

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 857 005**

51 Int. Cl.:

A01H 1/04 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.01.2015 PCT/EP2015/050299**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.07.2015 WO15104358**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.01.2015 E 15700539 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.12.2020 EP 3091831**

54 Título: **Método de muestreo de embriones**

30 Prioridad:

09.01.2014 US 201461925277 P

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

28.09.2021

73 Titular/es:

SYNGENTA PARTICIPATIONS AG (100.0%)

Rosentalstrasse 67

4058 Basel, CH

72 Inventor/es:

**BULLOCK, WILLIAM PAUL;
HANNAPPEL, ULRICH STEPHAN;
HUNTER, KATIE MARIE y
HEJLIK, CHRISTOPHER CODY**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 857 005 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**Método de muestreo de embriones**

El cultivo selectivo de las plantas de maíz se ha vuelto cada vez más dependiente de a) procesos con haploides dobles (DH, por sus siglas en inglés) para crear rápidamente líneas progenitoras endogámicas de línea genéticamente pura, b) la consolidación de los loci de rasgos cuantitativos en líneas de maíz individuales y c) la introgresión de transgenes en líneas endogámicas comerciales deseadas. Con respecto a estos objetivos, uno de los desafíos del cultivo selectivo de plantas comerciales es la rápida aceleración de los procesos de cultivo descritos anteriormente. En particular, la incapacidad de generar selecciones genéticas o cultivos selectivos basados en el genotipo o la constitución/composición bioquímica de las plantas poco después del desarrollo de las semillas impone un tiempo, recursos y restricciones y costos de insumos. Por ejemplo, el retraso del progreso del cultivo selectivo u otras decisiones de selección crea unos desafíos significativos en los procesos de gestión, debido a que se debe trabajar con grandes poblaciones de semillas y plantas individuales debido a la incapacidad de realizar antes en los procesos de cultivo selectivo decisiones de selección en función de los resultados.

La presente solicitud ilustra métodos que 1) proporcionan una identificación muy temprana de individuos seleccionados genéticamente o según su composición y 2) favorece la viabilidad/capacidad de germinación de estos individuos. Más específicamente, se someten a ensayo el tejido del escutelo y/o del eje embrionario o contenidos celulares derivados de embriones de maíz inmaduros (entre aproximadamente 5 y 24 días después de la polinización, donde el intervalo depende parcialmente de las condiciones ambientales de cultivo) para determinar su genotipo o composición bioquímica. Después del muestreo tisular o de la retirada del contenido celular, los embriones resultantes son relativamente capaces de germinar y desarrollarse para formar plantas de maíz normales.

En la bibliografía se hace referencia a la extracción de ADN a partir de embriones, pero no se indica cómo realizar esto de manera eficaz. Por ejemplo, Jordano y Godoy, en "Lab protocols for DNA extraction and genotyping of SSR microsatellites for *Prunus mahaleb* (Rosaceae) seeds and *Quercus* acorns" (2005) describen la extracción del ADN a partir de embriones enteros y, de esta manera, no se conserva la viabilidad. Sparks *et al.*, *Plant Physiology* diciembre, vol. 133 n.º 4, 1809-1819 (2003) también describe la extracción de ADN a partir de embriones. Nuevamente, no se conserva la viabilidad. La solicitud de patente WO2011/019863 A1 analiza la extracción automática de embriones a partir de semillas de maíz. Sin embargo, no reivindica o describe la "conservación de la viabilidad" de los embriones después de la retirada del tejido. La patente no describe ningún método específico que se refiera a la manera de aislar células a partir de los embriones. La patente US 8312672 describe el problema, pero propone analizar tejido endospermico (desprendiendo fragmentos pequeños de las semillas) para obtener la huella genética del embrión.

El muestreo tisular y los procesos de muestreo del contenido celular descritos posteriormente hacen posible 1) una adquisición temprana de datos genéticos y bioquímicos a partir de los cuales se pueden tomar decisiones relativas al cultivo selectivo en función de los datos, 2) procesos para el muestreo tisular y del contenido celular, 3) la minimización de los pasos de purificación de ADN requeridos, 4) la reducción del costo por extracción de ADN, 5) permiten el uso directo del ADN resultante para un análisis por PCR, 6) un método de muestreo tisular y de muestreo del contenido celular que conserve la viabilidad y que se utilice con tejidos vegetales muy inmaduros y embriones de maíz inmaduros, y 6) métodos que puedan automatizarse fácilmente.

La metodología que los inventores de la presente solicitud han desarrollado ilustra cómo podría realizarse de manera eficaz la extracción del ADN. Los métodos pueden clasificarse según la metodología de extracción: 1) desorganización química moderada de las células/tejidos organizados, de modo que el ADN y otro tipo de contenido celular eluya desde parte del tejido embrionario hasta la solución circundante y 2) medios mecánicos que retiren el tejido y/o contenidos celulares de las regiones del escutelo o eje embrionario de embriones de maíz inmaduros. Singularmente, con cada uno de estos métodos de extracción se consigue una capacidad de germinación donde se conserva la viabilidad de los embriones inmaduros muestreados.

En términos generales, la metodología incluye una serie de pasos: 1) extracción de embriones inmaduros, 2) extracción del tejido/ADN/contenido celular mediante extracción ya sea a) empapando un embrión en una solución que provoque la salida del ADN y el contenido celular desde las células/tejidos organizados, ya sea b) electroporando embriones inmaduros de modo que se provoque la salida de los contenidos celulares o ya sea c) muestreando el tejido del escutelo inmaduro mediante penetraciones o abrasiones o rascado o laminado o extrayendo fragmentos sólidos (*plugging*), 3) opción de automatizar los procesos mencionados anteriormente y 4) tasas más elevadas de germinación de embriones. A modo de una serie de pasos, los inventores proporcionan varios métodos para procesos de extracción del tejido/ADN y contenido que conserven la viabilidad que proporcionan la oportunidad de realizar decisiones de selección en función de los datos genéticos en una de las maneras más precoces posibles.

ALCANCE DE LA INVENCIÓN

Se proporciona un método de muestreo de un embrión vegetal inmaduro no destructivo que conserva la viabilidad, que comprende el paso de retirar una muestra tisular que comprende al menos una porción del escutelo, donde el contenido celular obtenido mediante el muestreo de tejido se somete a análisis genético, químico o bioquímico, y donde los embriones extraídos se colocan en almacenamiento en estasis para conseguir un estado latente hasta que

se conozca el resultado del análisis genético, químico o bioquímico. En una realización, el embrión es un embrión haploide. En una realización, el embrión es un embrión diploide.

