

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 980 051**

51 Int. Cl.:

A01N 3/00 (2006.01)

A01H 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.07.2018 PCT/US2018/040997**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.01.2019 WO19010360**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2018 E 18746399 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2024 EP 3648595**

54 Título: **Procedimiento de conservación de polen**

30 Prioridad:

06.07.2017 US 201762529198 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.09.2024

73 Titular/es:

**ACCELERATED AG TECHNOLOGIES, LLC
(100.0%)
27253 US Highway 69
Ames, IA 50010, US**

72 Inventor/es:

**ETTER, SARA, KATHERINE;
VALVERDE, FEDERICO;
COPE, JASON y
KRONE, TODD**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 980 051 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de conservación de polen

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere en general a un procedimiento novedoso para aumentar la viabilidad y fertilidad general del polen y prevenir la necrosis del polen, lo que da como resultado un polen mejorado para su uso en plantas polinizadoras. La invención puede llevarse a cabo tanto con polen fresco como con polen previamente almacenado o conservado.

Antecedentes

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

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

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

40 Entre las primeras descripciones de la conservación del polen de maíz (Andronescu, Demetrius I., La fisiología del polen de Zea mays con especial atención a la vitalidad. Tesis doctoral Universidad de Illinois. 1915), se informó de que en ausencia de condiciones ambientales de almacenamiento controladas, el polen moría en dos a cuatro horas. Al aumentar la humedad relativa del ambiente de almacenamiento, se mantuvo la viabilidad del polen durante 48 horas. Además, el almacenamiento a baja temperatura (por ejemplo, 8-14°C) tuvo un efecto estimulante sobre la viabilidad del polen.

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

55 El acondicionamiento del polen de maíz en el campo a alta humedad y baja temperatura suele ayudar a revivir el polen de baja viabilidad y/o a prolongar su longevidad, con lo que se produce al menos una formación limitada de semillas tras la polinización de las mazorcas. Pero el efecto estimulante del almacenamiento a baja temperatura sobre la

fertilidad no siempre se observa (Walden, D.B., (1967) *Crop Science*, 7(5), pág.441-444) y si el polen se deshidrata hasta niveles excesivos, la formación de tubos polínicos en medios artificiales y sedas puede reducirse notablemente (Hoekstra, FA. (1986) En: *Membranas, metabolismo y organismos secos.* (Ed., AC Leopold), pág. 102-122, Comstock Publishing Associates, Ithaca, NY; Barnabas, B. y Fridvalsky, L., (1984) *Acta Bot Hung* 30:329-332).

5 Aunque la alta humedad y la baja temperatura ralentizan el deterioro temporal de la viabilidad durante el almacenamiento del polen de Gramineae, la optimización de estas condiciones ambientales para la conservación sólo pospone la pérdida completa de viabilidad y fertilidad. Se necesitan procedimientos adicionales a la regulación de la humedad y la temperatura para aumentar aún más la longevidad del polen almacenado, de modo que pueda utilizarse en la práctica comercial de la polinización suplementaria para mejorar la producción de semillas y cereales. Además, regular la humedad y la temperatura en aplicaciones a gran escala es tecnológicamente difícil y caro, por lo que enfoques más sencillos harían mucho más factible la polinización suplementaria.

10 En algunos casos, puede ser deseable tratar el polen para que se deshidrate en diversos grados. La deshidratación puede lograrse mediante el secado al vacío o la exposición del polen a una humedad relativa y una temperatura (es decir, un déficit de presión de vapor) que provoque la difusión del agua fuera del polen. Los déficits de presión de vapor favorables para el secado del polen pueden producirse de varias formas, como con desecantes, equipos mecánicos diseñados para controlar la temperatura y la humedad relativa en una cámara cerrada y con soluciones salinas saturadas mantenidas en un espacio cerrado (Jackson, M.A. y Payne, A.R. (2007) *Biocontrol Sci Techn*, 17(7), pág.709-719), Greenspan, L., (1977) *J Res Nat Bur Stand*, 81(1), pág.89-96)

15 En un esfuerzo por deshidratar y preservar el polen de caña de azúcar, el polen se almacenó a baja temperatura bajo vacío con una pequeña cantidad de desecante CaCl_2 presente (Sartoris, G.B. (1942) *Am J Bot*, pág.395-400). El polen permaneció seco durante todo el almacenamiento, como era de desear, pero el uso de baja presión no fue tan favorable como el almacenamiento a presión atmosférica normal. El comportamiento del polen de maíz fue muy similar al de la caña de azúcar. En intentos más directos de deshidratación se ha incubado el polen en condiciones de humedad relativa y temperatura establecidas o registradas. Estos ejemplos demuestran que el polen de maíz puede deshidratarse hasta niveles muy bajos (por ejemplo, 7-10% de contenido de agua en el polen) y seguir poseyendo una capacidad, aunque reducida, para efectuar la formación de semillas tras la polinización de las mazorcas (Bernabé, B., et al. (1988) *Euphytica*, 39(3), pág.221-225; Patente estadounidense 5.596.838).

20 La deshidratación del polen se realiza normalmente antes de la congelación para su almacenamiento y conservación a temperaturas muy bajas. Como se practica con el maíz, el polen fresco se deshidrata a temperatura ambiente en una cámara de vacío, incubadora de humedad, o simplemente con secado al aire o calor suave (Patente estadounidense 5.596.838; Barnabas, B. y Rajki, E. (1981). *Ann Bot*, 48(6), pág.861-864; Connor, K.F. y Towill, L.E. (1993) *Euphytica*, 68(1), pág.77-84). Tras la descongelación después de un almacenamiento a corto o largo plazo, el polen crioconservado puede ser viable y fértil, pero no siempre muestra fertilidad y algunos miembros de la familia Gramineae, como el maíz, el sorgo, la avena y el trigo, pueden ser difíciles de crioconservar (Collins, F.C., et al. (1973) *Crop Sci*, 13(4), pág.493-494). Una explicación ofrecida para este comportamiento recalcitrante es el exceso de secado o envejecimiento del polen (Collins, F.C., et al. (1973) *Crop Sci*, 13(4), pág.493-494). Es evidente que la calidad del polen puede verse afectada por las condiciones ambientales imperantes durante el desarrollo floral, la maduración del polen y la antesis (Shivanna, K.R., et al. (1991) *Theor Appl Genet* 81(1), pág.38-42; Schoper, J.B., et al. (1987) *Crop Sci*, 27(1), pág.27-31; Herrero, M.P. y Johnson, R.R. (1980) *Crop Sci*, 20(6), pág.796-800). El polen sometido a este tipo de estrés podría mostrar una menor propensión a resistir los rigores de la deshidratación y la congelación para la crioconservación. Existe la necesidad de superar este problema y hacer que la crioconservación del polen de Gramineae sea más asequible y rutinaria, de modo que esta forma de conservación del polen pueda aplicarse de manera predecible a escala comercial.

25 Se sabe que la desecación tiene un impacto directo en la viabilidad del polen. Bernabé (1985) *Ann Bot* 55:201-204 y Fonseca y Westgate (2005) *Field Crops Research* 94: 114-125 demostraron que el polen de maíz recién cosechado podía sobrevivir a una reducción del contenido original de agua de aproximadamente el 50%, pero pocos granos de polen demostraron viabilidad o capacidad para la formación normal de tubos polínicos con una pérdida adicional de agua por encima de ese nivel. Primeros trabajos de Barnabas y Rajki ((1976), *Euphytica* 25: 747-752) demostraron que el polen con un contenido reducido de agua conservaba su viabilidad cuando se almacenaba criogénicamente a -196°C . Trabajos posteriores (Barnabas & Rajki (1981) *Ann Bot* 48:861-864) demostraron que tales granos de polen de maíz parcialmente desecados almacenados a -76°C o -196°C también podían efectuar la fecundación de flores femeninas receptivas. Se conocen otros procedimientos para almacenar el polen durante periodos de tiempo variables, como la liofilización, el secado al vacío y el almacenamiento en disolventes orgánicos no polares. Las limitaciones en la escalabilidad de estas técnicas de conservación del polen, combinadas con los complejos requisitos de los equipos no portátiles, hacen que estas técnicas sean poco prácticas para su uso con grandes volúmenes de polen necesarios para aplicaciones a escala de campo. Por ejemplo, la capacidad de crear una cámara de vacío lo suficientemente grande para las conservaciones de polinización en el campo a nivel de producción habría requerido una cámara de vacío mucho mayor capaz de cambiar rápidamente los niveles de presión. Los campos de aumento de progenitores a nivel de producción suelen ser de un acre o más, mientras que los campos de producción de híbridos suelen tener un tamaño de 10 acres o más. Estos campos requieren una cantidad considerable de polen, por lo que se necesitaría una gran cámara de vacío. Una cámara de estas especificaciones requeriría la capacidad de bombear hasta una presión de 5 Torr (0,67 kPa) o menos, con la capacidad añadida de

subir y bajar rápidamente este nivel de presión. A medida que aumenta el volumen físico de la muestra, la capacidad de generar y ciclar a 5 Torr (0,67 kPa) de forma eficiente empieza a ir más allá de lo que pueden generar las bombas mecánicas. Además, el almacenamiento de polen en disolventes orgánicos crea requisitos químicos peligrosos.

5 La patente estadounidense 5.596.838 de Greaves, et al. divulga un procedimiento de almacenamiento de polen que implica una reducción del nivel de humedad mediante la exposición del polen a presiones atmosféricas reducidas antes del almacenamiento. Esta técnica preparaba pequeñas cantidades de polen, por ejemplo de una sola planta de maíz, para su posterior almacenamiento en condiciones bajo cero. Sin embargo, la metodología y los requisitos del sistema mecánico carecían de la capacidad de producir polen almacenado en cantidades lo suficientemente grandes como para permitir la producción comercial de semillas o aplicaciones de producción de grano. Estos requisitos anulaban de hecho cualquier oportunidad de hacer avanzar la tecnología más allá de las investigaciones a nivel de investigación. Otro Patente de Greaves et al., la patente estadounidense 6.141.904 establece que el polen puede colocarse en un material portador para aumentar la fluidez, como un polvo fluido. Además, Patente estadounidense nº 2.669.066 sugiere mezclar el polen con sustancias de alto contenido proteínico para su tratamiento y aplicación, como albúmina de huevo en polvo, caseína en polvo o leche en polvo en casos de almacenamiento a corto plazo.

15 El documento JP 2009 178083 A divulga una composición en polvo de dos partes para polinización en solución, por la que el polen se mezcla con otros agentes en el momento de la polinización para permitir una polinización en solución eficiente de un gran número de plantas durante un corto periodo de tiempo.

El documento CN 1 118 650 A describe un procedimiento de almacenamiento de polen que incluye la recogida de polen vivo y su colocación en condiciones de almacenamiento especificadas que incluyen la presencia de actinomicina como depresor respiratorio,^{DMSC4} como anticongelante y desecante de gel de sílice secado con^{CaCl2}.

La disponibilidad de polen preservado y viable supera muchos de los retos de producción a los que se enfrenta la industria de semillas híbridas. Con respecto a la producción de semillas híbridas, la disponibilidad de polen almacenado para su entrega a las flores femeninas puede eliminar muchas prácticas estándar y costosas de la producción de semillas, incluyendo, entre otras, la plantación de plantas masculinas separadas de las femeninas, pero próximas a ellas, para permitir la hibridación, el aislamiento de las plantas femeninas de fuentes de polen no deseadas y el uso de la esterilidad masculina genética o mecánica de las plantas femeninas. Estas prácticas aumentan drásticamente el espacio del campo y los recursos dedicados a las plantas femeninas que producen semillas o grano. La eliminación de cualquiera de estas prácticas tendría un impacto positivo inmediato en la producción de semillas por acre. Además, el polen almacenado puede aplicarse en cualquier momento. Cuando el desprendimiento de polen de las plantas macho y la receptividad de polen de las plantas hembra no coinciden según lo previsto (debido a la gestión, el entorno o la variación genética), la aplicación de polen conservado y viable garantiza la polinización de las plantas hembra en el momento óptimo. La polinización por fuentes externas (adventicias) no deseadas de polen o la autopolinización no deseada de plantas femeninas también puede reducirse o eliminarse aplicando polen almacenado del tipo deseado en el momento adecuado. Hoy en día, la genética de una semilla híbrida concreta viene determinada al principio de la temporada de cultivo por el genotipo de las plantas macho donadoras de polen y las plantas hembra receptoras de polen plantadas juntas en el campo. Sin embargo, utilizando las realizaciones de la presente divulgación, un productor de semillas híbridas que responda a oportunidades de mercado cambiantes puede decidir en el momento de la polinización utilizar un polen masculino diferente (es decir, una fuente genética) para la polinización con el fin de producir semillas híbridas más valiosas. Así pues, el polen almacenado puede utilizarse para aportar rasgos genéticos únicos o genes que mejoren las características de calidad de las semillas a las razas endogámicas femeninas altamente productivas. Por ejemplo, podrían suministrarse rasgos de resistencia a determinadas plagas de insectos presentes. Es importante destacar que las realizaciones de la presente divulgación también garantizan un alto nivel de pureza genética en la semilla híbrida. Por ello, los procedimientos para mejorar la viabilidad del polen y prolongar la duración de su viabilidad son de gran valor para la industria agrícola.

45 **Breve descripción de las figuras**

La figura comparativa 1 muestra una imagen de granos de polen en reposo en medios de crecimiento artificiales como se describe en el ejemplo comparativo 1. La imagen demuestra que el polen que se agrupa tiene una tasa de germinación global inferior en comparación con los granos de polen individuales que no están en contacto con otros granos de polen. Dos agrupaciones de polen están marcadas en la imagen dentro de recuadros. Obsérvese que estas agrupaciones no muestran un fuerte crecimiento del tubo polínico.

La figura comparativa 2 muestra el impacto que tiene el polen muerto o moribundo sobre el polen fresco descrito en el ejemplo comparativo 2. Se analizaron dos muestras de control, así como cuatro muestras que contenían polen que habían sido sometidas a tratamientos que provocarían la muerte del polen.

La figura comparativa 3 muestra el impacto del polen muerto sobre el polen fresco y el polen de cuatro días, tal como se describe en el ejemplo comparativo 3. La figura demuestra el impacto negativo que el polen muerto tiene sobre el polen vivo, provocando una rápida disminución de su viabilidad. La figura muestra que el polen muerto tiene un efecto más importante sobre el polen que ya ha empezado a deteriorarse.

La figura comparativa 4 muestra los datos recogidos del ejemplo comparativo 4. En el experimento se utilizó polen de maíz recogido en el campo y almacenado en carbón vegetal en partículas. El polen se mezcló con carbón vegetal en diversos porcentajes que variaban entre el 2,5 y el 75% de carbón vegetal. La figura

muestra los resultados de las pruebas de viabilidad y de contenido de humedad del polen (PMC) tras 1 y 6 días de almacenamiento.

La figura 5 muestra los datos recogidos en el ejemplo 5. El experimento midió la viabilidad del polen de maíz recogido en un invernadero y almacenado con diversos azúcares. El polen se mezcló en una proporción 1:1 con el medio azucarado para cada muestra. La figura muestra la viabilidad del polen después de 24 horas, 2, 5, 8 y 13 días. Sólo los experimentos con lactosa entran dentro del alcance de protección.

La figura comparativa 6 muestra los datos recogidos del ejemplo comparativo 6. El polen se almacenó en partículas de sílice de diferentes tamaños para determinar el efecto del tamaño de las partículas en el almacenamiento del polen y su viabilidad. Tras 24 horas de almacenamiento en las partículas de sílice, el polen se utilizó para realizar polinizaciones manuales. La figura muestra el conjunto de granos de cada muestra.

