

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 795 106**

51 Int. Cl.:

A01H 1/04 (2006.01)

A01H 4/00 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.11.2013 PCT/US2013/068191**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.05.2014 WO14071271**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.11.2013 E 13792808 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2020 EP 2914093**

54 Título: **Muestreo de embriones para análisis molecular**

30 Prioridad:

05.11.2012 US 201261722399 P

15.03.2013 US 201361786968 P

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

20.11.2020

73 Titular/es:

PIONEER HI-BRED INTERNATIONAL, INC.

(100.0%)

7100 N.W. 62nd Avenue

Johnston, Iowa 50131-1014, US

72 Inventor/es:

HUNTER, CLIFFORD

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 795 106 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

Muestreo de embriones para análisis molecular

5 Campo de la invención

La presente descripción se refiere a métodos para muestrear embriones aislados para identificar embriones que pueden convertirse en plantas que tienen características deseables.

10 Antecedentes de la invención

En la reproducción tradicional de plantas, se plantan generaciones de plantas con base en cruces conocidos o autopolinizaciones y luego se prueban para observar si las líneas o variedades se mueven hacia características que son deseables en el mercado. Como puede apreciarse y como es bien conocido en la técnica, estos experimentos pueden ser a escala masiva. Implican una enorme fuerza laboral que va desde científicos hasta personal de campo para diseñar, plantar, mantener y realizar los experimentos, que pueden involucrar a miles o decenas de miles de plantas individuales. También requieren importantes recursos de tierra. Las parcelas o los invernaderos pueden ocupar miles de acres de tierra. Esto no solo bloquea grandes cantidades de tierra durante meses, mientras que las plantas germinan, crecen y producen semillas, tiempo durante el cual se pueden tomar muestras para pruebas de laboratorio o de campo, sino que las cantidades masivas de semillas se deben etiquetar, cosechar y procesar individualmente.

Una complicación adicional es que gran parte de la experimentación no sirve para nada. Se ha informado en la literatura que algunas compañías de semillas descartan el 80-90% de las plantas en cualquier generación al principio del experimento. Por lo tanto, gran parte de la tierra, la mano de obra y los recursos materiales utilizados para el cultivo, la cosecha y el procesamiento poscosecha se desperdician para un gran porcentaje de la semilla.

Las presiones de tiempo también son un factor. Los avances significativos en la reproducción de plantas han ejercido más presión sobre los programas de reproducción de plantas para avanzar más rápidamente en las líneas o variedades de plantas para obtener más y mejores rasgos y características. Los fitomejoradores y los trabajadores asociados están, por lo tanto, bajo una presión creciente para procesar estas generaciones de manera más eficiente y efectiva y para hacer más y más tempranas selecciones de plantas que deberían continuar en la próxima generación de reproducción de plantas.

Una serie de prácticas utilizadas actualmente han acelerado las ganancias producidas por la reproducción de plantas con ahorros de costes considerables. Por ejemplo, los protocolos para crear haploides duplicados han eliminado la necesidad de años de autofecundación y evaluaciones posteriores para lograr plantas homocigotas. Además, el poder de los datos de marcadores genéticos, y la facilidad de obtenerlos, ha permitido que las plantas que no contienen las características deseadas sean eliminadas de la población antes del gasto de recursos significativos. Además, las prácticas recientes han utilizado pruebas de laboratorio en la etapa de semilla, a menudo denominadas "astillado de grano" o "astillado de semilla", en la que la semilla se prueba de forma no destructiva para obtener información genética, bioquímica o fenotípica (Sangtong, V. et al., (2001) Plant Molecular Biology Reporter 19: 151-158). La prueba de semillas evita la necesidad de cultivar semillas en plantas inmaduras, lo que ahorra tiempo, espacio y esfuerzo.

El documento WO 2007/103786 describe métodos para facilitar las actividades de mejora de germoplasma mediante el uso de muestreo no destructivo de semillas de alto rendimiento.

El documento WO 2012/143696 describe un método para seleccionar material vegetal propagable de ploidía atípica mediante el muestreo del endospermo de semillas o plántulas individuales sin dañar el embrión y seleccionando los individuos en los que la ploidía del endospermo es anormal.

Sin embargo, todavía hay mejoras que se pueden hacer. En particular, existe la necesidad de métodos para caracterizar molecularmente a los embriones incluso tempranamente en el desarrollo, particularmente como parte del proceso haploide duplicado u otros procesos que utilizan técnicas de rescate de embriones.

Sumario de la invención

La presente descripción se refiere a métodos para facilitar las actividades de mejora de la planta mediante el uso de muestreo de embriones. A través del proceso descrito en este documento, es posible probar embriones aislados individuales y seleccionar solo aquellos embriones que pueden convertirse en plantas que poseen una o más características deseadas. Esto permite métodos nuevos y más eficientes para la mejora y el manejo de las plantas, que conducen a mejores poblaciones de reproducción de plantas.

