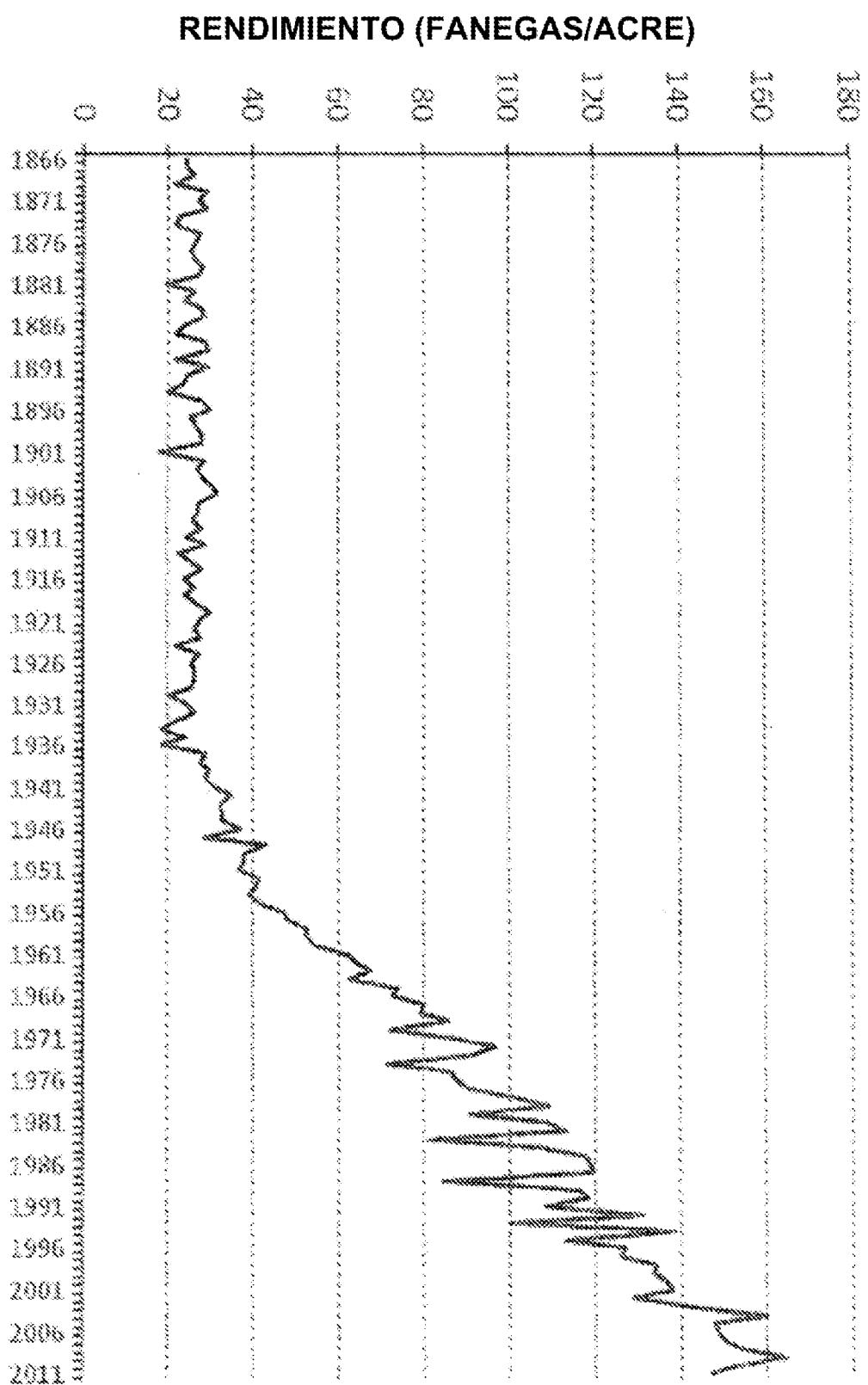


FIG. 1