La figura 7 muestra los datos recogidos en el ejemplo de trabajo 7. En el experimento se utilizó polen de maíz mezclado recogido en una cámara de crecimiento. El polen se almacenó en diferentes medios, todos ellos con un 98% de lactosa y un 2% de una serie de sustancias diferentes destinadas a mejorar la fluidez. La figura muestra la viabilidad y el PMC del polen tras 3 días de almacenamiento.

La figura 8 muestra los datos recogidos en el ejemplo de trabajo 8. En el experimento se utilizó polen de maíz mezclado recogido en una cámara de crecimiento. El polen se almacenó en diferentes medios, todos ellos con un 98% de lactosa y un 2% de una serie de sustancias diferentes destinadas a mejorar la fluidez. Algunas muestras se sometieron a un periodo de desecación de 2 días y otras no. La figura muestra la viabilidad y el PMC del polen tras 2 y 6 días de almacenamiento.

La figura 9 muestra los datos recogidos en el ejemplo de trabajo 10. El experimento midió la viabilidad del polen de maíz almacenado con diferentes proporciones de un medio compuesto de lactosa y 4% de Aerosil®. A efectos comparativos, se utilizó una muestra de control sin mezclar. La figura muestra la viabilidad del polen en los días 0, 4, 6, 10, 12 y 17 durante el periodo de almacenamiento.

La figura 10 muestra los datos recogidos en el ejemplo 11. En el experimento se utilizó polen de anteras de trigo almacenadas, recogido tanto de polen post-emergente pero no desprendido, como de polen post-emergente y desprendido. Las anteras se almacenaron sin medio como control, con lactosa en polvo, o con una combinación de lactosa y Sipernat® 340. La figura muestra la viabilidad del polen tras 3 y 14 días de almacenamiento. Sólo los experimentos con lactosa entran dentro del alcance de protección.

La figura 11 muestra los datos recogidos en el ejemplo 12. En el experimento se utilizó polen de anteras de arroz almacenadas y agrupadas. Las anteras se almacenaron sin medio como control, con lactosa en polvo, o con una combinación de lactosa y Sipernat® 340. La figura muestra la viabilidad del polen de las anteras tras 4 y 10 días de almacenamiento. Sólo los experimentos con lactosa entran dentro del alcance de protección.

La figura comparativa 12 muestra los datos recogidos en el ejemplo comparativo 13. Se realizó un experimento de cuajado de granos utilizando polen que había sido almacenado con un compuesto separador con el fin de comparar el cuajado de granos de polinización abierta y un control de polen fresco. La figura muestra el número de granos resultantes de cada muestra.

La figura comparativa 13 muestra polen que había sido combinado con Sipernat® D17. La figura muestra el recubrimiento de las partículas sobre el polen, lo que dio lugar a una superficie resbaladiza, impidiendo así que las polinizaciones tuvieran éxito.

La figura comparativa 14 muestra el polen que se había combinado con caseína según el ejemplo comparativo 15. La figura demuestra que la caseína tiene un impacto negativo en la viabilidad del polen, resultando en una viabilidad escasa o nula cuando se almacena durante 20 horas a 4 grados Celsius.

La figura comparativa 15 muestra polen que había sido combinado con celulosa como se indica en el ejemplo comparativo 15. La figura demuestra que la celulosa tiene un impacto negativo en la viabilidad del polen, lo que se traduce en una disminución de la viabilidad cuando se almacena durante 20 horas a 4 grados Celsius.

La figura 16 muestra los datos recogidos en el ejemplo de trabajo 16. Concretamente, la figura muestra una buena viabilidad cuando se almacena el polen según los procedimientos de la presente invención. El polen de maíz se almacenó con una mezcla de lactosa y Sipernat 340 a 29,6 y 32,8 grados centígrados, lo que dio como resultado una buena viabilidad.

La figura comparativa 17 muestra los resultados del ejemplo comparativo 17. En concreto, la figura muestra que el almacenamiento de polen de maíz en aceite mineral Sonneborn® PD-23 dio como resultado una buena viabilidad del polen.

55 Sumario de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones, es decir:

Un procedimiento de conservación de una pluralidad de granos de polen que comprende:

mezclar dicha pluralidad de granos de polen con una sustancia que impida que el contenido de polen muerto interactúe con los granos de polen vivos; y

almacenar dicha pluralidad de granos de polen y dicha sustancia;

en el que el contenido de humedad del polen se mantiene entre el 15 y el 60%,

en el que dicha sustancia es lactosa.

Se proporciona un procedimiento de conservación de una pluralidad de granos de polen que comprende impedir que los contenidos de polen muerto interactúen con los granos de polen vivo, que incluye almacenar los granos de polen con lactosa, que impide que los contenidos de polen muerto interactúen con los granos de polen vivo. La sustancia es la lactosa. Además, la sustancia rodea al menos un grano de polen, por ejemplo reduciendo al mínimo el contacto superficie con superficie entre la pluralidad de granos de polen. El contenido de humedad del polen se mantiene entre el 15% y el 60%, por ejemplo entre el 35% y el 60%. Además, los granos de polen y la sustancia se mezclan, por ejemplo, mediante una mezcla continua. La proporción entre la sustancia y los granos de polen puede ser de al menos 3:1. Además, el tamaño de la sustancia puede variar entre un mínimo de diez veces menor que el tamaño de los granos de polen y un mínimo de diez veces mayor que el tamaño de los granos de polen. En algunas realizaciones, la sustancia puede incluir partículas de distintos tamaños. El procedimiento puede incluir polen recién recogido, almacenado o combinaciones de ambos. Además, el procedimiento puede incluir el acondicionamiento del polen en el campo.

También se describe, pero no forma parte de la invención, un procedimiento en el que los granos de polen se mezclan con una sustancia en la que la sustancia hace que los granos de polen tengan un contenido de humedad del 15-60%. En algunas realizaciones, el contenido de humedad del polen puede ser del 35-60%, por ejemplo del 45-55%. La sustancia puede ser hidrófila e impedir además que el contenido de polen muerto interactúe con los granos de polen vivos. Además, el procedimiento puede incluir la reducción del contenido de humedad del polen tras su recogida a menos del 60%.

Glosario

"Cámara" se utiliza aquí para referirse a un recinto adecuado para contener y almacenar polen.

"Contenido de polen muerto" se utiliza aquí para referirse a cualquier material relacionado con un grano de polen muerto o moribundo, incluyendo pero sin limitarse al grano de polen en sí y al material filtrado de un grano de polen muerto o moribundo.

"Planta hembra" se utiliza aquí para referirse a una planta que se utiliza como receptora de polen y que tiene flores receptoras que son fecundadas.

"Fértil" o "fertilidad" se utiliza aquí para describir la capacidad del polen de llevar los granos espermáticos al óvulo y efectuar así una doble fecundación. En las plantas con flores, el término "doble fecundación" se refiere a un grano espermático que se fusiona con los granos polares para producir los tejidos del endospermo, y el otro grano espermático que se fusiona con el grano del óvulo para producir el embrión.

"Fresco" cuando se aplica al polen significa polen liberado de las anteras de una flor que, en su patrón natural de crecimiento y desarrollo de órganos, libera polen al dehiscencia en respuesta a condiciones ambientales promotoras.

"Capacidad de germinación" se refiere a la capacidad del polen para germinar y formar un tubo polínico.

"Longevidad", cuando se aplica al polen, se utiliza para describir el tiempo que el polen permanece viable y fértil.

"Pérdida de viabilidad" es una característica del polen que significa que el nivel de viabilidad del polen ha descendido a un nivel inferior al requerido para iniciar con éxito el desarrollo de la semilla.

"Pérdida de fertilidad" es una característica del polen que significa que el nivel de fertilidad del polen ha descendido a un nivel inferior al requerido para iniciar con éxito el desarrollo de la semilla.

"Planta macho" significa una planta de la que se recoge polen para utilizarlo en polinizaciones.

"Conservación" significa cualquier almacenamiento de polen recolectado que dé lugar a un nivel de viabilidad, fertilidad, o ambos, que sea diferente del nivel de viabilidad, fertilidad, o ambos, que se produciría si el polen se mantuviera en condiciones no reguladas.

"Almacenamiento" significa cualquier período de contención del polen con la intención de utilizarlo en un momento y/o fecha posterior.

"Contacto de superficie a superficie" entre granos de polen significa el contacto de cualquier parte de la superficie de un grano de polen con la superficie de otro u otros granos de polen.

"Viable" o "viabilidad" se utiliza para describir el polen que es capaz de germinar y hacer crecer un tubo polínico con una longitud de al menos el doble del diámetro del grano de polen o el polen que se ha considerado viable mediante la demostración de que la naturaleza celular del material permanece íntegra y se considera que se mantiene intacta de forma que es posible el desarrollo de procesos celulares normales de metabolismo y funcionamiento intracelular. La viabilidad del polen puede evaluarse de numerosas maneras, incluyendo, pero sin limitarse a, la evaluación del crecimiento del tubo polínico en medios artificiales o estigmas o estilos extirpados, la evaluación de la integridad celular mediante tinción vital de numerosos tipos, la ausencia de fugas de electrolitos (por ejemplo, potasio) y la citometría de flujo de impedancia. La viabilidad puede referirse a un solo grano de polen o a una población de granos de polen.

Cuando se utiliza un valor porcentual para describir la viabilidad del polen, el valor se aplica normalmente a una población de polen.

"Ventana de viabilidad" se refiere al periodo de vida durante el cual el polen permanece viable cuando se expone a condiciones no reguladas.

5 "Vigor" se refiere al rendimiento del polen, como la velocidad de germinación y el crecimiento del tubo.

Descripción detallada

10 A continuación se describen detalladamente las formas de realización de la tecnología y los procedimientos de almacenamiento y/o conservación del polen que permiten mejorar y/o prolongar la viabilidad del polen recogido sometándolo a condiciones y técnicas de almacenamiento especializadas. El polen puede recogerse de plantas que estén mudando activamente o, alternativamente, el polen puede haberse recogido y almacenado previamente según otros procedimientos conocidos en la técnica ahora o en el futuro. Dichos procedimientos incluyen, por ejemplo, la congelación, la liofilización o el almacenamiento en nitrógeno líquido.

15 Según la divulgación, para preservar el polen con una viabilidad mejorada y/o ampliada, una pluralidad de granos de polen incluye contenidos de polen muerto y granos de polen vivo y se impide que los contenidos de polen muerto interactúen con los granos de polen vivo. La divulgación proporciona un aislamiento o separación parcial o total entre los granos de polen entre sí, así como del contenido de polen muerto. En muchos aspectos, el polen se mantiene de forma que se minimiza el contacto superficie con superficie entre los granos de polen individuales. Como se explica con más detalle en esta divulgación, cuando los granos de polen están en contacto con otros granos de polen, en particular durante un período de tiempo que sería típico para fines de almacenamiento, los granos de polen que están perdiendo o han perdido viabilidad afectan negativamente a la fertilidad y viabilidad de los granos de polen que, por lo demás, están sanos. Los ejemplos comparativos 1 a 3 que se presentan a continuación son ilustrativos de este concepto. En el ejemplo comparativo 1 y en la figura adjunta, se observa que el polen que se agrupa no suele ser viable. Además, los ejemplos comparativos 2 y 3 muestran que el polen muerto mezclado con polen fresco afecta negativamente al polen fresco, de forma que disminuye su viabilidad.

25 En consecuencia, los contenidos de polen muerto han demostrado ser agentes infecciosos que provocan la muerte de los granos de polen vivo más rápidamente de lo que lo harían si los granos de polen vivo estuvieran separados de los contenidos de polen muerto. Esto puede implicar una fuga o algún tipo de transferencia del contenido celular infeccioso fuera de los granos de polen muertos o moribundos. Por lo tanto, sin estar vinculados a una teoría en particular, los inventores han descubierto que cuando los granos de polen están en proceso de muerte o han muerto, es probable que se produzca una fuga del contenido polínico. Esta fuga interactúa con otros granos de polen y provoca también su muerte o pérdida de viabilidad. La presente divulgación pretende minimizar y/o prevenir dicha interacción. En consecuencia, la divulgación incluye separar el contenido de polen muerto de los granos de polen vivo. Dicho polen recolectado puede almacenarse durante cualquier periodo de tiempo, incluyendo pero no limitándose al tiempo suficiente para transferir el polen a una planta del mismo campo o de un campo vecino, minutos, horas, días, semanas, meses y/o años. El procedimiento divulgado utiliza sustancias para separar el contenido de polen muerto de los granos de polen vivo, evitando así la interacción entre el contenido de polen muerto y los granos de polen vivo. Dicha separación puede producirse mediante partículas sólidas o almacenamiento en el que los granos de polen estén aislados unos de otros, entre otros. En muchos aspectos, se impide o se limita el contacto de superficie a superficie entre los granos de polen y/o el contenido celular de los granos de polen. A efectos de la presente divulgación, el polen puede almacenarse en una cámara. La cámara puede variar en tamaño y material de construcción. La cámara puede ser de cualquier tamaño que sea adecuado para contener una cantidad de polen, y puede ser cualquier tipo de tubo, contenedor, cartucho, recipiente, recinto o espacio en el que se almacene el polen, en el que el espacio sirve de cámara para el almacenamiento de cantidades de polen. En algunos aspectos, la cámara también puede contener partículas sólidas, líquido y/o gas que minimiza el contacto superficie a superficie de las superficies de los granos de polen.

50 Es beneficioso, aunque no obligatorio, que la(s) sustancia(s) empleada(s) en el procedimiento de la presente divulgación cumpla(n) uno o más criterios además de separar el contenido de polen muerto de los granos de polen vivo. En primer lugar, puede ser beneficioso si la sustancia regula el contenido de humedad del polen. Como se explica con más detalle a continuación, algunas sustancias hidrófilas pueden lograr este objetivo. Además, la sustancia puede proporcionar una mayor fluidez cuando el polen se aplica a una planta hembra, como en el caso de la aplicación mecánica. También es deseable que la sustancia sea rentable para las operaciones a gran escala, que es una ventaja de las sustancias sólidas o partículas en general. Otra ventaja de las partículas sólidas es que son más fácilmente portátiles o transportables, lo que puede ser especialmente beneficioso cuando el procedimiento se va a realizar con polen tal como se recoge, como en un campo. También se prefiere que las sustancias no sean nocivas para la planta y/o el medio ambiente. Además, se prefiere que la sustancia no interactúe y/o se comunique con la planta hembra sobre la que se aplicará el polen, combinado con la sustancia en muchas realizaciones. Por ejemplo, puede ser beneficioso si la sustancia no interactúa con el estigma de la planta femenina. Del mismo modo, es beneficioso si la sustancia y los granos de polen se segregan después o inmediatamente antes de la aplicación, de forma que la sustancia no se una al polen y/o a la planta hembra, incluyendo pero no limitándose a los receptores de polen, para su aplicación a plantas hembra.

En las realizaciones que no forman parte de la invención en las que se utiliza un líquido para separar, y evitar así la interacción entre, los granos de polen entre sí y el contenido de polen muerto, pueden utilizarse soluciones isotónicas y/o soluciones oleosas. Preferiblemente, el líquido no reaccionará con los granos de polen. Además, en aspectos preferidos no incluidos en el alcance de protección, el líquido y el polen se agitarían para mejorar la separación de los granos de polen entre sí y de los contenidos de polen muerto. La agitación puede ser ocasional o continua y preferiblemente continua. Preferiblemente, los granos de polen en dicha solución no tendrán contacto prolongado con otros granos de polen y/o contenidos de polen muerto. Además, el polen puede estar esencialmente suspendido en el líquido. El ejemplo 17 ilustra el éxito del almacenamiento de polen en aceite mineral Sonneborn® PD-23.