En el presente documento se proporcionan métodos para analizar un embrión aislado de una planta monocotiledónea. En tales métodos, se extrae un trozo de tejido de escutelo de un embrión inmaduro aislado, en el

que dicha escisión no causa una reducción significativa en el potencial de germinación del embrión. Los ácidos nucleicos extraídos de el trozo de tejido de escutelo se analizan, opcionalmente después de la amplificación, para detectar la presencia o ausencia de una o más características indicativas de al menos un rasgo genético. El embrión aislado es viable y puede germinar en una planta después de que se corta dicho trozo de tejido de escutelo.

5 El embrión aislado puede ser de maíz, sorgo, trigo, arroz, cebada, avena, centeno, mijo, caña de azúcar, triticale o pasto varilla. El embrión aislado puede obtenerse directamente de una semilla, o puede derivarse de otros tejidos. El embrión aislado puede ser fresco o enfriado. El embrión aislado puede ser de cualquier ploidía, tal como, por ejemplo, un haploide, diploide, haploide duplicado, aneuploidía, tetraploide, hexaploide u octaploide.

10 El trozo de tejido de escutelo cortado del embrión aislado puede ser liofilizado, fresco, congelado o enfriado después del muestreo.

15 El trozo de tejido de escutelo puede ser igual o mayor que un solo núcleo.

La escisión del tejido de escutelo puede ocurrir por cualquier medio conocido en la técnica, como por ejemplo: una broca, un chorro de agua, un láser, una sola cuchilla, un juego de cuchillas opuestas, una jeringa, un muestreador de núcleos (herramienta de extracción de núcleos), un bisturí, un alambre de diámetro pequeño, un cable de alambre texturizado de diámetro pequeño, una espátula y un hisopo. La escisión puede realizarse manualmente o mediante un proceso automatizado.

20 El embrión aislado puede colocarse con el meristemo hacia abajo en el que el trozo se corta del extremo opuesto del meristemo. El posicionamiento se puede realizar manualmente o de manera automatizada mediante movimiento mecánico, puesta en acción, etc. La automatización puede incluir el uso de robótica, sistemas de visión o una combinación de ambos.

25 El trozo de tejido de escutelo puede analizarse para una o más características seleccionadas del grupo que consiste en: un marcador genético, un polimorfismo de un solo nucleótido, una repetición de secuencia simple, un polimorfismo de longitud de fragmento de restricción, un haplotipo, una etiqueta SNP, un alelo de un marcador genético, un gen, una secuencia derivada de ADN, una secuencia derivada de ARN, un promotor, una región no traducida 5' de un gen, una región no traducida 3' de un gen, microARN, ARNpi, un QTL, un marcador satélite, un transgén, ARNm, ARNm bicatenario, un perfil transcripcional, un patrón de metilación y nivel de ploidía.

30 Se describen también métodos para analizar un embrión aislado de una planta dicotiledónea. En tales métodos, se extrae un trozo de tejido de cotiledón de un embrión aislado, en el que dicha escisión no causa una reducción significativa en el potencial de germinación del embrión. El trozo de tejido de cotiledón se analiza luego para detectar la presencia o ausencia de una o más características indicativas de al menos un rasgo genético.

35 El embrión aislado puede ser inmaduro y puede ser de canola, soja, girasol, alfalfa o algodón. El embrión aislado puede obtenerse directamente de una semilla, o puede derivarse de otros tejidos. El embrión aislado puede ser fresco o enfriado. El embrión aislado es viable y puede germinar en una planta después de que se corta dicho trozo de tejido de cotiledón. El embrión aislado puede ser de cualquier ploidía, tal como, por ejemplo, un haploide, diploide, haploide duplicado, aneuploidía, tetraploide, hexaploide u octaploide.

40 El trozo de tejido de cotiledón cortado del embrión aislado puede ser liofilizado, fresco, congelado o enfriado después del muestreo.

El trozo de tejido de cotiledón puede ser igual o mayor que un solo núcleo.

45 La escisión del tejido de cotiledón puede ocurrir por cualquier medio conocido en la técnica, tal como, por ejemplo: una broca, un chorro de agua, un láser, una sola cuchilla, un conjunto de cuchillas opuestas, una jeringa, un muestreador de núcleos (herramienta de extracción de núcleos), un bisturí, un alambre de diámetro pequeño, un cable de alambre texturizado de diámetro pequeño, una espátula y un hisopo. La escisión puede realizarse manualmente o mediante un proceso automatizado.

50 El trozo de tejido de cotiledón puede analizarse para una o más características seleccionadas del grupo que consiste en: un marcador genético, un polimorfismo de un solo nucleótido, una repetición de secuencia simple, un polimorfismo de longitud de fragmento de restricción, un haplotipo, una etiqueta SNP, un alelo de un marcador genético, un gen, una secuencia derivada de ADN, una secuencia derivada de ARN, un promotor, una región no traducida 5' de un gen, una región no traducida 3' de un gen, microARN, ARNpi, un QTL, un marcador satélite, un transgén, ARNm, ARNm bicatenario, un perfil transcripcional, un patrón de metilación y nivel de ploidía.