5 También se divulga un método de muestreo de un embrión vegetal no destructivo que conserva la viabilidad, que comprende el paso de liberar y recoger células o directamente liberar los contenidos celulares de las regiones del escutelo y/o eje embrionario del embrión inmaduro. En una realización, el embrión inmaduro es un embrión de maíz inmaduro. En una realización, los embriones se extraen de mazorcas de maíz entre los días 8 y 24 después de la polinización. En una realización, los embriones tienen un tamaño entre aproximadamente 1 y 6 mm. En una realización preferida, los embriones tienen un tamaño entre 2 y 6 mm.

10 En una realización, el método de acuerdo con la invención comprende además el paso de realizar un análisis en la muestra tisular o los contenidos celulares del embrión.

En una realización, el método de acuerdo con la invención comprende además el paso de seleccionar un embrión en función del resultado del análisis.

En una realización, el método de acuerdo con la invención es al menos semiautomático. En una realización, el método de acuerdo con la invención es automático.

15 En una realización del método de acuerdo con la invención, el embrión está en una etapa no madura del desarrollo.

En una realización del método de acuerdo con la invención, la muestra retirada comprende tejido del extremo del coleóptilo del embrión.

En una realización del método de acuerdo con la invención, la muestra retirada comprende tejido del extremo que no pertenece al coleóptilo del embrión.

20 En una realización del método de acuerdo con la invención, la muestra retirada comprende tejido de la región ecuatorial o media del embrión.

En una realización del método de acuerdo con la invención, la muestra se retira utilizando un objeto penetrante. En una realización, el objeto penetrante es un palillo. En una realización, el objeto penetrante es una punta de pipeta. En una realización, el objeto penetrante es una aguja maciza. En una realización, el objeto penetrante es una aguja hueca.

25 En una realización, el objeto penetrante es un tubo capilar.

En una realización, la muestra se retira utilizando un objeto penetrante cargado que atrae o retiene los tejidos y/o el contenido celular, p. ej., ADN. En una realización, el objeto penetrante tiene una superficie áspera. En una realización, el objeto penetrante tiene una superficie lisa.

30 En una realización del método de acuerdo con la invención, se retiran las células utilizando papel de lija, o un material abrasivo similar, con el fin de liberar las células y los contenidos celulares y optimizar su retención en el material abrasivo.

En una realización, el contenido celular se muestra directamente en un material que captura selectivamente componentes de las células.

35 En un aspecto del método de acuerdo con la realización, el contenido celular se retira alterando la integridad física de la célula utilizando una solución líquida en la que se deposita el embrión durante un periodo prolongado de tiempo. En un aspecto, el líquido es NaOH. En un aspecto, el líquido es KOH. En un aspecto, el líquido es TrisHCl. En un aspecto, el líquido es SDS. En un aspecto, el líquido es Tween 20.

40 En un aspecto, la solución contiene el componente tamponante tris(hidroximetil)aminoetano (Tris). En un aspecto, la solución contiene ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanosulfónico (HEPES). En un aspecto, la solución contiene el componente tamponante ácido 3-(*N*-morfolino)propanosulfónico (MOPS). En un aspecto, la solución contiene el componente tamponante dihidrogenofosfato de sodio (NaH_2PO_4). En un aspecto, la solución contiene el componente tamponante hidrogenofosfato de disodio (Na_2HPO_4).

45 En un aspecto, la solución contiene el detergente SDS. En un aspecto, la solución contiene el detergente Tritón X-100. En un aspecto, la solución contiene el detergente Tritón X-114. En un aspecto, la solución contiene el detergente NP-40. En un aspecto, la solución contiene el detergente Brij-35. En un aspecto, la solución contiene el detergente Brij-58. En un aspecto, la solución contiene el detergente Tween 20. En un aspecto, la solución contiene el detergente glucósido de octilo. En un aspecto, la solución contiene el detergente CHAPS. En un aspecto, la solución contiene el detergente CHAPSO.

50 En un aspecto, el líquido comprende una combinación de un tampón y un detergente seleccionados a partir de las listas anteriores.

En un aspecto, la alteración de la integridad física de la célula se puede realizar con una solución que contenga la enzima celulasa. En un aspecto, la alteración de la integridad física de la célula se puede realizar con una solución

- que contenga la enzima pectinasa. En un aspecto, la alteración de la integridad física de la célula se puede realizar con una solución que contenga la enzima beta-glucanasa. En un aspecto, la alteración de la integridad física de la célula se realiza con una solución que contenga la enzima mananasa. En un aspecto, la alteración de la integridad física de la célula se realiza con una solución que contenga la enzima xiloglucanasa. En un aspecto, la alteración de la integridad física de la célula se realiza con una solución que contenga la enzima glucosidasa. En un aspecto, la alteración de la integridad física de la célula se realiza con una solución que contenga la enzima xilanasa. En un aspecto, la alteración de la integridad física de la célula se realiza con una solución que contenga una mezcla de al menos dos de las enzimas anteriores.
- En un aspecto, la solución contiene el componente aditivo EDTA. En un aspecto, la solución contiene el componente aditivo EGTA. En un aspecto, la solución contiene el componente aditivo PVP. En un aspecto, la solución contiene el componente aditivo PEG.
- En un aspecto, la alteración de la integridad física de la célula se realiza a una temperatura comprendida entre 10 y 30 grados Celsius. En un aspecto, la alteración de la integridad física de la célula se realiza entre 5 minutos y 24 horas.
- En un aspecto del método de acuerdo con la invención, el contenido celular se retira del embrión de maíz inmaduro alterando la integridad física de la célula utilizando una sonicación suave y, opcionalmente, con enzimas que degradan la pared celular.
- En un aspecto, se altera la integridad física de las células mediante un campo eléctrico utilizando un electroporador o cualquier otro dispositivo electrónico que altere la integridad física de las membranas celulares. Se puede alterar la integridad física de las membranas celulares de manera permanente o generar poros durante un periodo corto de tiempo que permita la liberación del contenido celular.
- En una realización, el tejido del escutelo se retira mecánicamente (cuchilla de afeitar, láser o cualquier otra herramienta). El tejido retirado se rechaza y los embriones manipulados mecánicamente se colocan en un líquido para recoger el contenido celular. En una realización, el líquido puede degradar las membranas y paredes celulares. En una realización, no se requiere la degradación de la pared celular. En una realización, el contenido celular de los embriones o embriones derivados de microsporas no se captura en líquido sino en cualquier estructura (p. ej., papel de filtro) que se una selectivamente a todos o a un compuesto específico del contenido celular.
- En una realización, el método de acuerdo con la invención comprende además la recogida de células y contenidos celulares a partir del líquido o contenido celular que se une a la estructura sólida.
- En una realización del método de acuerdo con la invención, la muestra se retira cortando en láminas con un cuchillo o escalpelo o un láser o dispositivos similares.
- En una realización del método de acuerdo con la invención, la muestra retirada se somete a un análisis genético, químico o bioquímico.
- En una realización del método de acuerdo con la invención, el embrión es un embrión de maíz.
- En una realización del método de acuerdo con la invención, el embrión es un embrión de trigo.
- En una realización del método de acuerdo con la invención, el embrión es un embrión de arroz.
- El concepto se podría aplicar a embriones somáticos derivados de cultivos de microsporas.
- En una realización, el embrión es un embrión derivado de microsporas de una especie de *Brassica*. En una realización, el embrión es un embrión derivado de microsporas de una especie de *Hordeum*. En una realización, el embrión es un embrión derivado de microsporas de una especie de *Cucumis*. En una realización, el embrión es un embrión derivado de microsporas de una especie de *Zea mays*. En una realización, el embrión es un embrión derivado de microsporas de una especie de *Triticum*. En una realización, el embrión es un embrión derivado de microsporas de una especie de *Capsicum*. En una realización, el embrión es un embrión derivado de microsporas de una especie de *Oryza*. En una realización, el embrión es un embrión derivado de microsporas de una especie de *Saccharum*.
- También se divulga un embrión vegetal, donde dicho embrión ha sido muestreado de acuerdo con el método de la divulgación.
- También se divulga el uso de un embrión vegetal de acuerdo con la divulgación en la producción vegetal.
- También se divulga una planta de maíz producida a partir de un embrión de acuerdo con la divulgación.
- También se proporciona un método para el progreso de las plantas en función de los datos que comprende los pasos de a) inducir haploides; b) extraer e identificar embriones inmaduros haploides en una población mixta de embriones diploides y haploides; c) obtener, de una manera no destructiva, una muestra tisular preferentemente del escutelo a partir de los embriones extraídos, donde dichas muestras comprenden al menos una parte del escutelo; y d) opcionalmente doblar el número cromosómico; donde el paso c) puede tener lugar antes y/o después del paso d).