Del mismo modo, en algunas realizaciones que no forman parte de la invención, puede utilizarse aire o gases (colectivamente "gas" o "gases") para separar los granos de polen entre sí y los contenidos de polen muerto, evitando así la interacción entre los contenidos de polen muerto y los granos de polen vivo. Preferiblemente, el gas fluye de forma que se agitan los granos de polen y se separan los granos de polen entre sí y del contenido de polen muerto. También puede utilizarse una agitación distinta del flujo de gas, como la agitación ocasional o continua. Preferiblemente, los granos de polen en una cámara con gas no tendrán contacto prolongado con otros granos de polen y/o contenido de polen muerto. El polen puede estar esencialmente suspendido en el gas.

En otra realización que no forma parte de la invención, la separación física y/o espacial del polen puede dar lugar a la separación de los granos de polen entre sí y/o de los contenidos de polen muerto, impidiendo así la interacción entre los contenidos de polen muerto y los granos de polen vivo. Por ejemplo, los granos de polen pueden almacenarse en capas de un solo grano en las que hay un espacio entre los granos de polen individuales. En algunos aspectos, la estructura de almacenamiento puede proporcionar una separación física entre los granos de polen y los contenidos de polen muerto y/o entre sí. En otras realizaciones que no forman parte de la invención, el gas de la cámara puede proporcionar la separación entre los granos de polen y el contenido de polen muerto y/o entre sí. En otros aspectos, las estructuras orgánicas o no orgánicas pueden separar el contenido de polen del contenido de polen muerto y/o de otros granos de polen. Por lo tanto, los granos de polen no están en contacto entre sí. Por supuesto, puede utilizarse cualquier tipo de separación física, conocida ahora o en el futuro.

Como se ha comentado anteriormente, los procedimientos aquí divulgados mejoran y/o amplían la viabilidad del polen. El polen viable puede germinar con éxito y suele poseer el vigor necesario para promover la fecundación y el inicio del desarrollo de la semilla. No todo el polen viable es también polen fértil. En algunos casos, incluso cuando un grano de polen es viable e inicia el crecimiento del tubo polínico, puede carecer del vigor necesario para alcanzar el óvulo y favorecer la fecundación. Los granos de polen no viables no pueden germinar con éxito. Por lo tanto, en algunos aspectos de la presente divulgación, el polen con buena viabilidad es deseable para su uso con los procedimientos de la presente divulgación. El nivel de viabilidad y fertilidad necesario para una polinización satisfactoria suele aceptarse o definirse en la técnica como una media de cuatro granos de polen fresco por seda, o de cuatro a ocho granos de polen conservado de acuerdo con los procedimientos de la presente divulgación.

Como se ha discutido anteriormente, muchas realizaciones de la presente invención requieren la recogida de polen o la adquisición de polen que ha sido previamente recogido. La recogida de polen para los fines de la invención puede llevarse a cabo por cualquier procedimiento y en cualquier lugar donde se cultiven plantas, como una cámara de crecimiento, un invernadero, un invernadero de cristal, una casa de sombra, una casa de aro, una instalación de cultivo vertical, una instalación hidropónica, o cualquier instalación de cultivo que proporcione borlas cultivadas, como se describe a continuación. El polen puede, opcionalmente, acondicionarse en el campo antes de su almacenamiento o conservación, por ejemplo según los procedimientos expuestos en la Solicitud de Patente de Estados Unidos nº 15/486.737 titulada Procedimiento de acondicionamiento y conservación del polen. El acondicionamiento del campo, si se utiliza, también puede llevarse a cabo utilizando otros procedimientos conocidos en la técnica, ahora o en el futuro. En algunas realizaciones, el acondicionamiento del campo puede tener lugar inmediatamente después de la recogida o en cualquier momento entre la recogida y el almacenamiento. Además, se prevé que el acondicionamiento del campo pueda incluir procedimientos de la presente invención.

La recogida de polen fresco puede realizarse de formas comúnmente conocidas en la técnica. Por ejemplo, el polen puede recogerse de flores recién desprendidas o de estructuras florales masculinas producidas de diversas maneras. En el caso del maíz, y de muchas otras especies, la planta es monoica y contiene inflorescencias masculinas y femeninas en una sola planta. En la práctica de la cría, la polinización, la polinización cruzada y la hibridación, algunas plantas actúan como la planta macho de la que se recoge el polen para utilizarlo en las polinizaciones, y algunas plantas actúan como la planta hembra receptora del polen. En el caso de la autopolinización, una sola planta actúa a la vez como planta masculina y como planta femenina, ya que las flores femeninas son fecundadas por el polen de sus propias flores masculinas. De forma similar a la autopolinización, la polinización por hermanos se produce cuando plantas de la misma genética (como una planta vecina del mismo campo) actúan a la vez como planta macho y planta hembra. A efectos de la presente divulgación, el término "autopolinización" incluye las polinizaciones entre hermanos, ya que en ambas situaciones interviene la misma genética. Siguiendo con el ejemplo del maíz, el polen se recoge de las flores masculinas recién desprendidas, que nacen de las borlas, que pueden estar unidas o separadas de la planta.

El polen de cualquier tipo de planta puede recogerse de plantas cultivadas en cualquier entorno adecuado para el crecimiento vegetal. Dichos entornos incluyen, entre otros, un campo, una cámara de crecimiento, un invernadero, un invernadero de cristal, un invernadero de sombra, un invernadero de aro, una instalación de cultivo vertical o una

instalación hidropónica. Alternativamente, el polen puede recogerse directamente de las anteras aplastándolas o triturándolas o dejando que sigan expulsando polen de forma natural a medida que la antera se seca, liberando así el polen y permitiendo su recogida. Además, puede recogerse polen de una instalación de cultivo de borlas (Pareddy DR, Greyson RI, Walden DB (1989) Producción de polen normal, germinable y viable a partir de espigas de maíz cultivadas *in vitro*. Theor Appl Genet 77:521 - 526.). Las borlas cultivadas pueden ser borlas maduras que se han extraído de plantas en cualquier tipo de instalación o entorno de cultivo, incluido un campo u otro tipo de instalaciones de cultivo, y se han introducido en agua en un entorno controlado para recoger polen, o bien las borlas cultivadas pueden ser tejido que se ha recogido de estructuras en floración en estadios inmaduros y luego se ha cultivado para que se convierta en una borla.

Alternativamente, las anteras pueden recogerse directamente, en lugar del polen. Las anteras pueden recolectarse antes de que el polen madure en la antera, durante el tiempo de maduración o cuando el polen está maduro y se libera. Las anteras enteras también pueden almacenarse para su uso posterior almacenándolas en las composiciones de la invención. El polen inmaduro, parcialmente maduro, próximo a la madurez pero que aún no se ha liberado, o el polen maduro dehiscente, puede liberarse de las anteras recolectadas por extracción, trituración, agitación, secado u otros procedimientos similares. En particular, la molienda es eficaz para el polen inmaduro porque la molienda de toda la antera junto con el polen inmaduro puede llevarse a cabo en la composición de la invención. Este proceso liberará automáticamente el polen en un entorno ideal en el que las superficies de cada grano de polen están limitadas en su capacidad de tocar otros granos. Además, las anteras pueden almacenarse empleando procedimientos de la presente invención, incluyendo pero no limitándose a, con separación sólida, líquida, gaseosa y/o física de los granos de polen para separar los contenidos de polen muerto de los granos de polen vivo.

Esta divulgación describe tanto los procedimientos para minimizar el contacto superficie-superficie entre los granos de polen, como las sustancias que se utilizan para minimizar el contacto superficie-superficie del polen con el fin de mejorar la viabilidad y la fertilidad. Esto puede incluir el cambio del polen de una sustancia a otra durante el almacenamiento. Además, puede utilizarse una combinación de sustancias, incluidas varias sustancias de un mismo estado (es decir, sólido, líquido y/o gaseoso), o varias sustancias de varios estados. Además, la sustancia puede renovarse o sustituirse con el tiempo, incluso con la misma sustancia o con una nueva. En consecuencia, esto puede incluir el cambio del polen de una sustancia a otra durante el almacenamiento. El término "líquido" aquí utilizado incluye los geles. Estos aspectos no están cubiertos por el alcance de protección.

Aspectos preferidos de la divulgación utilizan partículas sólidas para separar los granos de polen de los contenidos de polen muerto y/o entre sí, evitando así la interacción entre los contenidos de polen muerto y los granos de polen vivo. En muchos aspectos, las partículas sólidas minimizan el contacto de superficie a superficie entre los granos de polen. En el caso de las sustancias en partículas sólidas, es preferible determinar el tamaño de las partículas en relación con el tamaño de los granos de polen destinados a ser almacenados. Si las partículas sólidas son demasiado grandes, a veces pueden resultar ineficaces para evitar el contacto entre los granos de polen, ya que el polen puede acumularse en bolsas entre las partículas. Si las partículas sólidas son demasiado pequeñas, también pueden resultar ineficaces para separar los granos de polen y el contenido de polen muerto, ya que no proporcionan una separación suficiente. Las diferentes especies de polen vegetal pueden variar de tamaño, variando aproximadamente entre 6 y 100 μm de diámetro. Además, algunos granos de polen tienen superficies que no son perfectamente redondas, lo que se traduce en una mayor superficie. Por consiguiente, el uso de composiciones de partículas sólidas que contengan una gama de tamaños y/o formas de partículas permitirá su uso con polen de diferentes especies. Alternativamente, la experimentación rutinaria determinará fácilmente el tamaño ideal de las partículas sólidas basándose en el tamaño y la morfología de los granos de polen que se van a almacenar, como se muestra en los ejemplos 6 y 7. En un ejemplo, el tamaño de las partículas sólidas puede ser entre diez veces menor que el polen que se va a almacenar y diez veces mayor que el polen que se va a almacenar. Refiriéndonos al maíz como ejemplo, el tamaño preferido de la partícula puede ser de 20 micras.

Otra consideración es la proporción de sustancia sólida particulada con respecto a los granos de polen. Las altas proporciones de sustancia en relación con el polen tienden a aumentar la separación entre el contenido de polen muerto y los granos de polen vivo. Además, las proporciones más elevadas provocan la dilución del polen, lo que a veces resulta beneficioso para la aplicación del polen a las plantas femeninas. En algunos ejemplos de aspectos, la proporción puede ser de 1:1 a 1:100 de granos de polen a sustancia. En algunos ejemplos, se prefiere una proporción de 1:3 granos de polen por sustancia. Además, la proporción ideal puede depender del tiempo durante el que se almacenará el polen. A corto plazo, el coeficiente ha demostrado ser menos importante. Por otra parte, a medida que avanza el tiempo, la proporción se vuelve más importante para mantener la viabilidad del polen conservado. El ejemplo 10 demuestra una realización en la que una proporción de 3:1 de sustancia sólida particulada con respecto a los granos de polen supera a otras proporciones y describe además pruebas rutinarias que pueden utilizarse para encontrar proporciones ideales en cualquier tipo de polen. La proporción puede optimizarse para obtener beneficios que incluyen, entre otros, mejorar la duración del almacenamiento, desconcentrar el polen y/u optimizar la fluidez.

La naturaleza de cualquier composición de partículas sólidas utilizada para separar el contenido de polen muerto de los granos de polen vivo incluye partículas que no causan interacciones negativas con el polen. Las partículas sólidas son de naturaleza no reactiva, de modo que el polen no se ve afectado por ellas. Por ejemplo, la partícula sólida no debe eliminar demasiada humedad del polen porque éste moriría. La pérdida de humedad repercute en la viabilidad del polen, con una mayor pérdida de humedad que se traduce en una mayor pérdida de viabilidad y, finalmente, en la

muerte del grano de polen. Los ejemplos 8 y 9 muestran que el polen almacenado con desecantes incide negativamente en la viabilidad. Un ligero carácter hidrófilo puede ser beneficioso porque puede separar el contenido de polen muerto de los granos de polen vivos. Más concretamente, y sin estar vinculado a una teoría en particular, la experimentación ha demostrado que las sustancias que son ligeramente hidrófilas absorben el contenido del polen muerto que se escapa o se filtra del polen muerto y/o moribundo. Como las sustancias hidrófilas absorben este material, se separa de los granos de polen vivos. Además, los materiales ligeramente hidrófilos ayudan a regular el contenido de humedad del polen, que a menudo puede ser importante para la viabilidad del polen. Las sustancias ligeramente hidrófilas no suelen desecar el polen del mismo modo que las sustancias más hidrófilas. Las partículas hidrófobas pueden ser menos deseables porque pueden tener una tendencia natural a evitar el contacto físico con los granos de polen, lo que podría dar lugar a un gradiente entre el polen y la partícula. No obstante, algunas sustancias hidrófobas pueden ser beneficiosas. Concretamente, algunas sustancias hidrófobas pueden adherirse a la superficie de los granos de polen y recubrirlos, al menos parcialmente. Dicho recubrimiento puede dar lugar a la separación del contenido de polen muerto de los granos de polen vivos y/o a la separación entre los granos de polen vivos.

En consecuencia, el contenido de humedad del polen y la regulación del mismo es beneficioso en ciertas realizaciones de la invención. El procedimiento incluye un contenido de humedad del polen del 15-60%. Más concretamente, el contenido de humedad del polen puede ser del 40-58%. En otras realizaciones, el contenido de humedad del polen puede ser del 45-55%. En algunas realizaciones de la invención, se ha descubierto que el polen puede mantenerse a niveles de humedad más altos que los que se han considerado óptimos anteriormente en la técnica. En consecuencia, puede ser beneficioso si la sustancia utilizada puede permitir el mantenimiento de un mayor contenido de humedad del polen sin detrimento.

Las partículas sólidas de esta divulgación que pueden ser útiles incluyen, pero no se limitan a, partículas inorgánicas, partículas orgánicas, reguladores de la latencia, reguladores osmóticos, inhibidores y perturbadores de la respiración celular, inhibidores del transporte de electrones, desacopladores del transporte de electrones de membrana, estabilizadores y acondicionadores de membrana, estabilizadores y acondicionadores de la pared celular, reguladores del crecimiento, hormonas vegetales, crioprotectores, monosacáridos, disacáridos, polisacáridos, antifloculantes, agentes dispersantes, bentonita, almidón de patata, almidón de maíz, celulosa, arena, desecantes, agentes de flujo, aceite mineral, aceite de parafina, azúcares en líquido, azúcares secos, agua y carbón activado. Debe entenderse que la selección de las partículas sólidas a utilizar puede estar influida por el tipo de polen a almacenar. Por ejemplo, la selección puede basarse en el tamaño y/o la tolerancia del polen específico a determinadas interacciones y características. Una composición ideal puede incluir un único tipo de partícula sólida o una combinación de tipos de partículas que se eligen para maximizar la viabilidad y longevidad del polen. También puede contener una gama de tamaños de partículas para garantizar que tanto los granos de polen más grandes como los más pequeños se separen con la misma eficacia. La experimentación rutinaria puede llevarse a cabo de acuerdo con los ejemplos 4 y 5 para determinar la mejor partícula o mezcla de partículas para fines de almacenamiento.

Además, puede ser beneficioso añadir una sustancia que aumente la fluidez del polen almacenado, de manera que el polen pueda aplicarse fácilmente a las plantas en una fecha posterior. Dicho compuesto no debe provocar interacciones negativas entre otras partículas sólidas del medio de almacenamiento, ni entre los granos de polen. Ejemplos de compuestos que separan el contenido de polen muerto de los granos de polen vivo y también ayudan a la fluidez incluyen, pero no se limitan a, Sipernat® 50, Sipernat® 50S, Sipernat® 2200, Sipernat® 22, Sipernat® 22S, Sipernat® 340, Sipernat® 350, Perkasil® SM660, perlas de Jojoba, Aerosil® 200, Syloid® 244, tampones isotónicos, aceites y gases. Sólo el uso de lactosa entra dentro del alcance de protección.