Descripción detallada

65 Como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno, una" y "el, la" incluyen una referencia plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por

ejemplo, la referencia a "una planta" incluye una pluralidad de tales plantas, la referencia a "una célula" incluye una o más células y equivalentes de las mismas conocidas por los expertos en la materia, y así sucesivamente.

Como se usa en el presente documento:

- 5 "Callo" se refiere a una masa proliferativa desdiferenciada de células o tejidos.
- Las expresiones "en contacto", "entra en contacto con" o "puesto en contacto con" pueden usarse para significar "contacto directo" o "contacto indirecto". Por ejemplo, el medio que comprende un agente de duplicación puede tener contacto directo con la célula haploide o el medio que comprende el agente de duplicación puede separarse de la célula haploide mediante papel de filtro, tejidos vegetales u otras células, por lo que el agente de duplicación se transfiere a través del papel filtro o células a la célula haploide.
- 10 Una planta "diploide" tiene dos conjuntos (genomas) de cromosomas y el número de cromosomas (2n) es igual al del cigoto.
- 15 Un "haploide duplicado" o planta o célula haploide duplicada es aquella que se desarrolla duplicando un conjunto de cromosomas haploides. Una planta o semilla que se obtiene de una planta haploide duplicada que es autofecundada en cualquier número de generaciones aún puede identificarse como una planta haploide duplicada. Una planta haploide duplicada se considera una planta homocigota. Se considera que una planta es un haploide duplicado si es fértil, incluso si toda la parte vegetativa de la planta no consiste en las células con el conjunto de cromosomas duplicado. Por ejemplo, una planta se considerará una planta haploide duplicada si contiene gametos viables, incluso si es quimérica.
- 20 Un "embrión haploide duplicado" es un embrión que tiene una o más células que contienen 2 conjuntos de cromosomas homocigotos.
- La "embriogénesis" puede definirse como el proceso de iniciación, proliferación y/o desarrollo del embrión.
- 30 "Embriogénico", en el contexto de células o tejidos, significa que las células o tejidos pueden ser inducidos a formar embriones de plantas viables en condiciones de cultivo apropiadas.
- La "germinación" se refiere al proceso de desarrollo del embrión de una semilla en una planta. La germinación puede ocurrir *in vitro* o *in vivo*.
- 35 El "potencial de germinación" se puede definir como la capacidad de un embrión para completar la germinación. La frase "sin una reducción significativa en el potencial de germinación" se refiere al hecho de que se desarrollará una planta normal. Una planta normal se puede definir como una que puede establecer semillas con éxito.
- 40 Una planta "haploide" tiene un conjunto único (genoma) de cromosomas y el número de cromosomas (n) es igual al del gameto.
- Un "embrión aislado" es un embrión que no está asociado con una semilla. Esto puede ocurrir debido a la eliminación de un embrión de una semilla o porque el embrión se deriva de otros tejidos a través de la embriogénesis somática o gamética (microspora).
- 45 Un embrión "maduro" se refiere a un embrión que ha completado la embriogénesis en el que dicho embrión maduro está deshidratado y metabólicamente inactivo. Un embrión "inmaduro" se refiere a un embrión desde el inicio de la división del óvulo hasta el final de la embriogénesis.
- 50 El término "embrión somático maduro" se refiere a un embrión completamente desarrollado derivado de tejido somático, con evidencia de ápices de raíz y brote y que exhibe una estructura bipolar. En las monocotiledóneas, el embrión somático maduro tendrá un escutelo.
- 55 El término "medio" incluye compuestos en estado líquido, gaseoso o sólido.
- Los términos "monocotiledónea" y "planta monocotiledónea" se usan indistintamente en este documento.
- Los términos "dicotiledónea" y "planta dicotiledónea" se usan indistintamente en el presente documento.
- 60 Como se usa en el presente documento, el término "planta" incluye referencias a plantas enteras, órganos de plantas (por ejemplo, hojas, tallos, raíces, etc.), semillas y células vegetales y la progenie de las mismas. "Célula vegetal", como se usa en el presente documento, incluye, sin limitación, semillas, cultivos en suspensión, embriones, regiones meristemáticas, tejido calloso, hojas, raíces, brotes, gametofitos, esporofitos, polen y microsporas.
- 65

El término "embrión somático primario" se refiere a un embrión somático que se origina en tejidos distintos de los de otro embrión somático. Por "embrión somático" se entiende un embrión formado *in vitro* a partir de células somáticas o células embriogénicas por división celular mitótica.

5 "Muestreo de escutelo" se refiere a la escisión de una porción escutelar de un embrión.

El "muestreo de cotiledones" se refiere a la escisión de una porción de cotiledones de un embrión.

10 El término "embriogénesis somática" se refiere al proceso de iniciación y desarrollo de embriones *in vitro* a partir de células y tejidos vegetales sin reproducción sexual.

Pasando ahora a la divulgación:

15 El muestreo de embriones permite la caracterización molecular al inicio del desarrollo de la planta, permitiendo que la selección de un genotipo deseado se realice semanas, incluso meses antes que otros métodos de muestreo, actualmente empleados. En consecuencia, los recursos pueden enfocarse primero en embriones que tienen la mayor probabilidad de convertirse en plantas deseables.