- En una realización, el método de la invención comprende además uno o más de los pasos de: e) analizar las características genéticas, químicas o bioquímicas de los embriones muestreados; f) hacer progresar los embriones seleccionados en un proceso de cultivo selectivo en función de las características analizadas; y g) producir plántulas a partir de los embriones seleccionados. También se proporciona un método de progreso de las plantas en función de los datos, que comprende los pasos de: h) obtener, de una manera no destructiva, una muestra tisular a partir del tejido del escutelo a partir del escutelo de los embriones diploides extraídos, i) analizar las características genéticas, químicas o bioquímicas de los embriones muestreados; j) hacer progresar los embriones seleccionados en un proceso de cultivo selectivo en función de las características analizadas; y k) producir plántulas a partir de los embriones seleccionados.
- 5 En una realización, el método de la invención comprende además la producción de semillas a partir de las plántulas de los pasos g) y k).
- En una realización del método de acuerdo con la invención, los embriones seleccionados se almacenan en estasis para conseguir un estado latente hasta que se conozca el resultado del análisis genético, químico o bioquímico.
- 15 En una realización del método de acuerdo con la invención, los embriones se almacenan en una atmósfera controlada. En una realización del método de acuerdo con la invención, los embriones se almacenan a una temperatura controlada. En una realización del método de acuerdo con la invención, los embriones se almacenan en condiciones nutricionales predeterminadas. En una realización del método de acuerdo con la invención, los embriones se almacenan en una temperatura y atmósferas controladas y en condiciones nutricionales predeterminadas.
- 20 En una realización, el almacenamiento en estasis controla la división celular de manera productiva para beneficiar la duplicación cromosómica. Esto equivale a una mejor fertilidad y producción de semillas.
- En una realización del método de acuerdo con la invención, los embriones se almacenan en presencia de compuestos antietilénicos o con un efecto sobre el metabolismo del etileno que reducen la producción de etileno, o se unen con este y lo eliminan o que obvian el impacto de la producción de etileno. En una realización, estos son compuestos que se unen a los mismos sitios del receptor a los que también se une el etileno. En una realización, el compuesto es nitrato de plata. En una realización, el compuesto es tiosulfato de plata. En una realización, el compuesto es 1-MCP. En una realización, el compuesto es aminoetoxivinilglicina. En una realización, el compuesto es 2,5-norbornadieno. En una realización, se utiliza permanganato de potasio para unirse al etileno gaseoso. En una realización, el compuesto es un compuesto antietilénico o compuestos con un impacto sobre el metabolismo del etileno conocidos por el experto en la técnica que reducen la producción de etileno, o se unen con este y lo eliminan o que obvian el impacto de la producción de etileno.
- 25 En una realización del método de acuerdo con la invención, se manipula el embrión utilizando un sistema con un brazo robótico; se utiliza una cámara para seleccionar haploides o no haploides; y se utiliza una cámara o sistema de visión para guiar al instrumento de muestreo hasta el tejido que se va a muestrear.
- 35 También se proporciona un método para diferenciar los embriones haploides que comprende los pasos de capturar una imagen de una población de embriones; identificar los embriones haploides en dicha población; mover los embriones seleccionados mediante un medio de transporte.
- En una realización, el método de la invención comprende además los pasos de transferir todos los embriones o los embriones seleccionados a una ubicación diferente utilizando dicho medio de transporte.
- 40 En una realización, el método de la invención comprende además los pasos de colocar los embriones unidos de modo que la muestra o las muestras tisulares se puedan retirar de los embriones; transferir todos los embriones o los embriones seleccionados a una ubicación diferente. En una realización, la ubicación es una ubicación de almacenamiento, preferentemente un almacenamiento en estasis.
- En una realización, se aplica la duplicación cromosómica a plántulas inmaduras después del almacenamiento en estasis.
- 45 En una realización, el método de la invención comprende además los pasos de colocar los embriones unidos de modo que se pueda retirar una muestra tisular de los embriones; transferir todos los embriones o los embriones seleccionados a una atmósfera y temperatura controladas y a un entorno nutricional adecuado para el almacenamiento de embriones.
- 50 En un aspecto, se mueve el embrión de manera que esté en contacto con una solución, de manera que se pueda alterar la integridad física de las células y se pueda recoger el contenido celular.
- En una realización de la invención, se identifican los embriones utilizando algoritmos que se basan en el análisis de espectros o el color.
- En una realización de la invención, el método es al menos semiautomático.
- En una realización de la invención, los pasos de muestreo tisular son automáticos.