En otro aspecto que no forma parte de la invención, la sustancia puede ser granos de polen vacíos. Concretamente, los granos de polen que se han lavado o vaciado de otro modo de su composición interna pueden utilizarse para separar el contenido de polen muerto de los granos de polen vivo, evitando así la interacción entre ambos.

El uso de líquido o gas para evitar el contacto de superficie a superficie entre los granos de polen también puede utilizarse para lograr los objetivos de la divulgación, pero no forma parte de la invención. En tales casos, se impide la interacción entre el contenido de polen muerto y los granos de polen vivos. En el caso de los gases, un flujo constante de gas a través de la cámara que contiene el polen suspende los granos y minimiza cualquier contacto que de otro modo se experimentaría debido a la falta de flujo. En el caso del almacenamiento de polen en líquido, los tampones que son isotónicos y no intercambian fácilmente fluidos a través de la membrana del polen sirven como un excelente medio de almacenamiento. Del mismo modo, las soluciones hidrófobas, como el aceite mineral, también minimizan el intercambio de fluidos a través de la membrana.

El polen puede someterse a pasos adicionales de conservación para aumentar su capacidad de retener la viabilidad y la fertilidad durante períodos de almacenamiento. La preparación del polen para su almacenamiento requiere un cuidadoso proceso que incluye un entorno con niveles conocidos de humedad relativa, así como unas condiciones específicas de temperatura y presión atmosférica. Por ejemplo, la temperatura puede ser de 1° C a unos 10° C. En algunas realizaciones, la humedad relativa puede ser del 50-100%. Además, la presión del aire puede ser de 15 kPa - 150 kPa. Además, la presencia de gases útiles ayudará a maximizar el éxito del almacenamiento. Los gases útiles pueden incluir, entre otros, nitrógeno, dióxido de carbono, óxido nitroso, oxígeno o una mezcla de estos gases.

Opcionalmente, durante el periodo de almacenamiento del polen, el polen contenido dentro de la cámara puede agitarse mecánicamente. La agitación puede ser ocasional o continua. En las realizaciones preferentes, la agitación es continua. La agitación sirve para exponer la máxima superficie del polen a los aditivos de la cámara, ya sean sólidos, líquidos o gaseosos, garantizando así una mezcla homogénea del polen con el aditivo, y evitando el contacto superficie con superficie de los granos de polen, la aglomeración del polen y la propagación de la necrosis en caso de que mueran algunos granos de polen. Los datos experimentales, en particular los ejemplos 2 y 3 siguientes, han demostrado que cuando las superficies de granos de polen vivos entran en contacto con las superficies de granos de polen moribundos o muertos, el polen vivo sufre un impacto negativo y posteriormente morirá. La agitación continua, regular y/u ocasional de los granos de polen en la composición, incluidos los granos de polen muertos o moribundos, puede conseguirse de varias maneras diferentes, incluido el uso de vibración, aire forzado, rotación, mezclado u otros medios.

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

La temperatura de la cámara que contiene el polen dentro de la composición puede mantenerse desde aproximadamente 1° C hasta aproximadamente 10° C, incluyendo aproximadamente 1° C, aproximadamente 2° C, aproximadamente 3° C, aproximadamente 4° C, aproximadamente 5° C, aproximadamente 6° C, aproximadamente 7° C, aproximadamente 8° C, aproximadamente 9° C y aproximadamente 10° C. Aunque a menudo son preferibles temperaturas más bajas, esta invención también tiene la capacidad de mantener y/o aumentar la viabilidad del polen a temperatura ambiente y/o alta temperatura, lo que hasta ahora ha sido desconocido en la técnica. En concreto, según Lyakh, et. al., Euphytica 55: 203-207, 1991 el calentamiento del polen maduro a 35 grados Celsius disminuyó la viabilidad de los granos de polen de maíz incluso con una exposición muy corta (3-5 minutos). No obstante, como se muestra en el ejemplo 16 a continuación, los procedimientos de la presente invención son capaces de mantener y/o aumentar la viabilidad del polen de maíz a temperaturas de hasta 32,8 grados Celsius con un éxito considerable. En consecuencia, los procedimientos de la presente invención pueden incluir polen almacenado a cualquier temperatura. En algunos ejemplos de realizaciones, los procedimientos de temperatura alta y/o ambiente pueden utilizarse convenientemente en el campo y para el transporte.

En ejemplos de realizaciones, el polen sometido al procedimiento divulgado puede utilizarse en cualquier aplicación en la que el polen sea una unidad comercial o experimental. En un ejemplo, el polen conservado puede utilizarse para producir semillas, híbridos, parentales o de otro tipo, en cualquier entorno, incluidos, entre otros, el laboratorio, el invernadero y el campo. En otro ejemplo, el polen puede utilizarse para producir grano, híbrido o no, en cualquier entorno, incluidos, entre otros, el laboratorio, el invernadero y el campo. Además, como se ha comentado anteriormente, dicho procedimiento puede aplicarse al polen de la familia de plantas Poaceae (Gramineae), así como a cualquier otra especie vegetal en la que se desee utilizar polen.

Las técnicas de preservación divulgadas en esta invención están destinadas a preservar con éxito el polen de tal manera que el polen preservado mantenga su viabilidad en la medida en que alrededor de 4 a alrededor de 20 granos de polen sean suficientes para polinizar con éxito un embrión.

Se pretende que toda la materia contenida en la descripción anterior o mostrada en los dibujos adjuntos se interprete únicamente como ilustrativa y no limitativa.

Los siguientes ejemplos ilustran la presente invención con más detalle y son ilustrativos de cómo la invención aquí descrita podría implementarse en el polen de varias especies.

Ejemplo comparativo 1

La experimentación ha demostrado una correlación entre la densidad del polen y su capacidad para formar con éxito un tubo polínico. Colocar el polen en un medio líquido artificial es una práctica habitual para medir la viabilidad de los granos de polen.

Dado que los medios de germinación líquidos artificiales desempeñan un papel clave en la determinación de la viabilidad del polen, se han realizado miles de ensayos para probar la viabilidad del polen almacenado durante el desarrollo de la invención de la presente divulgación. A lo largo de esta experimentación, se ha observado que el polen que se agrupa en el medio de germinación líquido artificial tiene una tasa de germinación global inferior en comparación con el polen que no está en contacto directo con otros granos de polen. La figura 1 muestra agrupaciones de granos de polen que no consiguen formar tubos. Esta observación ha impulsado el desarrollo de composiciones para el almacenamiento de polen que impiden que los granos de polen se toquen entre sí y que separan los granos de polen vivos del contenido de polen muerto y/o de otros granos de polen vivos, evitando así cualquier impacto negativo que pueda generar dicho contacto.

Ejemplo comparativo 2

Para evaluar el impacto negativo que el polen muerto o moribundo tiene sobre el polen fresco, se probaron varios procedimientos de producción de polen muerto para observar el impacto sobre el polen fresco. Cada lote de polen muerto se mezcló con muestras de polen recién recogidas.

5 Se recogió un lote de 20 mL de polen de maíz recién vertido y se dividió por igual en cinco tubos de centrifuga diferentes de 50 mL, de los cuales dos eran tubos de control. Las muestras de polen se sometieron a tres tratamientos diferentes que acabarían con el polen. La primera muestra se vertió en un tubo de ensayo de vidrio que se introdujo en un bloque calefactor a 95 °C durante 5 minutos. El aspecto carbonizado del polen hacía que pareciera carbonizado y se detectaba visualmente muy poco contenido de humedad en la muestra. Para el segundo tratamiento, se colocó polen recién
10 recogido en un tubo de ensayo de vidrio y se sometió a microondas durante 1 minuto. El microondas se utiliza frecuentemente como medio para crear un paso de destrucción en el citómetro de flujo Amphasys. Las microondas rompen la membrana celular y provocan el derrame del contenido citoplasmático, matando así al polen. Para el tercer tratamiento, el polen recién recogido se colocó en un tubo de ensayo de vidrio que se introdujo en un bloque calefactor a 95 °C durante 3 minutos. El polen tenía un aspecto semicarbonizado y la muestra estaba menos carbonizada que en el tratamiento carbonizado. Para un cuarto tratamiento, se utilizó una fuente diferente de polen. Este polen se había
15 recogido un mes antes y se había dejado secar completamente a 21 °C y 50% de humedad relativa durante un período de más de 30 días. Dado que el polen de maíz tiene una vida muy corta en tales condiciones, se esperaba que este polen estuviera completamente muerto.

20 Se realizó otra recolección de polen recién desprendido. El polen fresco se añadió en un volumen igual a cada una de las cuatro muestras de polen tratadas descritas anteriormente. Cada tubo se agitó para mezclar bien el contenido, se dejó reposar durante 10 minutos y luego se aplicó a las sedas aplicando el contenido del tubo sobre sedas frescas.

Las espigas polinizadas se dejaron madurar durante varias semanas y luego se cosecharon. Para cada tratamiento, se contó y registró el número de granos por espiga. En resumen, los datos de la Figura 2 muestran que, cuando se mezclan, el polen muerto resultante de los distintos tratamientos afecta drásticamente a la viabilidad del polen sano.

25 El polen tratado con microondas tuvo el mayor impacto en la viabilidad general del polen fresco, produciendo una media de algo más de 2 granos por espiga. El polen semicarbonizado fue el siguiente más bajo, seguido del polen seco antiguo. Por último, el polen carbonizado mostró el menor impacto, pero aun así una reducción muy grande de la viabilidad del polen. Es evidente que para mantener el polen fresco en un estado sano y viable es necesario mantener la separación entre los granos de polen y, en particular, evitar la interacción del polen sano con el polen
muerto o moribundo.

30 **Ejemplo comparativo 3**

Para evaluar mejor el impacto negativo que el polen muerto o moribundo tiene sobre el polen fresco, se realizaron varias pruebas para observar el impacto del polen muerto sobre el polen fresco, así como sobre el polen de 4 días. Cada lote de polen muerto se mezcló con muestras de polen recién recogidas.

35 El polen recién recogido y el polen de 4 días se dividieron en cuatro muestras de cada uno. A continuación, se añadió polen de maíz que se había dejado secar durante un periodo superior a 30 días (y que, por tanto, estaba muerto) a 3 de los 4 juegos de tubos. El primer tubo se utilizó como control y no se le añadió polen muerto. El segundo juego de tubos se mezcló con una proporción 75:25 de polen vivo y muerto. El tercer juego de tubos se mezcló con una proporción 50:50 de polen vivo y muerto. El cuarto juego de tubos se mezcló con una proporción 25:75 de polen vivo y muerto. Las puntuaciones de viabilidad se obtuvieron utilizando Amphasys a tiempo cero, 24 horas y 5 días. Estos
40 datos se muestran en la figura 3. Para dar a cada conjunto de datos la misma relatividad, las puntuaciones de viabilidad en el tiempo cero se normalizaron al 100% de viabilidad y la tasa esperada de pérdida de viabilidad del polen se trazó de forma lineal. Al cabo de 24 horas, las puntuaciones de viabilidad tomadas con Amphasys indicaban que, en cada proporción de mezcla, el polen muerto provocaba un decaimiento exponencial de la salud que superaba ampliamente la forma lineal. También se observó la tendencia de que cuanto mayor era la proporción entre polen muerto y polen vivo, más rápido se producía el deterioro de la salud general de la muestra. Por último, el deterioro general de la salud en el conjunto de muestras de 4 días fue mucho más pronunciado que en el conjunto de tubos de polen fresco, lo que indica que el polen que ya ha empezado a deteriorarse se ve más afectado por la adición de polen muerto que las
45 muestras de polen fresco.

Ejemplo comparativo 4

50 En los experimentos iniciales considerando diferentes tipos de compuestos de separación a utilizar para el almacenamiento de polen, se realizaron experimentos utilizando carbón activado como separador. El polen del campo se recogió manualmente de varios genotipos de maíz y se almacenó temporalmente en tubos cónicos de 50 ml a 5 °C. T0 Amphasys se llevó a cabo junto con la determinación del contenido de humedad del polen (PMC) del polen de control sin mezclar. Amphasys proporciona una determinación fiable de la viabilidad del polen mediante un citómetro de flujo de impedancia, que mide las propiedades eléctricas de los granos de polen. La viabilidad en T0 fue del 97%
55 con un PMC del 57% utilizando el procedimiento estándar de estufa de una noche. El polen se mezcló con polvo de carbón vegetal (carbón activado) en distintos porcentajes. El carbón activado se utiliza a menudo para absorber sustancias tóxicas. A continuación, las muestras mezcladas se almacenaron a 5 °C, en tubos de 50 ml sin tapar. Se

recogieron datos de puntos temporales en los días 1 y 6, utilizando Amphasys cuando la concentración de carbón lo permitió. Se suspendieron pequeñas cantidades de muestra en el medio Ampha 6 y luego se filtraron con un filtro de 150 μm para eliminar cualquier partícula grande que pudiera afectar a la fluidez en el Amphasys. Como se muestra en la Figura 4, el porcentaje de carbón vegetal influyó tanto en la viabilidad del polen como en el contenido de humedad del polen (PMC). Utilizada en cantidades inferiores, 2,5- 25% en este caso, la viabilidad se mantuvo en un 92% a los 6 días de almacenamiento. Sin embargo, se observaron problemas de fluidez, ya que las muestras se volvieron esponjosas y se agregaron al sexto día.

Ejemplo 5 - sólo los experimentos con lactosa entran en el alcance de protección.

Continuando con los esfuerzos para probar diferentes sustancias con el fin de separar los granos de polen, se realizó un experimento con una serie de diferentes sacáridos para determinar la eficacia para la separación y conservación de los granos de polen. Se recogió una mezcla de polen de varias plantas de maíz con muda activa cultivadas en invernadero. La recolección manual se realizó con un embudo y un tamiz para retirar las anteras. La muestra de polen a granel se dividió en cuatro porciones iguales, cada una de ellas de aproximadamente 5 mL de volumen. Cada muestra de polen se almacenó en un tubo cónico de 50 ml tapado a 5 °C durante la noche y su viabilidad se comprobó con Amphasys aproximadamente 24 horas después de la recogida. A 1: se añadió a cada tubo una proporción de 1 volumen de uno de los tres tipos diferentes de azúcares, de forma que la cantidad de azúcar fuera igual a la cantidad de polen en cada tubo. A continuación, se invierte el tubo varias veces para mezclar bien el azúcar con el polen. El tubo 1 contenía una mezcla 1:1 de polen de maíz con inositol, el tubo 2 contenía una mezcla 1:1 de polen de maíz con lactosa y el tubo 3 contenía una mezcla 1:1 de polen de maíz con trehalosa. El tubo 4 sirvió de control con 5 mL de polen. Cada tubo se tapó y se almacenó a 4 °C. Se recogieron datos de viabilidad de Amphasys de una pequeña alícuota de cada tubo en los puntos temporales de 24 horas, 2, 5, 8 y 13 días. Estos datos se presentan en la figura 5.

Después de 24 horas de almacenamiento, la viabilidad de la muestra de trehalosa mostró una ligera disminución en comparación con las otras muestras. El día 2 mostró un descenso más acusado de la viabilidad de la muestra de trehalosa en comparación con las otras 3 muestras. El día 5 mostró un fuerte descenso de la viabilidad en todas las muestras, a excepción de la lactosa. El día 8 proporcionó un indicador muy claro de que la lactosa mostraba una buena conservación del polen, con un 77% de viabilidad frente al 24% del control. Basándose en los resultados globales, se determinó que los sacáridos pueden ser compuestos de separación adecuados para mantener los granos de polen separados entre sí manteniendo la viabilidad, y que la lactosa era particularmente adecuada para mantener los granos de polen de maíz tanto separados entre sí como viables. También se observó que el polen de la muestra de lactosa era ligeramente grumoso y no fluía tan libremente como el polen recién recolectado.