20 El escutelo es el cotiledón modificado de plantas de la familia Poaceae, una gran familia de plantas con flores monocotiledóneas. Es una estructura en forma de escudo que rodea el eje embrionario y tiene diversas funciones. Durante la formación de la semilla, el escutelo actúa como un órgano de almacenamiento que acumula principalmente lípidos, pero también proteínas y almidón. Luego, durante la germinación, el escutelo secreta tanto hormonas que inducen la producción de enzimas hidrolíticas en la capa de aleurona como enzimas que ayudan a la digestión de las reservas de endospermo. Además, el escutelo también transporta los nutrientes digeridos desde el endospermo al eje embrionario.

25 El escutelo tiene una alta densidad celular y, por lo tanto, más núcleos por unidad de tejido en comparación con el tejido de la hoja, lo que da como resultado una mayor concentración de ADN. La alta densidad de ADN hace que el tejido del escutelo sea una excelente fuente para la extracción de ADN genómico; sin embargo, los esfuerzos anteriores no se han centrado en el tejido del escutelo como fuente de muestreo porque se pensó que la eliminación de una parte del escutelo tendría graves consecuencias en el desarrollo del embrión.

30 Se proporcionan métodos para analizar un embrión de una planta monocotiledónea, en los que se extrae o se corta un trozo de tejido de escutelo del embrión inmaduro aislado. Los cotiledones de embriones aislados de plantas dicotiledóneas también se pueden muestrear de manera similar. Como tal, los métodos de análisis de un embrión de una planta dicotiledónea también se describen en el presente documento, en los que se extrae o se corta un trozo de tejido de cotiledón del embrión aislado.

35 Cuando se corta un trozo de tejido de escutelo o cotiledón de un embrión aislado, se debe tener cuidado de eliminar el tejido sin dañar las regiones meristemáticas del embrión. Esto permitirá que el embrión continúe desarrollándose, con una interrupción mínima, en una planta normal (es decir, el embrión no tiene una reducción significativa en el potencial de germinación).

40 Los métodos de la divulgación actual pueden comprender además tratar los embriones muestreados para mantener el potencial de germinación. Tal tratamiento generalmente puede incluir cualquier medio conocido en la técnica para proteger un embrión, o una planta o plántula derivada de un embrión, de las condiciones ambientales durante el almacenamiento o el transporte. Por ejemplo, los embriones muestreados pueden tratarse con un polímero y/o un fungicida para proteger el embrión muestreado durante el almacenamiento o el transporte.

45 Los métodos de la divulgación actual pueden comprender además unir un identificador al receptáculo que contiene la muestra, así como al receptáculo que contiene el embrión aislado del que se extrajo la muestra. Esto mantiene la identidad de la muestra y el embrión, lo que les permite realizar un seguimiento adecuado de manera que la muestra siempre esté asociada con el embrión del que se extrajo. El identificador puede ser un código de barras o una etiqueta impresa.

50 En los métodos de la divulgación, una muestra puede ser cortada o removida de un embrión inmaduro aislado de una planta monocotiledónea en la que dicha muestra es un trozo de tejido de escutelo. La planta monocotiledónea puede ser, entre otras, maíz, sorgo, trigo, arroz, cebada, avena, centeno, mijo, caña de azúcar, triticale o pasto varilla.

55 El embrión aislado se puede obtener de una semilla (es decir, embriogénesis cigótica) o se puede "derivar de otros tejidos" a través de la embriogénesis somática o gamética (microsporas). La embriogénesis somática se relaciona con la embriogénesis que surge de las células somáticas (es decir, células vegetativas o no gaméticas), es decir, de explantes somáticos aislados, mientras que la embriogénesis gamética se relaciona con la embriogénesis que surge de las células gaméticas (es decir, microsporas). Dado que las células somáticas y gaméticas no son naturalmente embriogénicas, se deben inducir estas células para que se vuelvan embriogénicas. La conversión a células embriogénicas puede lograrse mediante estímulos externos tales como auxina, citoquinina, cambios de pH,

reguladores del crecimiento y iones de metales pesados (Yeung, 1995 En: Thorpe TA (ed) In Vitro Embryogenesis in Plants (páginas 205-249; Dodeman et al., (1997) J. Exp. Bot. 48: 1493-1509.

5 El embrión aislado debe ser viable y capaz de germinar en una planta después de que se corta el trozo de escutelo o tejido de cotiledón, para embriones de monocotiledóneas y dicotiledóneas, respectivamente. El embrión aislado puede ser de cualquier ploidía que pueda existir en una planta monocotiledónea de la descripción. Por ejemplo, el embrión aislado puede ser un haploide, diploide, haploide duplicado, aneuploide, tetraploide, hexaploide u octaploide.

10 Se puede apreciar que un embrión aislado puede o no ser muestreado inmediatamente después del aislamiento. Por lo tanto, el embrión aislado puede ser fresco o enfriado antes y/o durante el muestreo.