DEFINICIONES

Los términos y expresiones técnicos utilizados en el alcance de esta solicitud generalmente tienen el significado que corresponde comúnmente a ellos en la técnica pertinente del muestreo de materiales biológicos si no se indica lo contrario en la presente a continuación.

- 5 Embrión de maíz haploide inmaduro: Un embrión haploide ($n=10$) compuesto por un eje embrionario central y el escutelo antes de su nivel de desarrollo completo típico en el grano y antes de su germinación.

Germinación del embrión haploide prematura: la iniciación del crecimiento y/o extrusión de los ejes de la coleorriza y/o el coleóptilo desde el embrión haploide inmaduro después de la resección del embrión haploide de la semilla.
- 10 Plántula haploide precoz-inmadura: Una planta-plántula inmadura formada a partir de la germinación de un embrión haploide inmaduro ressecado.

Embrión derivado de microsporas: un embrión derivado de un proceso de desarrollo embriogénico iniciado a partir de una microspora.

Escutelo: un cotiledón modificado y es una parte componente del embrión monocotiledóneo. Está unido al eje embrionario por el nódulo del escutelo. También actúa como un órgano de almacenamiento de alimentos y sirve para digerir y transportar los nutrientes del endospermo durante la germinación.
- 15 Eje embrionario: El eje embrionario está formado por la raíz primaria, protegida por la coleorriza, y las hojas primordiales (plúmula), protegidas por el coleóptilo.

Coleóptilo: La primera hoja verdadera y está modificada para actuar como una cobertura protectora para la plúmula o primer brote de la planta y crece a través del suelo durante la germinación.
- 20 Embrión inmaduro: Un embrión que aún no ha experimentado un proceso de desecación y que no ha alcanzado un estado latente asociado. Los embriones inmaduros se pueden extraer de la semilla o de la cariósida ya sea a mano o de manera automática en los días posteriores a la polinización y en las condiciones apropiadas son capaces de germinar.
- 25 Embrión maduro: Un embrión de maíz que ha experimentado un proceso de desecación y ha alcanzado un estado latente asociado.

Muestreo del tejido embrionario inmaduro: retirada de una porción, fragmento o segmento del embrión derivado de microsporas o zigótico de maíz inmaduro que es representativo de la constitución bioquímica o genética del embrión derivado de microsporas o zigótico inmaduro.
- 30 Muestreo del contenido celular: retirada del contenido celular del embrión derivado de microsporas o embrión zigótico inmaduro que es representativo de la constitución bioquímica o genética del embrión derivado de microsporas o zigótico de maíz inmaduro.

Extremo del coleóptilo del escutelo: El área o la región del escutelo que rodea o es adyacente al coleóptilo.

Extremo que no pertenece al coleóptilo del escutelo: El área o la región del escutelo que rodea o es adyacente a la coleorriza.
- 35 Eje embrionario: El eje embrionario está formado por la raíz primaria, protegida por la coleorriza, y la punta del tallo protegida por el coleóptilo.

Muestra tisular: Un fragmento de tejido que se retira de un embrión derivado de microsporas o zigótico inmaduro. La muestra tisular se utiliza para analizar el contenido celular que refleja el del embrión derivado de microsporas o zigótico inmaduro.
- 40 Muestreo del contenido celular: Muestreo del contenido celular a partir de un embrión derivado de microsporas o zigótico inmaduro, donde se excluye el paso del muestreo tisular. Se obtiene el contenido celular alterando la integridad física de las membranas celulares de los embriones derivados de microsporas o zigóticos.

Extracción de fragmentos sólidos (*plugging*): Retirada de un fragmento sólido de tejido de un embrión.
- 45 Contenidos celulares: Elementos constitutivos internos de una célula vegetal que pueden incluir ADN u otros componentes citoplasmáticos tales como orgánulos, ARN, proteínas, aceites, azúcares, almidón u otros compuestos orgánicos.

Objeto penetrante: Una estructura física que es capaz de penetrar en el tejido vegetal. El objeto penetrante puede ser macizo o hueco. Puede contener una superficie lisa o abrasiva o cargada para facilitar la retirada de tejido y contenidos celulares de embriones vegetales.

Fragmento sólido de tejido: Una muestra tisular extraída mediante la introducción de un objeto penetrante hueco en el tejido embrionario.

Superficie abrasiva: Una superficie que cuando se frota o se pone en contacto con la superficie vegetal deseada es capaz de provocar abrasiones en el embrión derivado de microsporas o zigótico de manera que se retire una muestra tisular.

Inducción haploide: Un proceso vegetal mediante el cual se produce la creación de embriones zigóticos de maíz haploides. En el maíz, se pueden utilizar varias líneas para inducir haploides (p. ej., RWK, RWS, Stock 6, MHI, etc.) como progenitores macho para polinizar otro germoplasma de maíz a partir del cual se producen embriones haploides maternos. En el trigo, se utiliza polen de maíz para estimular el desarrollo de embriones de trigo haploides.

Conservación de la viabilidad: Describe las circunstancias en las que un embrión vegetal sigue siendo viable y capaz de germinar después de la retirada de tejido (muestreo tisular y/o la alteración de la integridad física de las células).

Modo no destructivo: Un método de muestreo tisular y/o alteración de la integridad física de las células que permite mantener la viabilidad y capacidad de germinación de un embrión derivado de microsporas o zigótico inmaduro.

Almacenamiento de embriones: Almacenamiento de embriones zigóticos derivados de microsporas o zigóticos inmaduros en condiciones que minimizan la respiración y/o actividad metabólica con el fin de mantener los embriones en una situación viable-latente.

Almacenamiento en estasis: Almacenamiento de un embrión vegetal en un estado latente durante un periodo de tiempo prolongado (aproximadamente 1-20 días).

Condición latente: Un estado en el que el crecimiento se ha detenido o una condición de reposo del embrión en los que la actividad metabólica se ralentiza sustancialmente.

Atmósfera controlada: La composición o composiciones atmosféricas que reducen o minimizan la respiración y/o la actividad metabólica de manera que sea posible el almacenamiento de embriones derivados de microsporas o zigóticos inmaduros en un estado latente.

Embrión haploide: Esto hace referencia a la ploidía genética de un embrión derivado de microsporas o zigótico y, más específicamente, dichos embriones contienen la mitad del número normal de cromosomas.

Plántula haploide doble: Una plántula derivada de microsporas o zigótica que se ha visto sometida a un proceso de duplicación cromosómica. La plántula puede estar constituida parcial o totalmente por células que contienen un número diploide de cromosomas.