Ejemplo comparativo 6

Para estudiar el efecto del tamaño de las partículas del compuesto de almacenamiento sobre la separación y el almacenamiento del polen, se utilizó una serie de composiciones de partículas sólidas para el almacenamiento del polen y su aplicación a las sedas de plantas de maíz en crecimiento. Se recolectó polen fresco de plantas de maíz en muda activa. El polen se dividió en seis muestras iguales, que se colocaron en tubos de centrifuga individuales de 50 ml. Posteriormente, a cada muestra se le añadió una proporción igual de partículas de sílice de un tamaño específico. Los tamaños de las partículas de sílice añadidas variaban entre 5,5 μm y 340 μm . Tras la adición de las partículas, se mezcló cada tubo y se almacenó a 4 °C durante 24 horas. A continuación, se polinizó a mano la mezcla de cada tubo con 5 espigas embolsadas y se embolsaron las espigas después de la polinización para evitar que cayera más polen en las sedas. Las espigas se dejaron madurar, tras lo cual se cosecharon y se contó el número total de granos por espiga. Los datos se presentan en la figura comparativa 6. El tamaño de partícula de 20 μm produjo el mayor número medio de granos, pero el resto de los tamaños de partícula también produjeron granos con índices de eficacia variables. Este experimento demuestra cómo se puede identificar el tamaño de partícula óptimo para un tamaño de polen específico.

Ejemplo 7

Para seguir estudiando el efecto del tamaño de las partículas sobre la separación, el almacenamiento y la fluidez del polen, se utilizó una serie de composiciones de partículas sólidas para el almacenamiento a largo plazo del polen. Se utilizaron diferentes aditivos en un compuesto de separación a base de lactosa para probar la mejora de la fluidez del polen para su uso eventual en la aplicación mecánica del polen en un entorno de campo.

Tabla 1

Sustancia en partículas	Aditivo	Tamaño de las partículas de aditivo (micras)
98% Lactosa	2% Sipernat® 2200	320
98% Lactosa	2% perlas de Jojoba	150-250
98% Lactosa	2% Sipernat®50	50
98% Lactosa	2% Sipernat® 22S	14
98% Lactosa	2% Perkasil® SM660	16

5 Las borlas de maíz, de variedades agrupadas y en la fase inicial de antesis activa, se cosecharon y almacenaron en una cámara de crecimiento Conviron®. Para prolongar la productividad de las borlas, la cámara de crecimiento Conviron® se programó para funcionar a 12 °C y 90% HR durante 18 horas, 26 °C y 70% HR durante 6 horas, con fines de recolección. Se recogió a mano una mezcla de polen de las borlas del maíz y se mezcló en una proporción de volumen 1:3 con cada aditivo de la Tabla 1. También se preparó una muestra de control que sólo contenía polen sin ningún medio de almacenamiento. Las muestras de control y las mezclas de muestras de polen y partículas se almacenaron en tubos de centrifuga de 50 mL tapados con filtro que se conservan en un recipiente cerrado más grande que tenía aproximadamente 100 mL de desecante de perlas de sílice Dry-Dry. Las tapas de los filtros tienen un elemento de malla que permite el paso del aire sin derramar el polen. El recipiente sellado se almacenó en una cámara de crecimiento a 3 °C. De este modo se mantiene un microclima frío y ligeramente seco para el almacenamiento de los tubos tapados con filtro.

15 En el momento de mezclar las muestras se observó que las mezclas de perlas de jojoba y Sipernat® 2200 eran difíciles de trabajar porque provocaban aglutinaciones en la mezcla, lo que implicaba una mala fluidez.

La viabilidad T0 con Amphasys fue del 89,26% al inicio del periodo de prueba. Tras tres días de almacenamiento, las muestras de polen almacenadas se analizaron mediante el sistema Amphasys para medir su viabilidad. Amphasys proporciona una determinación fiable de la viabilidad del polen mediante un citómetro de flujo de impedancia, que mide las propiedades eléctricas de los granos de polen.

20 Como se muestra en la Figura 7, la muestra de control mostró una pequeña reducción en la viabilidad y tuvo una pobre fluidez debido al alto PMC. Todas las demás muestras analizadas mostraron una gran viabilidad y fluidez.

Ejemplo 8

25 Se utilizó una serie de composiciones de partículas sólidas para el almacenamiento a largo plazo de polen con y sin tratamiento desecante. Se utilizaron diferentes aditivos para probar la mejora de la fluidez del polen para su uso en la aplicación mecánica del polen en un entorno de campo.

Tabla 2

Sustancia en partículas	Aditivo	Tamaño de las partículas de aditivo (micras)
98% Lactosa	2% Sipernat® 340	20
98% Lactosa	2% Sipernat® 2200	320
98% Lactosa	2% Perkasil® SM660	16

30 Las borlas de maíz, de variedad agrupada y en la fase inicial de antesis activa, se cosecharon y almacenaron en una cámara de crecimiento Conviron®. Para prolongar la productividad de las borlas, la cámara de crecimiento Conviron® se programó para funcionar a 12 °C y 90% HR durante 18 horas, 26 °C y 70% HR durante 6 horas, con fines de recolección. Se recogió a mano un pool de polen de las borlas del maíz y se mezcló en una proporción de volumen 1:3 (se añadió 1 mL de polen a 3 mL de la composición) con las composiciones de la Tabla 2. También se crearon muestras de control únicamente con polen y sin composición de partículas en el medio. Las muestras se almacenaron en tubos de muestras tapados con filtro. Las tapas de los filtros tienen un elemento de malla que permite

el paso del aire pero evita que se derrame el contenido del tubo. Se prepararon dos conjuntos idénticos de muestras. Se mezcló un juego de muestras y se almacenó en un recipiente cerrado que contenía desecante, como se indica en el Ejemplo 7, durante dos días de almacenamiento. El segundo grupo de muestras también se almacenó en un recipiente, pero sin desecante. Tras dos días de almacenamiento, todas las muestras del contenedor con desecante se trasladaron a un contenedor sin desecante. El objetivo de este experimento era demostrar si se mejora la viabilidad reduciendo ligeramente, pero no en exceso, el contenido de humedad del polen.

La viabilidad T0 con Amphasys fue del 97% al inicio del periodo de prueba. Tras dos y seis días de almacenamiento, el polen almacenado se analizó mediante el sistema Amphasys para medir su viabilidad. Amphasys proporciona una determinación fiable de la viabilidad del polen mediante un citómetro de flujo de impedancia, que mide las propiedades eléctricas de los granos de polen. Los datos se presentan en la figura 8.

A excepción de la muestra de control, todas las muestras no desecadas obtuvieron mejores resultados que las muestras expuestas al desecante. Este fue el caso en los días 2 y 6. Todas las muestras mostraron una gran viabilidad a los 6 días. En este caso, la desecación con aditivos no aumentó la viabilidad durante el almacenamiento. Todas las muestras que se mezclaron con las composiciones tuvieron mejor viabilidad que la muestra de control.

15 **Ejemplo comparativo 9**

Se probó el almacenamiento de polen con y sin desecante para determinar el efecto del desecante en la viabilidad del polen. Se cosecharon borlas de maíz de distintas variedades y edades y se almacenaron en una cámara de crecimiento Conviron®. Para prolongar la productividad de las borlas, la cámara de crecimiento Conviron® se programó para funcionar a 12 °C y 90% HR durante 18 horas, 26 °C y 70% HR durante 6 horas, con fines de recolección. Se recogió polen por un total de algo más de 3 gramos de las borlas de la cámara de crecimiento golpeando las borlas sobre una malla que permitía el paso del polen sin dejar pasar las anteras. Se formaron bolsas con papel de filtro Whatman n.º 4 y se añadieron 1,75 g de polen fresco a cada bolsa. Las bolsas se enrollaron y se colocaron en tubos cónicos de 50 ml. Algunos tubos contenían 30 mL de desecante de perlas de gel de sílice Dry & Dry. Se taparon los tubos y se conservaron a 3 °C durante tres días.

Las pruebas realizadas a los 3 días utilizando Amphasys demostraron que el polen almacenado con el desecante tenía un contenido de humedad del polen (PMC) del 10,9% y una viabilidad del 0,67%. El polen almacenado sin el desecante tenía un PMC del 57% y una viabilidad del 91,52%.

Este experimento demostró que un contacto excesivo con el desecante no favorece la viabilidad y longevidad del polen durante el almacenamiento en frío.

30 **Ejemplo 10**

Se realizó un estudio para determinar si había un efecto sobre la viabilidad del polen basado en la proporción de polen y compuesto físico de separación del polen. Las borlas de maíz cosechadas y enviadas desde Hawaii, de variedad agrupada y en la fase inicial de antesis activa, se almacenaron en una cámara de crecimiento Conviron®. Para prolongar la productividad de las borlas, la cámara de crecimiento Conviron® se programó para funcionar a 12 °C y 90% HR durante 18 horas, y a 26 °C y 70% HR durante 6 horas, con fines de recolección. Se recogió a mano una mezcla de polen de las borlas del maíz y se analizó la viabilidad de una pequeña parte del polen de tiempo cero utilizando Amphasys, lo que dio como resultado un 96% de viabilidad.

[0092] El resto del polen se dividió en cuatro cantidades iguales y se colocó en tubos de centrifuga de 50 mL, y se mezcló en tres proporciones de peso diferentes con un compuesto de separación que contenía 96% de lactosa y 4% de Aerosil®. El primer tubo sirvió de control y no se le añadió ningún compuesto de separación. El segundo tubo tenía una proporción de 3:1, polen por compuesto de separación. El tercer tubo tenía una proporción de 1:1, polen por compuesto de separación. El cuarto tubo tenía una proporción de 1:3, polen por compuesto de separación. Cada tubo se invirtió completamente para mezclar el polen con el compuesto de separación y se almacenó a 4 °C. Se comprobó la viabilidad del polen en cada tubo después de 4, 6, 10, 12 y 17 días utilizando Amphasys. Los datos se presentan en la figura 9.

Tras 4 días de almacenamiento, todas las proporciones de polen con compuesto de separación superaban al control. Tras 6 días de almacenamiento, la viabilidad de la proporción 3:1 de polen respecto al compuesto de separación empezó a disminuir considerablemente en comparación con las proporciones 1:1 y 1:3, aunque seguía superando al control. La proporción 1:1 de polen y compuesto de separación también comenzó a disminuir en viabilidad. Tras 10 días de almacenamiento, se mantuvieron las mismas tendencias. Al cabo de 12 días, tanto la muestra de control como la de la proporción 3:1 no mostraban polen viable. La muestra de proporción 1:1 mostró bajos niveles de viabilidad, sin embargo, la muestra de proporción 1:3 aún demostró un 80% de viabilidad. Incluso después de 17 días, la muestra de proporción 1:3 presentaba una viabilidad del 56%. Esta prueba proporcionó una confirmación adicional de que cuanta más separación se produzca entre los granos de polen durante el almacenamiento para minimizar el contacto, más tiempo permanecerá viable el polen durante el periodo de almacenamiento.

Ejemplo 11

Para determinar si el procedimiento de mantenimiento de la separación del polen era eficaz en otras especies vegetales, se realizaron experimentos con trigo. Se recogieron cabezas de trigo de la variedad Grandin en la fase de emergencia temprana y en la fase de post-emergencia. En la fase de post-emergencia, unas pocas anteras estaban expuestas en las cabezas de trigo. Se recogieron las anteras de una submuestra de las cabezas y las anteras recogidas se molieron con un mortero de nailon en 1,5 mL de medio Ampha 6, se filtraron y se pasaron por el sistema Amphasys para medir la viabilidad T0. Amphasys proporciona una determinación fiable de la viabilidad del polen mediante un citómetro de flujo de impedancia, que mide las propiedades eléctricas de los granos de polen.

Se tomó una segunda submuestra de las cabezas de trigo en fase de emergencia temprana y post-emergencia de diferentes regiones de cada cabeza. Estas muestras se almacenaron enteras a 5 °C en viales criogénicos. Las muestras de los viales no tenían medio de almacenamiento, tenían medio de almacenamiento con partículas de lactosa o tenían lactosa (D-lactosa monohidrato de calidad de laboratorio, RPI #L26100-1000.0) combinada con medio de almacenamiento Sipernat® 340 al 2%. Tras un almacenamiento de 3 ó 14 días, se extrajo el polen de las anteras almacenadas utilizando el mortero de nailon, y se determinó la viabilidad utilizando Amphasys.

La viabilidad del polen de las muestras se indica en la Tabla 3, a continuación.

Tabla 3: Viabilidad del polen de trigo

Medio de almacenamiento	Viabilidad de las cabezas emergentes tempranas (%)	Viabilidad de las cabezas tras la emergencia (%)
T0	22-42%	19-42%
Día 3, sin medio	40-49%	26-35%
Día 3, sólo lactosa	28-41%	27-35%
Día 3, lactosa más Sipernat® 340	32-41%	22-36%
Día 14, sin medio	13-25%	21-43%
Día 14, sólo lactosa	39-44%	6-17%
Día 14, lactosa más Sipernat® 340	17-23%	13-16%

Los resultados de este experimento se presentan en la Figura 10. A los 3 días, se produjo una pequeña mejora de la viabilidad en comparación con los datos de T0 en las anteras de emergencia temprana. Las anteras maduras produjeron una viabilidad similar independientemente del tratamiento. El almacenamiento en los medios a base de lactosa muestra una ventaja.

Ejemplo 12

Se realizó otro experimento para probar la eficacia de mantener la separación de los granos de polen en el arroz. Las anteras del arroz se recogieron de una reserva de glumas recortadas. Una muestra de las anteras se trituró con un mortero de nailon en 1,5 ml de medio Ampha 6, se filtró y se pasó por el sistema Amphasys para medir la viabilidad T0. Amphasys proporciona una determinación fiable de la viabilidad del polen mediante un citómetro de flujo de impedancia, que mide las propiedades eléctricas de los granos de polen.

Una segunda submuestra de anteras se dividió en tres grupos que se almacenaron enteros a 5 °C en frascos criogénicos. Estas muestras se almacenaron enteras a 5 °C en viales criogénicos. Las muestras de los viales no tenían medio de almacenamiento, tenían medio de almacenamiento con partículas de lactosa o tenían lactosa de grado químico combinada con medio de almacenamiento Sipernat® 340 al 2%. Tras un almacenamiento de 4 ó 10 días, se extrajo el polen de las anteras almacenadas utilizando el mortero de nylon, y se determinó la viabilidad utilizando Amphasys. Los datos se muestran en la figura 11.

La viabilidad del polen de las muestras se indica en la Tabla 4, a continuación.

Tabla 4: Viabilidad del polen de arroz

Medio de almacenamiento	Viabilidad del polen (%)
T0	44-55%
Día 4, sin medio	36-38%
Día 4, sólo lactosa	57-63%
Día 4, lactosa más Sipernat® 340	23-35%
Día 10, sin medio	0-5%
Día 10, sólo lactosa	24-27%
Día 10, lactosa más Sipernat® 340	27-34%

A los 4 días, se observó una mejora de la viabilidad del polen en comparación con los datos T0 del polen procedente de las anteras almacenadas en el medio sólo lactosa.