15 Se puede hacer referencia a los métodos de muestreo en el presente documento en diferentes términos (usados indistintamente en el presente documento), tales como, por ejemplo, muestreo, corte, astillado, cercenamiento, rebanado, corte o biselado o remoción de una muestra. El muestreo del escutelo puede realizarse por cualquier medio conocido en la técnica, tal como, por ejemplo: una broca, un chorro de agua, un láser, una sola cuchilla, un conjunto de cuchillas opuestas, una jeringa, un muestreador de núcleo (herramienta de extracción de núcleos), un bisturí, un alambre de diámetro pequeño, un cable de alambre con textura de diámetro pequeño, una espátula y un hisopo. Además, el muestreo puede realizarse manualmente o mediante un proceso automatizado.

20 La automatización de la escisión del trozo de escutelo o tejido de cotiledón puede incluir uno o más de los siguientes: a) determinar la ubicación y orientación de un embrión aislado a partir de una pluralidad de embriones aislados usando un instrumento de visión automatizado; b) determinar las especificaciones físicas de un embrión aislado (por ejemplo, longitud, ancho, área superficial, espesor y forma) utilizando un instrumento de visión automatizado; c) orientar un embrión aislado en/sobre una ubicación prescrita utilizando agarre neumático/de vacío o manipulación mecánica/física; d) orientar la herramienta de escisión en relación con un embrión aislado, ya sea físicamente, o en el caso de una herramienta de escisión guiada por láser, ópticamente; e) accionar la herramienta o mover un embrión aislado a través de la herramienta para extraer la muestra; f) colocar la muestra y el embrión restante en recipientes separados; g) rastrear la muestra y el embrión restante en relación uno con el otro para su uso y selección en el proceso de reproducción; h) limpieza y/o esterilización de la herramienta para evitar la contaminación cruzada o el crecimiento bacteriano; i) eliminación de la herramienta si no se realiza la limpieza y/o esterilización; j) colocación de un fragmento de una herramienta en un recipiente para análisis directo en el que la muestra está en/sobre dicho fragmento de manera que el fragmento de la herramienta no interfiera con la extracción (por ejemplo, con un alambre utilizado para raspar o perforar un embrión aislado que luego se corta en una placa de laboratorio para extracción de ADN); y k) enjuague de la herramienta en medios de extracción.

35 Si se usa un cable de diámetro pequeño, el cable de diámetro pequeño puede tener menos de 1 mm de diámetro, y el cable puede estar frío o caliente. El cable también se puede conformar en una estructura que facilite el muestreo.

40 Se puede usar cualquier láser conocido por un experto habitual en la técnica para cortar tejido biológico. Los láseres que cortan en el rango de nanosegundos y picosegundos son adecuados para su uso en los métodos de la divulgación. Otro tipo de láser que se puede usar es un láser de femtosegundos. Los láseres de femtosegundos tienen anchos de pulso en el dominio de femtosegundos (1 fs = 10^{-15} segundos), lo que produce un corte estrecho y minimiza la zona afectada por el calor, evitando así el daño por calor al material que se está cortando.

45 La "muestra" también puede describirse en el presente documento como una célula, un núcleo, un trozo, un clip, un chip, una astilla, una parte, una porción, un fragmento, una sección, una rebanada o cualquier otro término refiriéndose a un trozo monolítico que puede separarse de un embrión sin destruir la viabilidad del embrión o su potencial para convertirse en una planta sana (es decir, potencial de germinación). La muestra cortada del embrión aislado puede ser liofilizada, fresca, congelada o enfriada después del muestreo.

50 El tamaño del trozo de tejido de escutelo cortado del embrión aislado puede ser igual o mayor que un solo núcleo. El trozo de tejido de escutelo también puede ser una célula desprendida o menos del 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100% del escutelo total. El tamaño del trozo puede ser cualquier porción del escutelo que no cause una reducción significativa en el potencial de germinación del embrión aislado.

60 El tamaño del trozo de tejido de cotiledón cortado del embrión de dicotiledónea aislado puede ser igual o mayor que un solo núcleo. El trozo de tejido de cotiledón también puede ser una célula desprendida o menos del 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100% de la cantidad total de tejido de cotiledón. El trozo puede ser de uno de los dos cotiledones o de ambos cotiledones.

La muestra puede tomarse de cualquier área del escutelo, y el embrión monocotiledóneo aislado puede colocarse con el meristemo hacia abajo en el que el trozo de escutelo se corta desde el extremo opuesto del meristemo.

De manera similar, el muestreo puede tomarse de cualquier área del cotiledón o cotiledones del embrión de dicotiledónea aislado. El embrión de dicotiledónea aislado puede colocarse de tal manera que evite dañar el meristemo.

El posicionamiento puede realizarse manualmente o de forma automatizada usando movimiento mecánico, accionamiento, etc. La automatización puede incluir el uso de robótica, sistemas de visión o una combinación de ambos.