Automático: Un proceso o paso del proceso o serie de pasos del proceso realizado o realizados enteramente por una máquina.

Semiautomático: Un proceso o paso del proceso o serie de pasos del proceso realizado o realizados en parte por una máquina y en parte por un ser humano.

Sistema de brazo robótico: Un dispositivo electromecánico controlado por una computadora con múltiples grados de libertad que hacen posible simular las capacidades de un brazo y una mano humanos de modo que los embriones se puedan mover desde una ubicación a otra. Además, el sistema de brazo robótico proporciona un medio para tomar una muestra tisular a partir de los embriones descritos anteriormente y para transportar dicha o dichas muestras tisulares y colocarlas en la segunda ubicación.

Sistema de visión: Un sistema con cámara capaz de distinguir características multiespectrales o visibles por el ser humano de embriones vegetales derivados de microsporas o zigóticos. El sistema con cámara mencionado anteriormente proporciona información a un dispositivo controlado por una computadora, tal como un brazo robótico, para facilitar los pasos del proceso automáticos.

Medio de transporte: Este se refiere al uso de un brazo robótico u otro dispositivo mecánico que se utiliza para mover los embriones derivados de microsporas o zigóticos desde una ubicación a otra.

Algoritmo: Un proceso o conjunto de reglas que han de seguirse en los cálculos u otras operaciones de resolución de problemas, especialmente por parte de una computadora.

Progreso de las plantas/decisión de selección en función de los datos: Utilización de los datos fenotípicos, genéticos o bioquímicos obtenidos a partir de un individuo, grupos de individuos o poblaciones con el fin de seleccionar el individuo o individuos, los grupos de individuos o las poblaciones para un cultivo selectivo continuado o para realizar trabajos de mejora genética o un examen adicional.

Tal y como se utilizan en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", y "el" y "la" incluyen la referencia al plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "una planta" incluye una o más plantas.

5 Tal como se utiliza en la presente, el término "aproximadamente", cuando está referido a un valor / una cantidad de masa, peso, tiempo, volumen, concentración o porcentaje pretende abarcar variaciones de $\pm 20\%$ en algunas realizaciones, de $\pm 10\%$ en algunas realizaciones, de $\pm 5\%$ en algunas realizaciones, de $\pm 1\%$ en algunas realizaciones, de $\pm 0,5\%$ en algunas realizaciones y de $\pm 0,1\%$ en algunas realizaciones, con respecto a la cantidad especificada, puesto que dichas variaciones son apropiadas para realizar el método divulgado.

10 Tal y como se utiliza la presente, la expresión "cultivo selectivo" y sus variantes gramaticales se refieren a cualquier proceso que genera un individuo de la progenie. El cultivo selectivo puede ser sexual o asexual o cualquier combinación de estos. Los ejemplos no limitantes de tipos de cultivo selectivo incluyen cruzamientos, autopolinización, generación derivada haploide doble, poliploidización y combinaciones de estos.

Una "planta" se refiere a cualquier planta en cualquier etapa de desarrollo.

15 Una "célula vegetal" se refiere a una unidad estructural y fisiológica de una planta, que comprende un protoplasto y una pared celular. La célula vegetal puede estar en forma de una única célula aislada o de una célula cultivada, o formar parte de una unidad con una organización superior tal como, por ejemplo, un tejido vegetal, un órgano vegetal o una planta entera.

20 Tal y como se utiliza en la presente, el término "progenie" se refiere al descendiente o a los descendientes de un individuo o cruce particulares. Normalmente, la progenie resulta del cruce de dos individuos, aunque algunas especies (particularmente algunas plantas) se pueden autopolinizar (es decir, la misma planta actúa como donante tanto de los gametos masculinos como femeninos). El descendiente o los descendientes pueden ser, por ejemplo, de la generación F1, la generación F2 o de cualquier generación posterior.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se presentan con el fin de ilustrar en mayor grado algunas realizaciones de la invención.

25 A continuación, se proporcionan ejemplos de 1) la elución química de ADN a partir de embriones de maíz inmaduros, 2) métodos mecánicos de extracción tisular a partir del tejido del escutelo y del eje embrionario de embriones de maíz inmaduros, 3) resultados de genotipado en función de la PCR utilizando el ADN extraído de los individuos y 4) capacidad de germinación de embriones que han recibido los tratamientos químicos o mecánicos mencionados anteriormente.

30 Ejemplo 1. Esterilización de mazorcas y recuperación de embriones

Se esterilizaron mazorcas de maíz de diferentes edades (de aproximadamente 8 a 24 días después de la polinización) en una solución de lejía al 50% y, a continuación, se lavaron con agua estéril. Se retiraron las coberturas de los granos con un escalpelo, se extrajeron a mano embriones zigóticos inmaduros de varios tamaños (de aproximadamente 4-6 mm de longitud) y se colocaron en una placa Petri que contenía papel de filtro saturado con medio de cultivo líquido a base de Murashige y Skoog (M.S., 1962) o directamente sobre la superficie de medio de cultivo solidificado a base de M.S. A continuación, los embriones se cultivan con luces de crecimiento (duración del día de 16 h, 400 μmol , 31 °C/87 °F de día, 22 °C/72 °F de noche).

40 Los embriones diploides se pueden utilizar directamente para la extracción tisular o para la alteración de la integridad física de la célula. Como alternativa, y cuando se emplea un marcador de la pigmentación del escutelo tal como R1scm2, R1scm3, R1scm122 o R1scm124, se deja transcurrir un periodo corto de tiempo para distinguir los embriones haploides de los diploides. A continuación, los embriones haploides o diploides pasan a la etapa de muestreo tisular o alteración de la integridad física de la célula tal y como se describe posteriormente.

Ejemplo 2. Evaluación de la capacidad de germinación de embriones de maíz inmaduros haploides y diploides.

45 Se colocaron muestras tisulares de embriones de maíz inmaduros haploides y diploides o el control sobre la superficie de medio de cultivo a base de M.S. solidificado y se cultivaron en las siguientes condiciones de cultivo: duración del día de 16 h, 400 μmol de luz PAR, 31 °C/87 °F día, 22 °C/72 °F noche). Se calificó la germinación de los embriones después de un periodo de 3 a 5 días.

Ejemplo 3. Empapado de embriones haploides en NaOH para facilitar la extracción de ADN.

50 Experimento 1. Para retirar el tejido del endospermo adherente, se combinaron todos los embriones y se transfirieron a un tubo de 50 mL que contenía 40 mL de tampón MS y un 3% de sacarosa. Para mejorar la eficacia del lavado, se colocó el tubo en un agitador horizontal y se agitó vigorosamente durante 40 minutos. Después de 40 minutos, se decantó la solución de lavado y los embriones se lavaron brevemente con H₂O.