5 Ejemplo 13

Se realizó un experimento de cuajado de granos para determinar si el polen almacenado con un compuesto de separación daría lugar a más o menos granos que la aplicación de polen fresco o la polinización abierta. Para este experimento, las plantas de ensayo de un solo genotipo se embolsaron en el campo con la excepción de un grupo de plantas de polinización abierta, a las que se dejó polinizar de forma natural. A las plantas de control negativo nunca se les retiraron las bolsas de brotes. Para las polinizaciones de control, se recogió una masa de polen recién desprendido y se dividió en dos porciones. La primera porción se utilizó para polinizar a mano las plantas testigo, momento en el que se embolsaron para evitar que se acumulara polen adicional en las sedas. El segundo granel de polen se mezcló con una proporción 1:1 de polen fresco con un compuesto de separación de 98% de lactosa y 2% de Sipernat 340. Estas muestras de polen se almacenaron a 4 °C durante 24 horas. Transcurridas 24 horas, se retiraron las bolsas de brotes de las plantas reservadas para los ensayos con el compuesto de separación, se aplicó a las sedas el polen mezclado en el compuesto de separación y se volvieron a embolsar las plantas para evitar que se acumulara polen adicional en las sedas. Se dejó madurar a todas las plantas polinizadas y se cosecharon las espigas de cada tratamiento. Se realizaron recuentos de granos en cada mazorca y los datos se presentan en la Figura 12. Los datos muestran que no hubo diferencias estadísticas entre las plantas de polinización abierta, las plantas de control o las plantas polinizadas con el polen almacenado con el compuesto de separación. Esto demuestra que el polen almacenado con el compuesto de separación conserva toda su viabilidad y dio lugar a un mayor número de granos que las mazorcas de control polinizadas con polen fresco.

Ejemplo 14

En este ejemplo se probó el rendimiento de 97% de lactosa mezclada con 3% de Sipernat® D17 como compuesto de separación. Se recolectó polen recién desprendido de las borlas del maíz y se midió la viabilidad T0 en un 95,8% utilizando Amphasys. El resto del polen se mezcló en una proporción de volumen 1:1 con el compuesto de separación. La viabilidad del polen se midió con Amphasys a los 3 y 7 días y se realizaron polinizaciones manuales en espigas embolsadas en cada intervalo, con una bolsa colocada sobre las sedas tras la polinización para evitar que cayera polen adicional sobre las sedas. Aunque cada intervalo de almacenamiento contenía polen viable, las polinizaciones en el campo no produjeron granos. Tras un examen más detallado de la mezcla de aditivos con el polen, se hizo evidente que el producto Sipernat® D17, que es ligeramente hidrófobo, estaba recubriendo el polen, impidiendo que se uniera a las sedas cuando se aplicó.

La figura comparativa 13 muestra una imagen microscópica del polen recubierto con el producto Sipernat® D17. El recubrimiento del polen daba lugar a una superficie resbaladiza, lo que impedía que las polinizaciones tuvieran éxito a pesar de que el polen era viable. Además, la imagen muestra que los granos de polen siguen razonablemente bien hidratados tras 14 días de almacenamiento. Este experimento demuestra que la experimentación rutinaria puede probar fácilmente la eficacia de varios compuestos de separación e identificar fácilmente los compuestos más adecuados para el polen y las estructuras vegetales de interés.

Ejemplo comparativo 15

La caseína y la celulosa se probaron por separado como posibles sustancias para mantener o aumentar la viabilidad del polen. La literatura anterior ha sugerido que la caseína en particular es una sustancia compatible con el polen. El

5 polen de maíz recién cosechado se recogió de las borlas en muda activa. El polen se dividió en dos porciones iguales, cada una de las cuales se colocó en un tubo de centrifuga de 50 ml. Al primer tubo se le añadió una porción igual de caseína. Al segundo tubo se le añadió una porción igual de celulosa. Cada tubo se almacenó durante 24 horas a 4 grados Celsius. Se realizó un ensayo de germinación al cabo de 24 horas. Los resultados muestran que tanto la caseína como la celulosa son perjudiciales para la viabilidad del polen, como se muestra en las figuras 14 y 15. Concretamente, la figura 14 muestra que el polen mezclado con caseína es en gran medida, si no completamente, inviable tras 20 horas de almacenamiento a 4 grados Celsius. Además, la figura 15 muestra que el polen mezclado con celulosa tiene poca viabilidad tras 20 horas de almacenamiento a 4 grados Celsius.

Ejemplo 16

10 Se realizaron pruebas para determinar el rendimiento de la invención en condiciones de calor. En el experimento, se recogió una gran cantidad de polen fresco. Se realizó una viabilidad del polen a tiempo cero utilizando Amphasys. A continuación, el polen se mezcló con una proporción 1:5 de 1 parte de polen, 5 partes de lactosa al 98% y Sipernat 340 al 2%. La mezcla se distribuyó en dos recipientes diferentes de un litro, cada uno con un volumen total de 100 ml. El primer recipiente se tapó y se agitó antes de tomar una muestra para la prueba de viabilidad, con lo que se garantizaba que no hubiera ningún sesgo basado en las capas de polen del recipiente. El segundo recipiente se tapó y no se agitó antes de tomar una muestra para la prueba de viabilidad en Amphasys. Ambos contenedores se colocaron al sol directo durante las pruebas. La temperatura osciló entre 29,6 y 32,8 grados centígrados durante todo el periodo de pruebas. Los datos mostraron que el polen de cada tratamiento siguió siendo muy viable durante 330 minutos de exposición al calor, como se muestra en la figura 16.

Ejemplo comparativo 17

25 Se probó el aceite mineral Sonneborn® PD-23 como agente separador de polen. Esta sustancia era líquida en todas las fases del experimento descrito. El polen recién recolectado de un lote de plantas de maíz se introdujo en aceite mineral y se almacenó a 4 grados centígrados durante 20 horas. Transcurridas 20 horas, se aplicaron medios de germinación en la formulación oleosa. Los resultados confirman que el líquido es un medio de almacenamiento eficaz para el polen. Además, los granos de polen que estaban en contacto directo entre sí no germinaron en su mayoría, mientras que un alto porcentaje de granos de polen que no estaban en contacto con otros granos de polen formaron un tubo polínico. Esto apoya aún más el concepto de que la separación de los granos de polen aumenta la viabilidad. Los resultados se muestran en la figura comparativa 17.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de conservación de una pluralidad de granos de polen que comprende:
 - 5 mezclar dicha pluralidad de granos de polen con una sustancia que impide que el contenido de polen muerto interactúe con los granos de polen vivos; y
 - almacenar dicha pluralidad de granos de polen y dicha sustancia; en el que el contenido de humedad del polen se mantiene entre el 15 y el 60%, en la que dicha sustancia es lactosa.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho contenido de humedad del polen se mantiene entre el 35 y el 60%.
- 10 3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho procedimiento incluye agitar dicho polen y dicha sustancia durante dicha etapa de almacenamiento; opcionalmente, en el que dicha agitación es continua.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la proporción entre dicha sustancia y los granos de polen es: al menos 1:1; opcionalmente, en el que la proporción entre dicha sustancia y los granos de polen varía entre 1:1 y 100:1.
- 15 5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el tamaño de dicha sustancia varía entre un máximo de diez veces mayor que el tamaño de dichos granos de polen y un mínimo a menudo menor que el tamaño de dichos granos de polen; opcionalmente, en el que dicha sustancia incluye partículas de distintos tamaños.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dichos granos de polen se seleccionan del grupo que consiste en polen recién recogido y polen almacenado.
7. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además el acondicionamiento en el campo de dicho polen.
- 20 8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha sustancia es lactosa.
9. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el contenido de humedad del polen es del 45-55%.
10. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho procedimiento incluye la reducción del contenido de humedad del polen después de su recogida a menos del 60%.