El trozo de tejido de escutelo o cotiledón puede analizarse para una o más características indicativas de un rasgo genético. El rasgo genético puede incluir, entre otros, un marcador genético, un polimorfismo de un solo nucleótido, una repetición de secuencia simple, un polimorfismo de longitud de fragmento de restricción, un haplotipo, una etiqueta SNP, un alelo de un marcador genético, un gen, una secuencia derivada de ADN, una secuencia derivada de ARN, un promotor, una región no traducida 5' de un gen, una región no traducida 3' de un gen, microARN, ARNpi, un QTL, un marcador satélite, un transgén, ARNm, ARNm bicatenario, un perfil transcripcional, un patrón de metilación y un nivel de ploidía.

Se puede extraer ADN de la muestra usando cualquier método de extracción de ADN conocido por los expertos en la materia que proporcionará suficiente rendimiento de ADN, calidad de ADN, respuesta de PCR y respuesta de métodos de secuenciación. Esto puede incluir, entre otros: extracto de N Amp (Sigma-Aldrich), protocolo estándar de CTAB, métodos HotShot, etc. Además, el ADN extraído puede amplificarse después de la extracción utilizando cualquier método de amplificación conocido por los expertos en la materia.

Además, el ARN puede extraerse de la muestra usando cualquier método de extracción de ARN conocido por los expertos en la materia que proporcionará suficiente rendimiento de ARN, calidad de ARN, respuesta de PCR y respuesta de métodos de secuenciación. Además, el ARN extraído puede amplificarse después de la extracción usando cualquier método de amplificación conocido por los expertos en la materia.

Los ácidos nucleicos extraídos pueden analizarse para detectar la presencia o ausencia de un polimorfismo genético adecuado. Una amplia variedad de marcadores genéticos para el análisis de polimorfismos genéticos están disponibles y son conocidos por los expertos en la materia. Como se usa en el presente documento, los marcadores genéticos incluyen, pero no se limitan a, repeticiones de secuencia simple (SSR), polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), inserciones o eliminaciones (indels), perfiles transcripcionales y secuencias de ácido nucleico. Se puede usar un análisis de ácido nucleico para detectar la presencia o ausencia del marcador genético para la selección de embriones como parte de un programa de mejoramiento o un programa de reproducción. El análisis puede usarse para seleccionar embriones que albergan genes, QTL, alelos o haplotipos de interés. Los métodos de análisis son conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, métodos de detección basados en PCR (tales como, por ejemplo, ensayos TaqMan), métodos de microarreglos y métodos de secuenciación de ácido nucleico. Los genes, alelos, QTL o haplotipos también pueden identificarse utilizando nuevas técnicas de biología molecular.

Métodos que usan muestreo de embriones

Los métodos de la presente divulgación usan el muestreo de embriones para contribuir a las actividades de mejora del germoplasma, que incluyen pero no se limitan a: economización de programas haploides duplicados seleccionando solo embriones preferidos para duplicar, análisis de material haploide y haploide duplicado para características genotípicas, integración de rasgos y evaluación, y reproducción asistida por marcadores.

Las plantas haploides duplicadas (DH) proporcionan una herramienta invaluable para los reproductores de plantas, particularmente para generar líneas endogámicas. Se ahorra una gran cantidad de tiempo ya que las líneas homocigotas se generan esencialmente instantáneamente, lo que elimina la necesidad de una reproducción convencional multigeneracional.

Sin embargo, es bien sabido en la técnica que el proceso de producción de DH es ineficiente y puede ser bastante laborioso. Si bien las plantas haploides duplicadas pueden ocurrir espontáneamente en la naturaleza, esto es extremadamente raro. La mayoría de las aplicaciones de investigación y reproducción se basan en métodos artificiales de producción de DH. La etapa inicial implica la haploidización de la planta que da como resultado la producción de una población que comprende semilla haploide. Las líneas no homocigotas se cruzan con un padre inductor, lo que da como resultado la producción de semilla haploide. La semilla que tiene un embrión haploide, pero el endospermo triploide normal, avanza a la segunda etapa. Es decir, las semillas y plantas haploides son cualquier planta con un embrión haploide, independiente del nivel de ploidía del endospermo. Después de seleccionar las semillas haploides de la población, las semillas seleccionadas experimentan duplicación del cromosoma para producir semillas haploides duplicadas. Una duplicación cromosómica espontánea en un linaje celular conducirá a la producción normal de gametos o la producción de gametos no reducidos a partir de linajes celulares haploides. La aplicación de un compuesto químico, tal como la colchicina, se puede utilizar para aumentar la tasa de

diploidización. La colchicina se une a la tubulina y evita su polimerización en microtúbulos, deteniendo así la mitosis en la metafase, y puede usarse para aumentar la tasa de diploidización, es decir, la duplicación del número de cromosomas. Estas plantas quiméricas se autopolinizan para producir semilla diploide (haploide duplicada). Esta semilla DH se cultiva y posteriormente se evalúa y se usa en la producción híbrida de pruebas de cruzamiento.