Para la extracción de ADN, se colocó cada embrión en un pocillo de un bloque de 96 pocillos y a cada embrión se añadieron 110 μ L de una solución 5 mM de NaOH. El NaOH conc. podría variar entre aproximadamente 2.5 mM y aproximadamente 50 mM. El tiempo de empapado podría variar entre aproximadamente 20 minutos y aproximadamente 3 horas. Se podría utilizar cualquier otro agente químico que altere la integridad física de las células pero que no dañe la viabilidad de los embriones (p. ej., hidróxido de potasio (KOH)) o se podrían añadir cualesquiera sustancias químicas que no dañen la viabilidad de los embriones a una solución que altere la integridad física de la célula.

Se colocó un bloque de 96 pocillos en un agitador horizontal y los bloques se agitaron lentamente durante 1 hora. La solución alcalina altera la integridad física de las células del escutelo o eje embrionario, y se libera en la solución el ADN y otro tipo de contenido celular de las células cuya integridad física se ha alterado. Después de 1 hora, se transfirieron 80 μ L de la solución de empapado de cada pocillo a los pocillos de un segundo bloque y se añadió TrisHCl 1M (o cualquier otro agente químico para ajustar el pH que no dañe la aplicación posterior del ADN) para reducir el pH hasta aproximadamente 8. Otras aplicaciones posteriores podrán requerir diferentes ajustes del pH. Los embriones se lavaron varias veces en tampón MS que contenía un 3% de sacarosa.

Para los análisis del marcador molecular, se utilizó directamente como molde para PCR Taqman el ADN de 24 embriones liberado en la solución de empapado. En este punto, podrían aplicarse cualesquiera procesos de limpieza del ADN. Podría aplicarse la modificación del ADN (p. ej., pasos de limpieza adicionales mediante precipitación con alcohol). Se muestran los resultados de la PCR directa en la Fig. 1.

Experimento 2.

Este experimento se realizó como se describe para el experimento 1, pero el ADN se extrajo empapando los embriones en NaOH 10 mM. Se muestra el resultado del análisis del marcador molecular en la Fig. 2.

Tabla 1. Tasas de germinación de embriones observadas en los embriones empapados en NaOH (5, 10 mM) durante 1 h.

Ploidía embrionaria	Método de extracción de ADN	Número inicial de embriones	Número de embriones germinados	Porcentaje de germinación de embriones
Haploide	Control	541	534	99%
Haploide	Embriones empapados en NaOH 10 mM durante 1 h	29	29	100%
Haploide	Embriones empapados en NaOH 5 mM durante 1 h	31	31	100%

Ejemplo 4. Métodos de retirada del tejido del endospermo de embriones de maíz inmaduros haploides.

Método 1 de lavado del endospermo.

Se combinaron independientemente embriones haploides que representaban dos híbridos F1 diferentes y se lavaron durante 5 minutos en NaOH 10 mM y durante 15 minutos más en tampón MS con un 3% de sacarosa. Se puede utilizar cualquier agente químico líquido (p. ej., Tween 20) para limpiar los embriones siempre que el proceso de limpieza no dañe la viabilidad de los embriones. Cada paso de lavado se realizó en un tubo de 50 mL. El tubo se agitó vigorosamente en un agitador horizontal. Después de ambos pasos de lavado, los embriones se lavaron con H₂O.

Se realizó la extracción del ADN y el análisis del marcador tal como se ha descrito en el experimento 1, pero los embriones se empaparon en NaOH 10 mM. Se muestra el resultado del análisis del marcador en la Fig. 3.

Método 2 de lavado del endospermo.

Este método 2 de lavado del endospermo se realizó como el método 1 de lavado del endospermo (tubos de 50 mL con agitación vigorosa) pero el tejido del endospermo se retiró lavando los embriones en tampón MS con un 3% de sacarosa durante 30 minutos.

Se extrajo el ADN tal y como se describe en el método 1 de lavado del endospermo.

Se muestra el resultado del análisis del marcador molecular en la Fig. 4.

Tabla 2. Tasas de germinación de embriones observadas en los embriones empapados en NaOH y utilizando los métodos 1 y 2 de lavado del endospermo.

Ploidía del embrión / Fuente progenitora	Método de lavado del endospermo	Número inicial de embriones	Número de embriones germinados	Porcentaje de germinación de embriones
Haploide, Progenitor 1	Control	42	36	86%
Haploide, Progenitor 2	Control	26	25	96%
Haploide, Progenitor 1	Método 1 de lavado del endospermo	28	23	82%
Haploide, Genotipo 1	Método 2 de lavado del endospermo	29	27	93%
Haploide, Progenitor 2	Método 1 de lavado del endospermo	38	38	100%
Haploide, Progenitor 2	Método 2 de lavado del endospermo	27	24	89%

5 Ejemplo 5. Empapado de embriones diploides en NaOH para facilitar la extracción de ADN.

La retirada del tejido del endospermo del Ejemplo 5 se realizó como se describe en el Ejemplo 4.

Se colocó cada embrión en un pocillo de un bloque de 96 pocillos y a cada embrión se añadieron 200 μ L de una solución 20 mM de NaOH. Se colocó el bloque de 96 pocillos en un agitador horizontal y los bloques se agitaron lentamente durante 1 hora. Después de 1 hora, se transfirieron 160 μ L de la solución de NaOH de cada pocillo a los pocillos de un segundo bloque y se añadió TrisHCl 1M (o cualquier otro agente químico para ajustar el pH que no dañe la aplicación posterior del ADN) para reducir el pH hasta aproximadamente 8 para la PCR. Otras aplicaciones posteriores podrán requerir diferentes ajustes del pH. Los embriones se lavaron varias veces con agua estéril y 0.5 x TE.

Para los análisis del marcador molecular, se utilizó directamente como molde para la reacción de PCR Taqman el ADN de 24 embriones liberado en la solución de empapado. Los resultados se muestran en la Fig. 5.

Tabla 3. Tasas de germinación de embriones observadas en los embriones diploides empapados en NaOH 20 mM durante una hora.

Ploidía embrionaria	Método de extracción de ADN	Número inicial de embriones	Número de embriones germinados	Porcentaje de germinación de embriones
Diploide	Control	50	48	96%
Diploide	ADN extraído empapando con NaOH	48	46	96%

20 Ejemplo 6. Retirada del tejido del escutelo de maíz inmaduro de embriones de maíz inmaduros haploides y diploides de un orificio pequeño de una punta de pipeta.