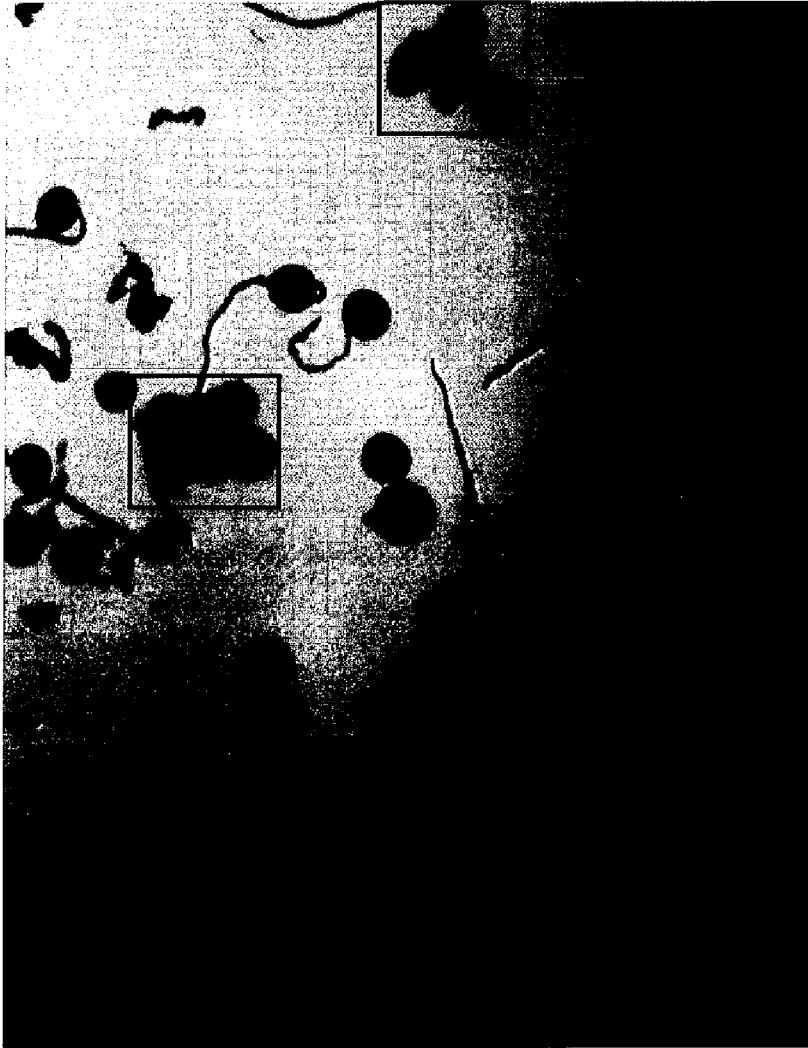


Fig. 1

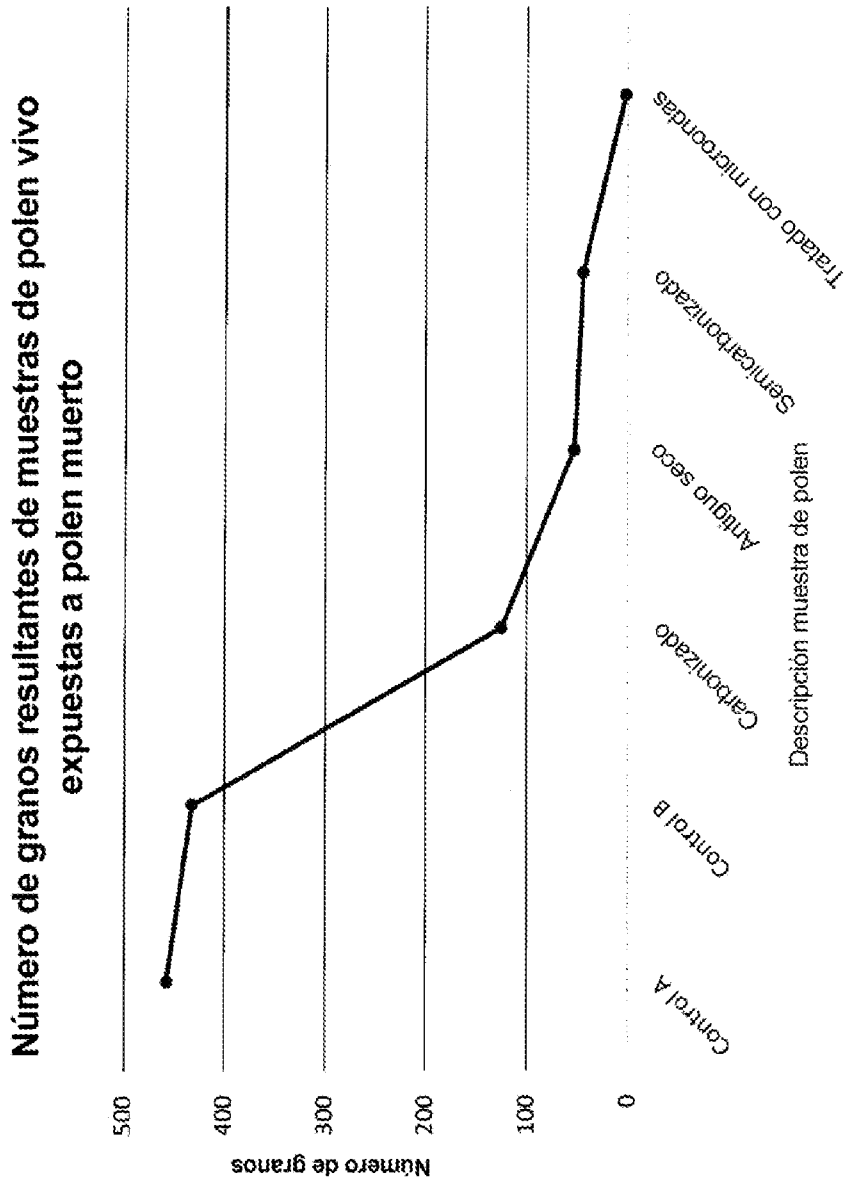


Fig. 2

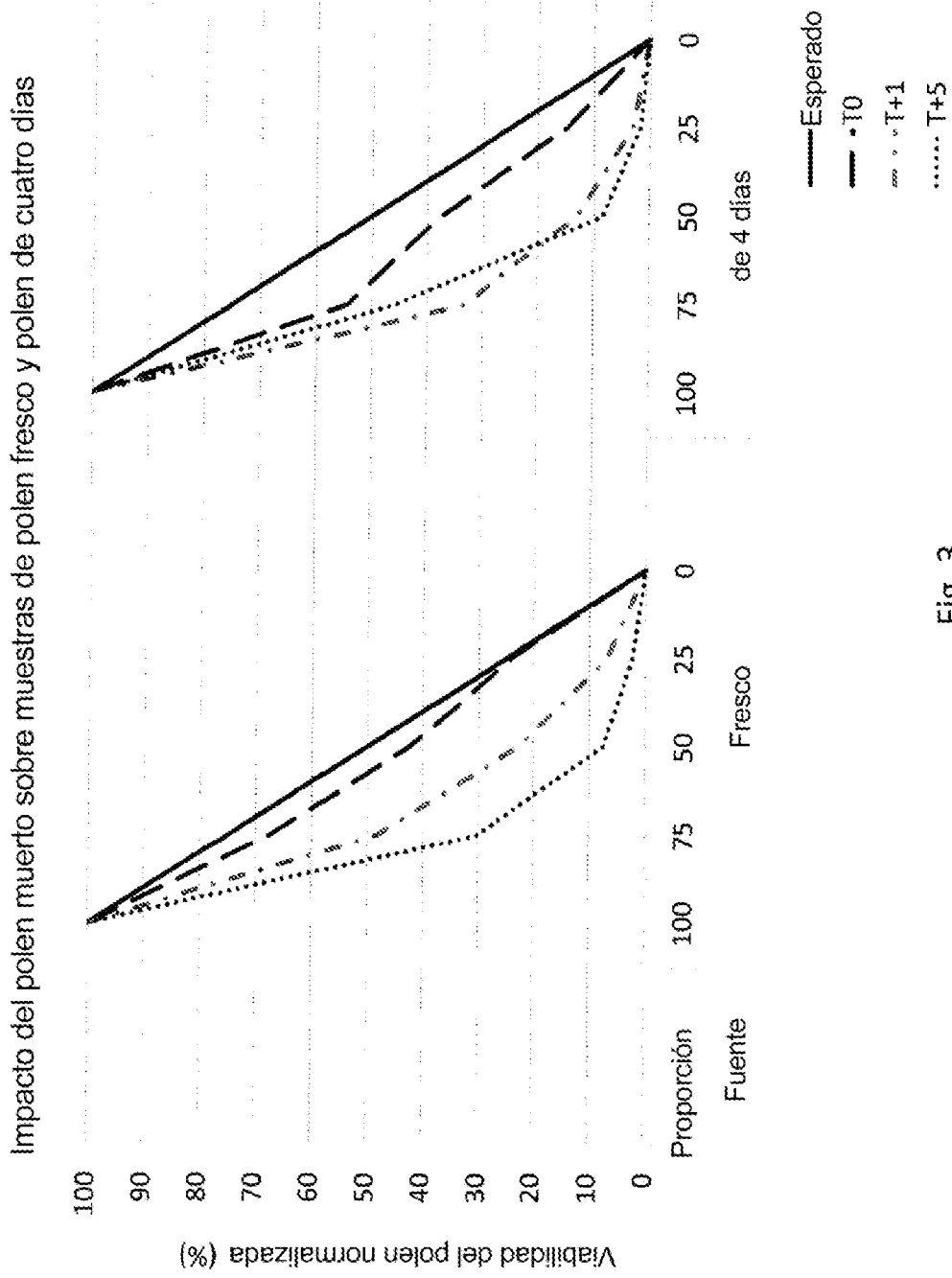


Fig. 3

**Eficacia de almacenamiento del polen con carbón vegetal activado:
Viabilidad y contenido de humedad del polen**

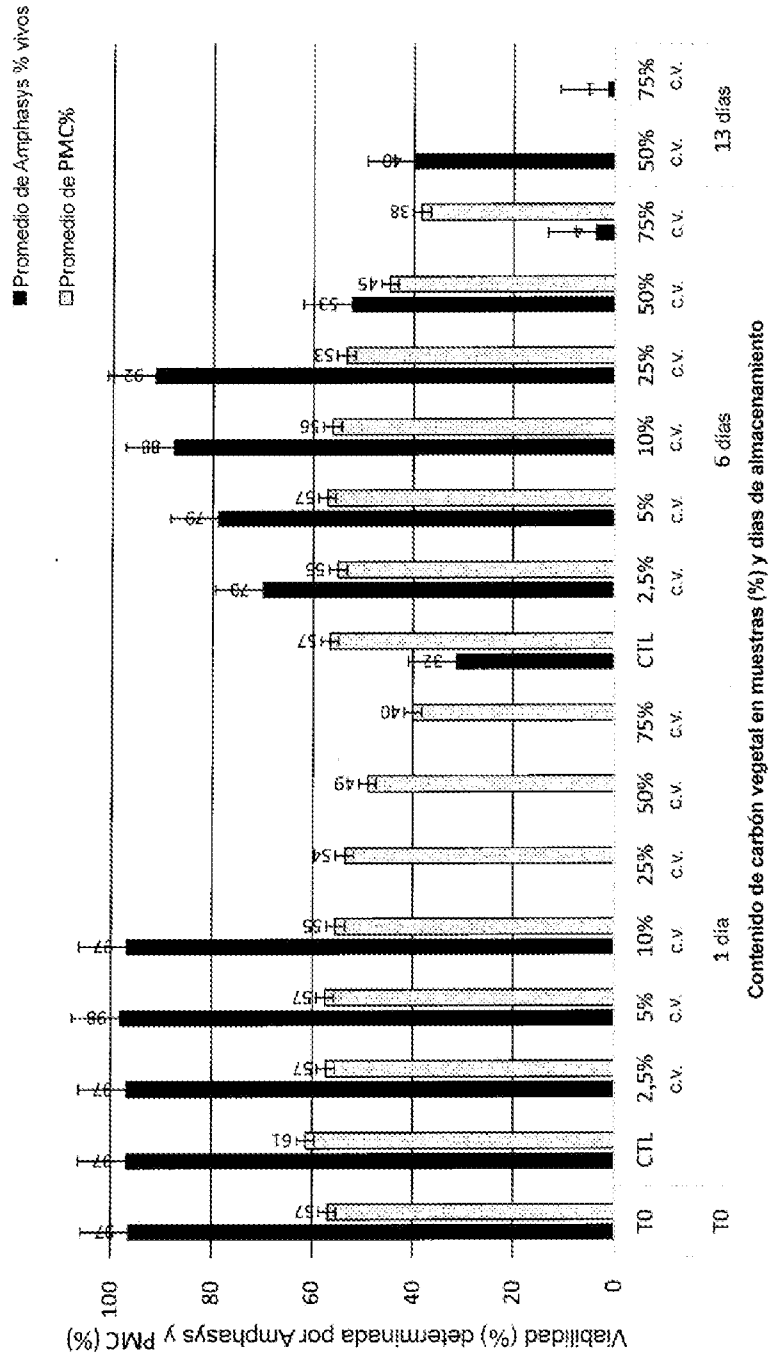


Fig. 4

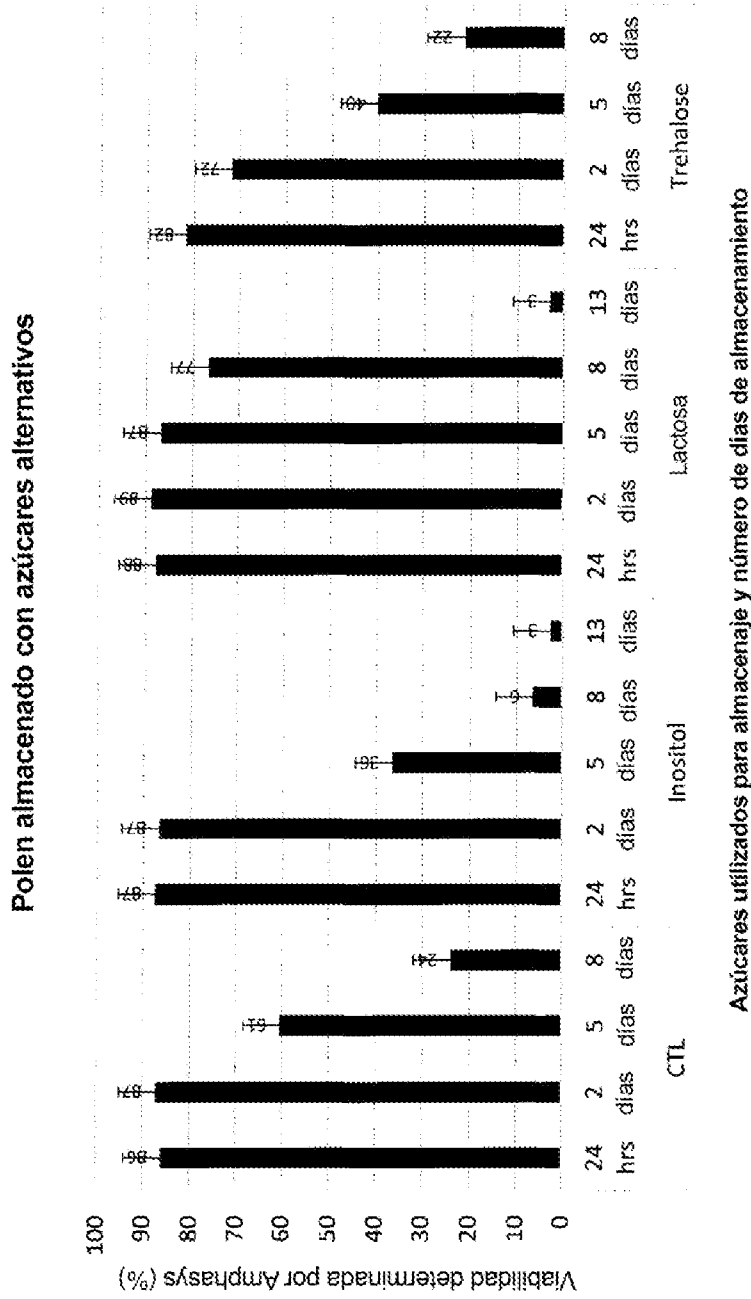


Fig. 5

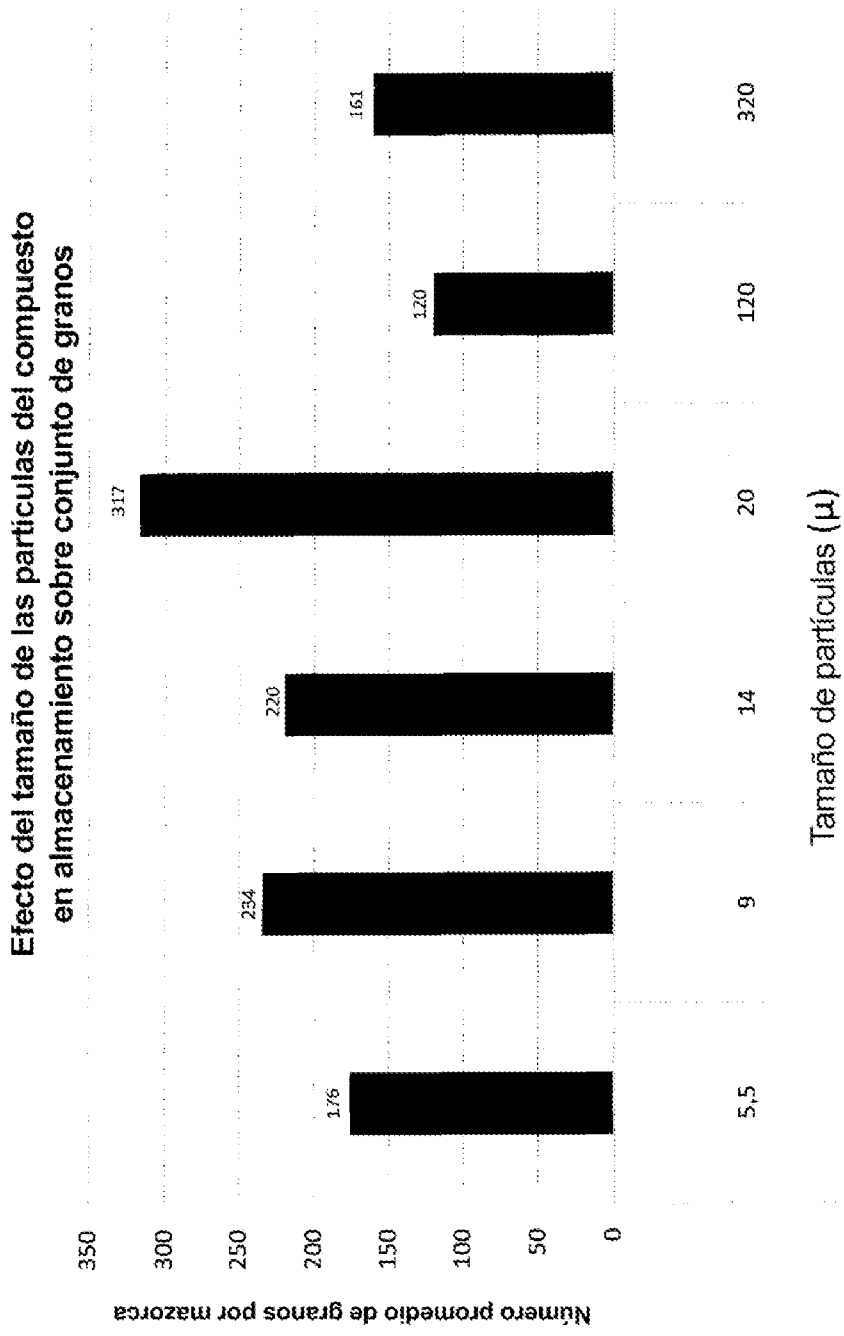
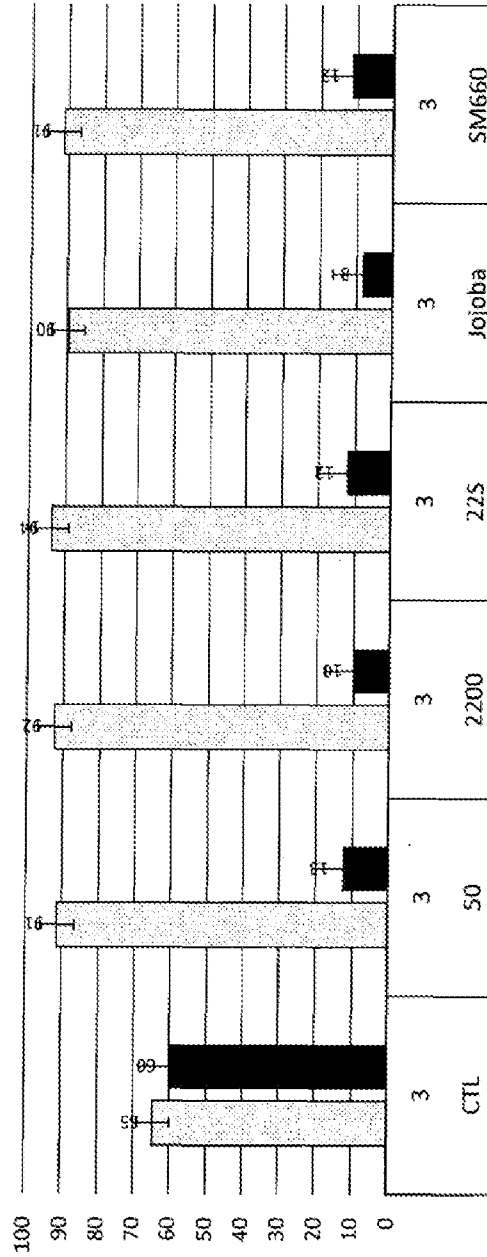


Fig. 6

Viabilidad de aditivos alternativos y contenido de humedad del polen (PMC)

Día 3

Viabilidad determinada por Amphasys (%) y PMC (%)

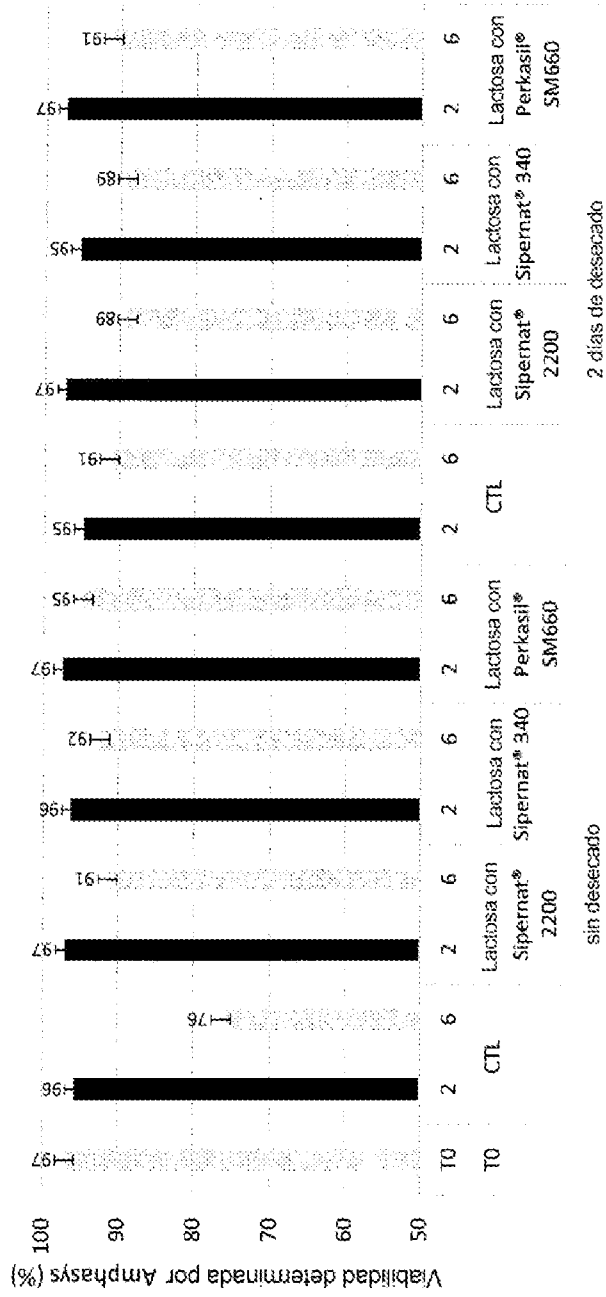


Aditivo y días de almacenamiento

□ Promedio de 12 MHz Amphasys % vivos
 ■ Promedio de PMC%

Fig. 7

Prueba de viabilidad de polen almacenado con diferentes aditivos de compuestos de separación con muestras desecadas versus no desecadas