5 Los métodos de la presente descripción facilitan el potencial de selección en la etapa haploide así como en la etapa haploide duplicada. Como parte de un programa haploide duplicado, se aíslan embriones haploides inmaduros, y los embriones haploides se ponen en contacto con un agente duplicador tal como la colchicina u otro agente conocido en la técnica. El muestreo se puede realizar antes de la exposición al agente de duplicación o después. Con el
10 primero, los embriones muestreados antes de la duplicación pueden identificarse como candidatos para duplicación en función del resultado del muestreo. Con este último, tan pronto como se haya completado la fase de duplicación, es necesario transferir los embriones seleccionados del medio de duplicación a un medio sin agente de duplicación, tal como por ejemplo, medio de germinación. En esta etapa, es conveniente y económico remover un trozo de escutelo o tejido de cotiledón para el análisis molecular. Los métodos presentados en este documento permiten
15 tomar decisiones de avance temprano en el proceso haploide duplicado.

Los métodos de la divulgación pueden integrarse fácilmente en cualquier proceso de rescate de embriones en el que un embrión se aísla y luego se cultiva.

20 Por ejemplo, en la reproducción de plantas, el uso de técnicas de rescate de embriones disminuye significativamente el tiempo que lleva transferir un rasgo beneficioso de un progenitor donante a un progenitor recurrente con el trasfondo genético deseado (Wang et al., 2011. Plant Breeding 130: 569-573). Las técnicas implican cultivar embriones inmaduros en un medio nutritivo que puede complementarse o no con un agente selectivo para detectar
25 explantes transgénicos, trasplantar los embriones o plántulas derivadas del mismo a un entorno de crecimiento controlado durante un período de tiempo suficiente y luego trasplantar las plántulas al campo. Antes del gasto de recursos, es conveniente y económico retirar un trozo de tejido de escutelo o cotiledón de los embriones inmaduros para el análisis molecular a fin de identificar aquellos embriones que producirán plantas con rasgos deseables.

Ejemplos

30 La presente invención se ilustra adicionalmente en los siguientes Ejemplos, en los que las partes y los porcentajes son en peso y los grados son Celsius, a menos que se indique lo contrario. Debe entenderse que estos ejemplos, aunque indican realizaciones de la invención, se presentan solo a modo de ilustración. A partir de la discusión anterior y estos Ejemplos, un experto en la materia puede determinar las características esenciales de esta
35 invención, y puede hacer varios cambios y modificaciones de la invención para adaptarla a diversos usos y condiciones. Por lo tanto, diversas modificaciones de la invención además de las mostradas y descritas en el presente documento serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción anterior. Dichas modificaciones también pretenden caer dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 1

Muestreo de escutelo para obtener ADN para análisis molecular (Monocotiledóneas). Muestreo de escutelo

45 Se cortó tejido de escutelo de embriones inmaduros de aproximadamente 2-4 mm de tamaño y luego se colocó en el medio. Las muestras se colocaron en el refrigerador al menos una semana antes de extraer el ADN, y las porciones restantes de los embriones de maíz se plantaron en la estructura de sombrío.

Extracción de ADN y prueba del marcador

50 Se extrajeron muestras del medio con pinzas y se enjuagaron en agua para HPLC y luego se secaron. Las muestras se colocaron luego en tubos de muestra dentro de una placa de 96 pozos. El tejido de la hoja de genotipo desconocido también se agregó a los tubos de muestra desocupados en la placa de 96 pozos como medio de comparación. Se hicieron dos placas por duplicado a partir de la misma placa fuente. Se utilizó una etapa de molienda adicional para garantizar que las muestras se molieran bien. Se utilizaron dos protocolos de extracción
55 diferentes en cada tipo de tejido, el protocolo de extracción de ADN HotShot y el protocolo de extracción SbeadEx. Inicialmente, se probaron treinta y dos marcadores SNP utilizando una plataforma Invader Plus.

60 Los resultados obtenidos muestran que hay suficiente ADN extraído de cada muestra de escutelo para realizar análisis de marcadores moleculares, y de hecho, las muestras de escutelo se amplificaron con la misma "intensidad" que las muestras de hoja en la misma placa.

Rendimiento de plantas derivadas de embriones muestreados

65 El desarrollo se retrasó dentro de la primera semana de germinación; sin embargo, la demora fue temporal y no se pudo detectar una semana después de colocarla en la estructura de sombrío.

Ejemplo 2

Análisis comparativo entre el muestreo de escutelo y el muestreo de hojas para el análisis molecular

- 5 Se cortó una muestra de tejido de escutelo de cada embrión inmaduro usando un bisturí nuevo y estéril. Las muestras se colocaron en placas de campo y luego se colocaron en tubos usando hisopos de algodón nuevos y estériles. También se recolectaron muestras de hojas de plantas haploides duplicadas en el campo y luego se congelaron. Se presentaron dos perforaciones de hoja por muestra.
- 10 Se usaron dos protocolos de extracción diferentes en cada tipo de tejido, el protocolo de extracción de ADN HotShot y el protocolo de extracción SbeadEx. El ADN extraído se procesó con cuarenta y ocho marcadores SNP de producción. La concordancia estuvo dentro de los estándares de producción con solo 0,22% de giros (es decir, llamadas de alelos incorrectos). Además, las muestras de hojas y escutelo se realizaron dentro de los estándares de producción de menos del 5% NF (no encontrados). Los heterocigotos (Hets) se puntuaron como equívocos ya que
- 15 las muestras eran muestras haploides duplicadas.