Experimento 6

Se muestreó tejido del escutelo de embriones de maíz haploides y diploides inmaduros (de aproximadamente 3 a 6 mm) penetrando en el escutelo con una punta de pipeta de 2 μ L (N.º de cat. de VWR North America 53509-130). Las puntas de pipeta que contenían tejido del escutelo se colocaron verticalmente en los pocillos de bloques de 96 pocillos. Para facilitar la retirada del fragmento sólido de tejido, se añadieron 50 μ L de NaOH 30 mM. Las puntas de pipeta permanecieron en la solución de NaOH durante 1 hora. Después de 1 hora, se liberó cada fragmento sólido de tejido en la solución de NaOH con una presión de aire positiva. Los fragmentos sólidos se mantuvieron una hora en NaOH para alterar la integridad física de las células aún más y liberar el ADN en la solución de NaOH. Finalmente, se añadió TrisHCl 1 M (o cualquier otro agente químico para ajustar el pH que no dañe la aplicación posterior del ADN) para reducir el pH hasta aproximadamente 8 para la PCR. Otras aplicaciones posteriores podrán requerir diferentes ajustes del pH. Se podría añadir cualquier otro agente para alterar la integridad física de las células (p. ej., KOH) o se podría alterar la integridad física de las células del fragmento sólido mecánicamente, p. ej., con una esfera de acero o un alfiler de acero. El ADN se podría utilizar directamente como un molde para reacciones de PCR o se podrían aplicar pasos de limpieza adicionales o el ADN. Las evaluaciones de la germinación se llevaron a cabo tal como se ha descrito previamente en los experimentos 1 y 2.

Tabla 4. Tasas de germinación de embriones observadas en embriones diploides después del muestreo tisular del escutelo con una punta de pipeta de 2 μ L.

Ploidía embrionaria	Método de extracción de ADN	Número inicial de embriones	Número de embriones germinados	Porcentaje de germinación de embriones
Diploide	Control	25	25	100%
Diploide	Muestreo de fragmentos sólidos del escutelo	25	25	100%

Tabla 5. Tasas de germinación de embriones observadas en embriones haploides después del muestreo tisular con una punta de pipeta de 2 μ L.

Ploidía embrionaria	Método de extracción de ADN	Número inicial de embriones	Número de embriones germinados	Porcentaje de germinación de embriones
Haploide	Control	643	615	96%
Haploide	Muestreo de fragmentos sólidos del escutelo	276	264	96%

Para el análisis del marcador molecular, se utilizó el ADN directamente como un molde para la reacción de PCR Taqman. Los resultados para las 288 muestras de ADN haploide se muestran en la Fig. 7. Los resultados para las muestras de ADN diploide se muestran en la Fig. 6.

Ejemplo 7. Retirada del tejido del escutelo de maíz inmaduro de embriones de maíz inmaduro haploides penetrando en el escutelo con una punta afilada.

Experimento 8. Extracción de tejido/ADN de tejido del escutelo de embriones de maíz inmaduros haploides penetrando con un palillo. Se afilaron las puntas de los palillos hasta conseguir una punta estrecha y se utilizaron para penetrar en la superficie del escutelo y atravesarlo. A continuación, los extremos afilados del palillo se colocaron verticalmente en los pocillos de bloques de 96 pocillos. Se añadieron a cada pocillo 50 μ L de NaOH 30 mM. Se podrían utilizar otras soluciones cualesquiera que no interfieran negativamente con las aplicaciones posteriores del ADN aislado. El tejido del escutelo se liberó mecánicamente frotando las puntas del palillo contra las paredes del pocillo. Se añadió TrisHCl 1 M (o cualquier otro agente químico para ajustar el pH que no dañe la aplicación posterior del ADN) para reducir el pH hasta aproximadamente 8 para la PCR. Otras aplicaciones posteriores podrán requerir diferentes ajustes del pH. Para el análisis del marcador molecular, se utilizó el ADN directamente como un molde para las PCR Taqman. Los resultados para las 96 muestras de ADN se muestran en la Fig. 8.

Tabla 6. Tasas de germinación observadas en embriones haploides después del muestreo tisular penetrando en el escutelo con un palillo. Se utilizaron los mismos datos de control en las tablas 5 y 6.

Ploidía embrionaria	Método de extracción de ADN	Número inicial de embriones	Número de embriones germinados	Porcentaje de germinación de embriones
Haploide	Control	643	615	96%
Haploide	Penetración con un palillo	103	97	94%

Ejemplo 8. Extracción de tejido/ADN de tejido del escutelo de embriones de maíz inmaduros diploides penetrando con un palillo.

Extracción de ADN: La extracción del ADN y el análisis del marcador molecular de los embriones diploides se realizó tal como se ha descrito en el experimento 8. Los resultados para las muestras de ADN se muestran en la Fig. 9.

Tabla 7. Tasas de germinación observadas en embriones diploides después del muestreo tisular penetrando en el escutelo con un palillo.

Ploidía embrionaria	Método de extracción de ADN	Número inicial de embriones	Número de embriones germinados	Porcentaje de germinación de embriones
Diploides	Control	25	25	100%
Diploides	Penetración con un palillo	25	25	100%

Ejemplo 9. Evaluación de la viabilidad de embriones germinados empapados en NaOH

Cinco días después de la germinación, los embriones germinados se lavaron con tampón MS con un 3% de sacarosa durante 30 minutos tal como se describe en el experimento 1. Después de 30 minutos, la solución de lavado se decantó y se añadieron 40 mL de NaOH 5 mM o 40 mL de NaOH 10 mM. Los tubos se agitaron lentamente en un agitador horizontal. Después de 30 minutos, se retiraron los embriones, se lavaron con MS + un 3% y se evaluó la capacidad de germinación tal como se ha descrito en el ejemplo 2. Los resultados muestran que los embriones germinados de la última etapa sobreviven el empapado en NaOH.

Tabla 8. Tasas de germinación de los embriones observadas en embriones haploides germinados después del empapado en NaOH.

Ploidía embrionaria	Método de extracción de ADN	Número inicial de embriones	Número de embriones germinados	Porcentaje de germinación de embriones
Haploide	Embriones germinados empapados en NaOH 10 mM	13	11	85%
Haploide	Embriones germinados empapados en NaOH 5 mM	28	26	93%

En la Fig. 10 se encuentran fotografías que muestran plántulas haploides derivadas de los dos tratamientos con NaOH.

Ejemplo 10. Muestreo de fragmentos sólidos del escutelo y almacenamiento en estasis.