Aditivo/Desecado y días de almacenamiento

Fig. 8

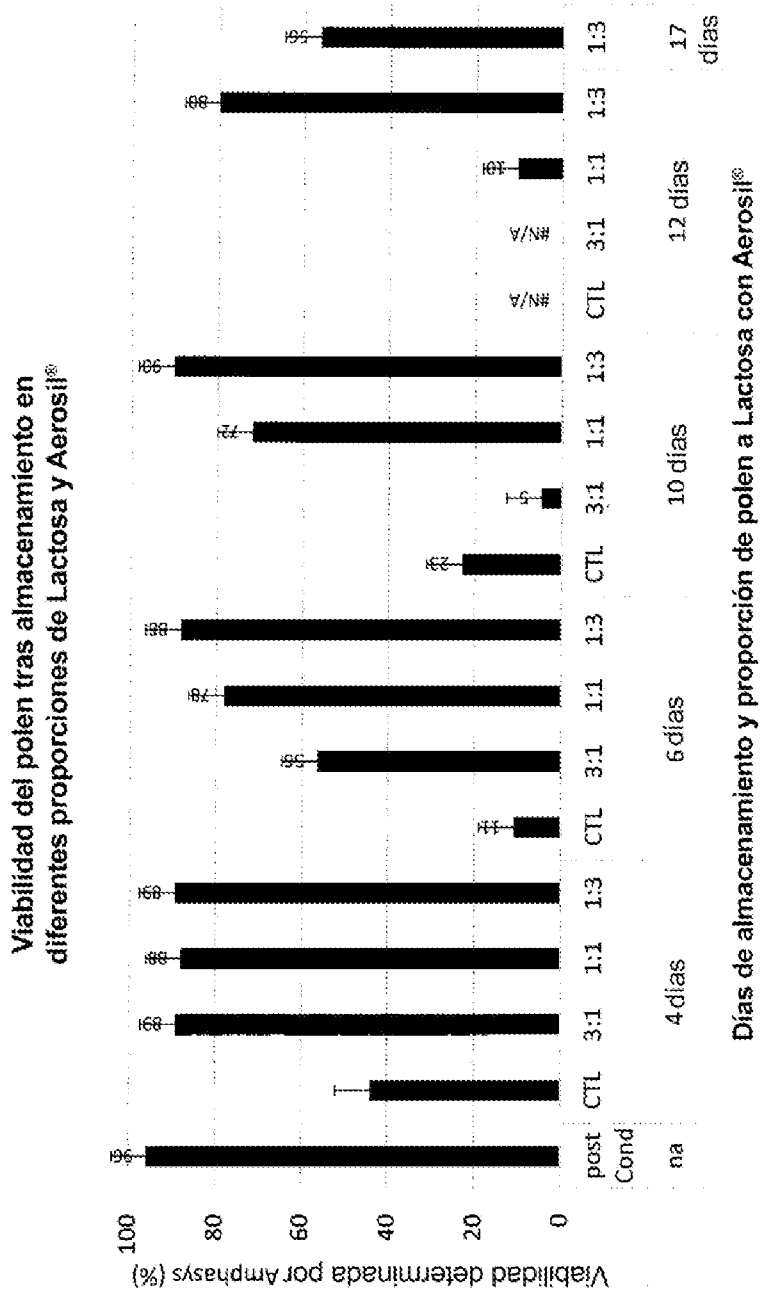
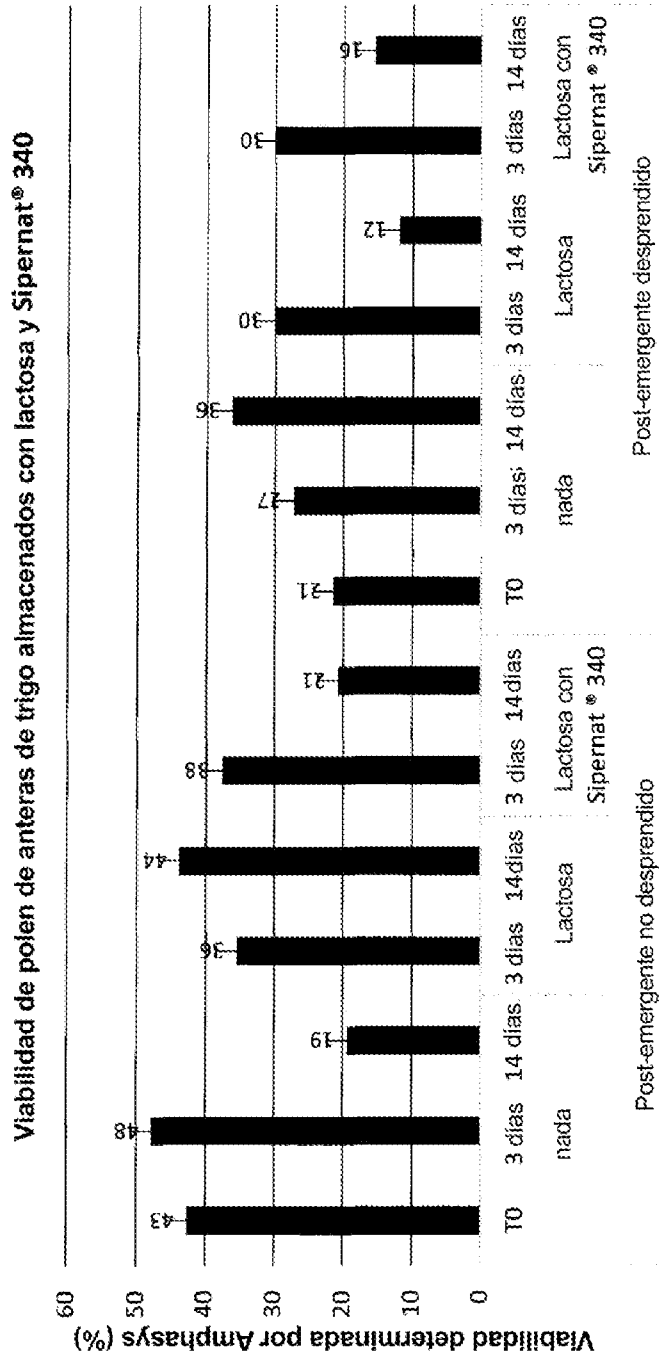
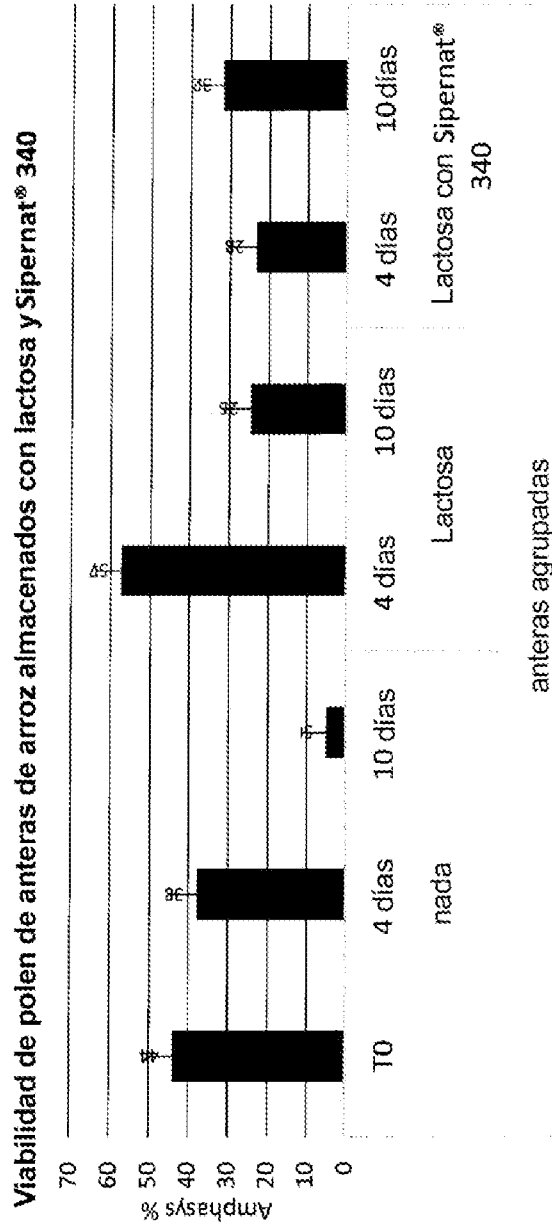


Fig. 9



Tipo de muestra y días de almacenamiento

Fig. 10



Días de almacenamiento de anteras de arroz y compuesto de separación utilizado

Fig. 11

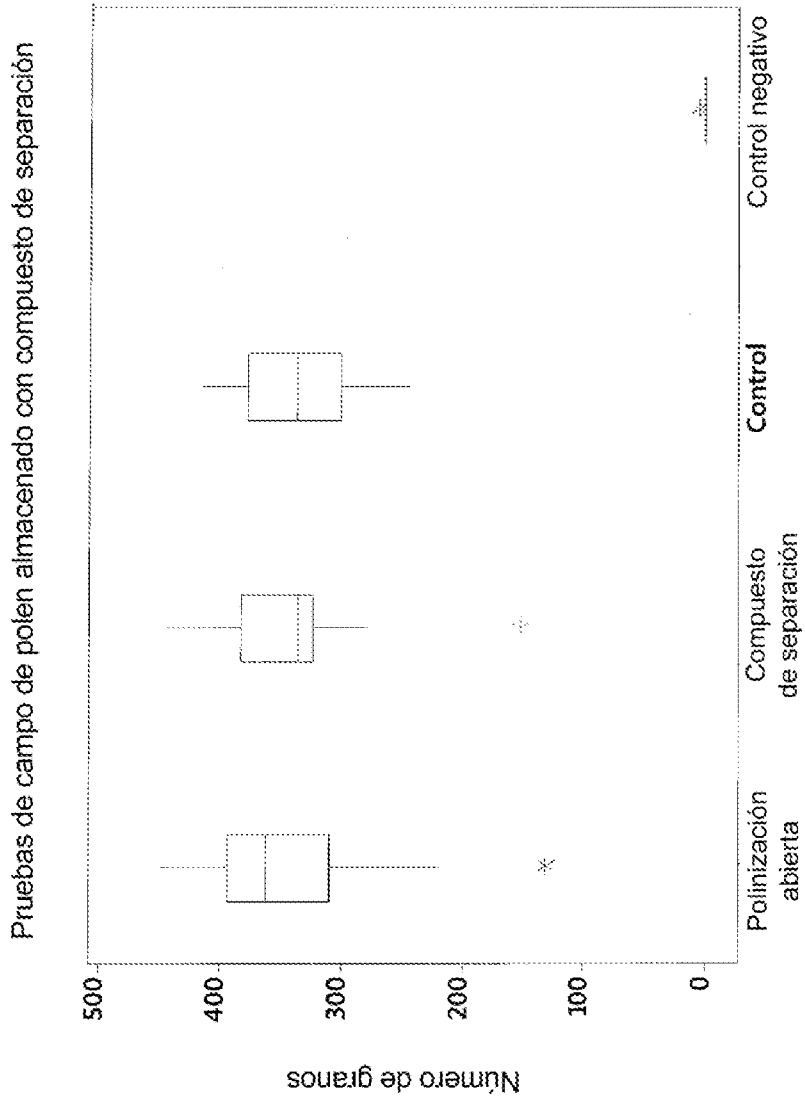


Fig. 12



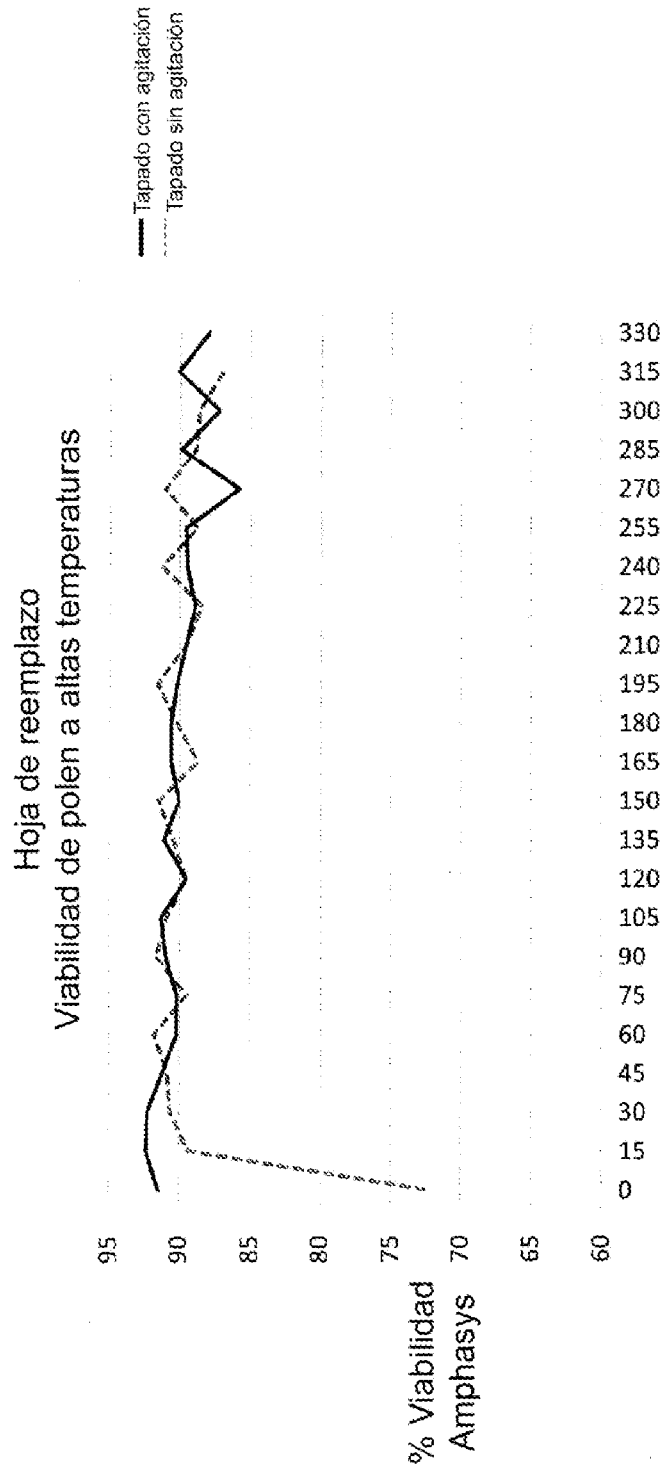
Fig. 13



Fig. 14



Fig. 15



Minutos
Fig. 16



Fig. 17