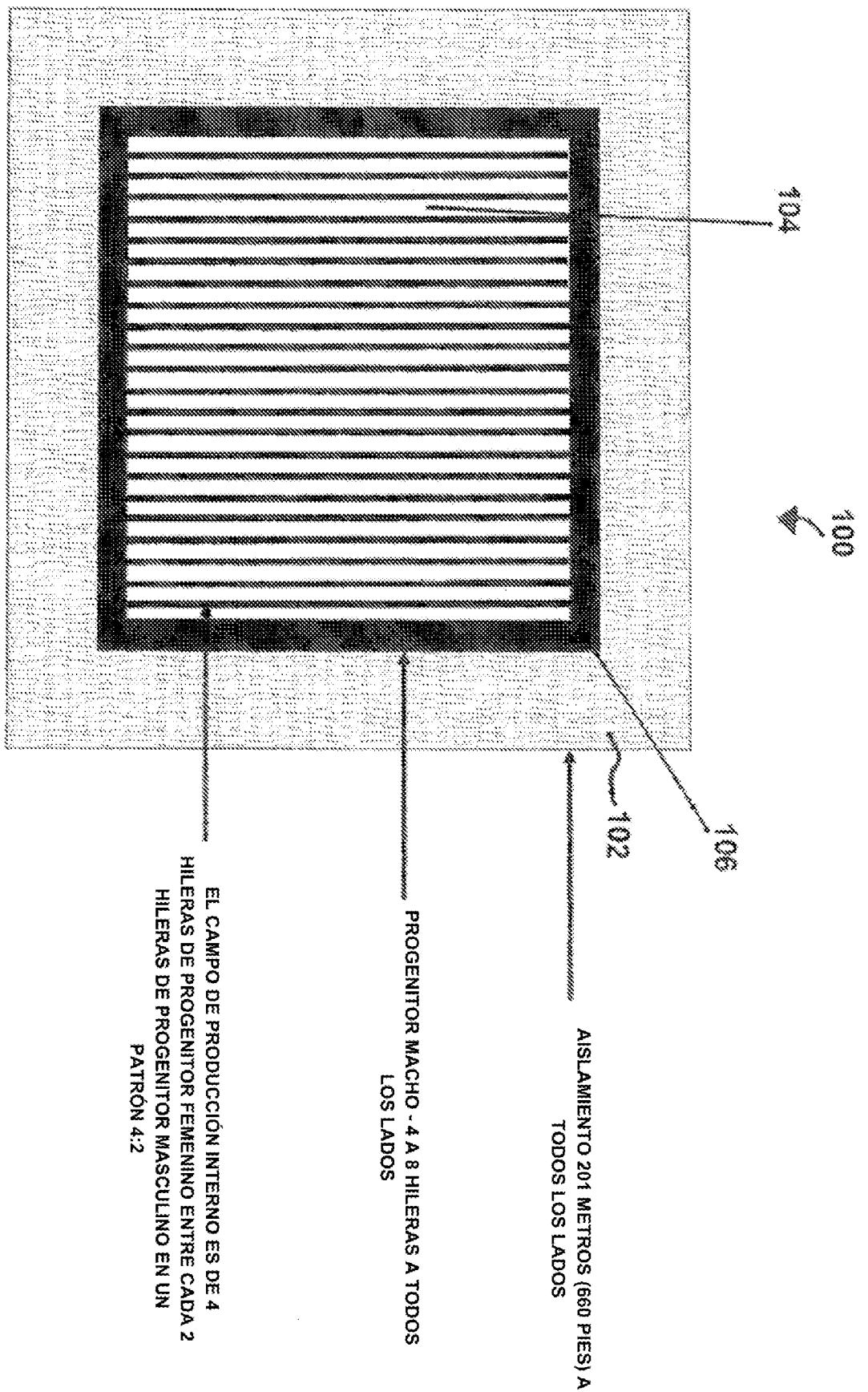


FIG. 2