Tabla 1: Desempeño del marcador: comparación entre muestras de escutelo y de hoja

	Protocolo de extracción	
	HotShot	SbeadEx
<i>Escutelo</i>		
Señal baja	1,51%	0,27%
% de Het	0,10%	0,05%
<i>Hoja</i>		
Señal baja	1,20%	0,17%
% de Het	0,36%	2,42%

Ejemplo 3

- 20 Muestreo de cotiledones (embriones de dicotiledóneas) para obtener ADN para el análisis molecular
- 25 Se cortó tejido de cotiledón de embriones de canola inmaduros derivados de microsporas y se colocó en el medio. Las muestras se retiraron del medio con pinzas y se enjuagaron en agua para HPLC y luego se secaron. Las muestras se colocaron luego en tubos de muestra dentro de una placa de 96 pozos. El tejido de la hoja de genotipo desconocido también se agregó a los tubos de muestra desocupados en la placa de 96 pozos como medio de comparación. Se hicieron dos placas por duplicado a partir de la misma placa fuente. Se utilizó una etapa de molienda adicional para garantizar que las muestras se molieran bien. Se utilizaron dos protocolos de extracción diferentes en cada tipo de tejido, el protocolo de extracción de ADN HotShot y el protocolo de extracción SbeadEx.
- 30 Se probaron ocho marcadores SNP utilizando una plataforma Invader Plus.
- 35 El ADN extraído (usando el método de extracción SbeadEx o HotShot) se procesó con ocho marcadores SNP de producción. Los resultados se muestran en la Tabla 3. El método SbeadEx dio como resultado un alto % de NF (es decir, no encontrado). El método de extracción HotShot proporcionó resultados ligeramente fuera del intervalo aceptable (<5% NF) para los embriones inmaduros pequeños, pero esto fue aún mejor que los resultados obtenidos con el tejido de la hoja. Las muestras "pequeñas" se desempeñaron mejor que las muestras "grandes". En general, los resultados mostraron que hay suficiente ADN extraído de cada muestra de cotiledón para realizar el análisis de marcadores moleculares.
- 40 Con respecto al desarrollo adicional de los embriones, no se observaron eventos de desarrollo inesperados.

Tabla 3: Resultados del análisis de marcadores SNP usando ADN obtenido de tejido de cotiledón

	HotShot
<i>Muestras pequeñas de embriones inmaduros</i>	
Señal baja	4,17%
% de Het	0,97%
% NF	5,14%
<i>Muestras grandes de embriones inmaduros</i>	
Señal baja	7,89%
% de Het	0,22%
% NF	8,11%
<i>Hoja</i>	
Señal baja	6,03%
% de Het	0,60%
% NF	6,63%

REIVINDICACIONES

1. Un método para analizar un embrión aislado de una planta monocotiledónea que comprende:
- 5 a. cortar un trozo de tejido de escutelo de un embrión inmaduro aislado en el que dicha escisión no causa una reducción significativa en el potencial de germinación de dicho embrión aislado; y
b. analizar ácidos nucleicos extraídos, y opcionalmente amplificados, del trozo de tejido de escutelo en busca de la presencia o ausencia de una o más características indicativas de al menos un rasgo genético,
- 10 en el que dicho embrión aislado es capaz de germinar en una planta después de que dicho trozo de tejido es cortado
2. El método de la reivindicación 1, en el que dicha planta monocotiledónea es maíz, sorgo, trigo, arroz, cebada, avena, centeno, mijo, caña de azúcar, triticale o pasto varilla.
- 15 3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicho embrión aislado se obtiene de una semilla o se deriva de otros tejidos.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho embrión aislado es fresco o enfriado.
- 20 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho trozo de tejido de escutelo es liofilizado, fresco, congelado o enfriado después del muestreo.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho trozo de tejido de escutelo es igual o mayor que un solo núcleo.
- 25 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha escisión se realiza usando una herramienta seleccionada del grupo que consiste en: una broca, un chorro de agua, un láser, una sola cuchilla, un juego de cuchillas opuestas, una jeringa, un muestreador de núcleos (herramienta de extracción de núcleos), un bisturí, un alambre de diámetro pequeño, un cable de alambre texturizado de diámetro pequeño, una espátula y un hisopo.
- 30 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicha escisión se realiza mediante un proceso automatizado.
- 35 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho trozo de tejido de escutelo se analiza para una o más características seleccionadas del grupo que consiste en: un marcador genético, un polimorfismo de un solo nucleótido, una repetición de secuencia simple, un polimorfismo de longitud de fragmento de restricción, un haplotipo, una etiqueta SNP, un alelo de un marcador genético, un gen, una secuencia derivada de ADN, una secuencia derivada de ARN, un promotor, una región no traducida 5' de un gen, una región no traducida 3' de un gen, microARN, ARNpi, un QTL, un marcador satélite, un transgén, ARNm, ARNm bicatenario, un perfil transcripcional, un patrón de metilación y nivel de ploidía.
- 40