Se identificaron embriones haploides 24 horas después de la extracción de los granos de maíz. Posteriormente, los embriones 1) se hicieron germinar sobre medio MS solidificado, 2) se sometieron a un proceso de obtención de muestras tisulares mediante la recogida de un fragmento sólido de tejido y se hicieron germinar sobre medio MS solidificado, 3) se colocaron sobre papel de filtro humedecido con MS en una placa de Petri que a continuación se colocó en una cámara oscura y enfriada (7 °C/45 °F) durante un periodo de 8 días después del cual los embriones se hicieron germinar sobre medio MS solidificado o 4) se sometieron a un proceso de obtención de muestras mediante la recogida de fragmentos sólidos de tejido del escutelo y se colocaron sobre un papel de filtro humedecido con MS en una placa Petri que se colocó en una cámara oscura y fría (7 °C/45 °F) durante un periodo de 8 días después del cual los embriones se hicieron germinar sobre medio MS solidificado. Las plántulas supervivientes se trasplantaron en recipientes planos que contenían una mezcla para macetas Fafard.

Tabla 9. Eficacia del trasplante de plántulas como una función del muestreo tisular y el almacenamiento en estasis.

Tratamiento de embriones haploides	N.º inicial de embriones	N.º de plántulas trasplantadas	Porcentaje de plántulas trasplantadas
Sin almacenamiento en frío	50	35	70%
Sin almacenamiento en frío y muestreo de fragmentos sólidos del escutelo	55	35	64%
Almacenamiento en estasis de embriones:	58	37	64%
Muestreo de fragmentos sólidos del escutelo y almacenamiento en estasis	55	45	82%

Ejemplo 11. Empapado de embriones haploides en TrisHCl/SDS para facilitar la extracción de ADN.

Experimento 1. Para retirar el tejido del endospermo adherente, se combinaron todos los embriones y se transfirieron a un tubo de 50 mL que contenía 40 mL de tampón MS y un 3% de sacarosa. Para mejorar la eficacia del lavado, se colocó el tubo en un agitador horizontal y se agitó vigorosamente durante 40 minutos. Después de 40 minutos, se decantó la solución de lavado y los embriones se lavaron brevemente con H₂O.

Para la extracción de ADN, se colocó cada embrión en un pocillo de un bloque de 96 pocillos y a cada embrión se añadieron 60 µL de una solución constituida por TrisHCl 200 mM, pH 9.2 y un 0.0025 - 0.005% de SDS. Se colocó un bloque de 96 pocillos en un agitador horizontal y los bloques se agitaron lentamente durante 1 hora. La solución de TrisHCl/SDS altera la integridad física de las células del escutelo o eje embrionario, y se libera en la solución el ADN y otro tipo de contenido celular de las células cuya integridad física se ha alterado. Las concentraciones de los componentes en la solución de empapado y el pH de la solución pueden ser mayores o menores y el experto en la técnica los puede modificar fácilmente. Asimismo, el tiempo de empapado se puede acortar o prolongar. Se podría utilizar cualquier otro agente químico que altere la integridad física de las células pero que no dañe la viabilidad de los embriones o se podrían añadir cualesquiera sustancias químicas que no dañen la viabilidad de los embriones a una solución que altere la integridad física de la célula.

Después de 1 hora, la solución de empapado se transfirió a un bloque nuevo de 96 pocillos. Los embriones se lavaron brevemente en una solución de MS/3% de sacarosa y se transfirieron a un papel de filtro empapado con MS/3% de sacarosa para comparar la tasa de germinación con la de los embriones no tratados (= controles). Las tasas de germinación del control y de los embriones tratados con TrisHCl/SDS fueron comparables. Para los análisis del marcador molecular, se utilizó directamente como molde para PCR Taqman el ADN de 20 embriones liberado en la solución de empapado. Podría aplicarse la modificación del ADN (p. ej., pasos de limpieza adicionales mediante precipitación con alcohol). Se muestran los resultados de la PCR directa en la Fig. 11.

Experimento 2. Para retirar el tejido del endospermo adherente, se combinaron todos los embriones y se transfirieron a un tubo de 50 mL que contenía 40 mL de tampón MS y un 3% de sacarosa. Para mejorar la eficacia del lavado, se colocó el tubo en un agitador horizontal y se agitó vigorosamente durante 40 minutos. Después de 40 minutos, se decantó la solución de lavado y los embriones se lavaron brevemente con H₂O.

Después del paso de lavado, se retiró parte del tejido del escutelo de cada embrión con una cuchilla de afeitar. El tejido retirado se desechó y cada embrión se colocó en un pocillo de un bloque de 96 pocillos. A cada embrión, se añadieron 60 µL de una solución constituida por TrisHCl 200 mM, pH 9.2 y un 0.005% de SDS. Se colocó un bloque de 96 pocillos en un agitador horizontal y los bloques se agitaron lentamente durante 1 hora. La solución de

TrisHCl/SDS altera la integridad física de las células del escutelo y/o eje embrionario, y se libera en la solución el ADN y otro tipo de contenido celular de las células cuya integridad física se ha alterado. Las concentraciones de los componentes en la solución de empapado y el pH de la solución pueden ser mayores o menores y el experto en la técnica los puede modificar fácilmente. Asimismo, el tiempo de empapado se puede acortar o prolongar. Se podría utilizar cualquier otro agente químico que altere la integridad física de las células pero que no dañe la viabilidad de los embriones o se podrían añadir cualesquiera sustancias químicas que no dañen la viabilidad de los embriones a una solución que altere la integridad física de la célula.

Después de 1 hora, la solución de empapado se transfirió a un bloque nuevo de 96 pocillos. Los embriones se lavaron brevemente en una solución de MS/3% de sacarosa y se transfirieron a un papel de filtro empapado con MS/3% de sacarosa para la comparación con la tasa de germinación de los embriones no tratados de control. Las tasas de germinación de los controles y de los embriones tratados fueron comparables. Para los análisis del marcador molecular, se utilizó directamente como molde para PCR Taqman el ADN de 20 embriones liberado en la solución de empapado. Podría aplicarse la modificación del ADN (p. ej., pasos de limpieza adicionales mediante precipitación con alcohol). Se muestran los resultados de la PCR directa en la Fig. 12.

Ejemplo 12. Empapado de embriones haploides en celulasa para facilitar la extracción de ADN.

Experimento 1. Para retirar el tejido del endospermo adherente, se combinaron todos los embriones y se transfirieron a un tubo de 50 mL que contenía 40 mL de tampón MS y un 3% de sacarosa. Para mejorar la eficacia del lavado, se colocó el tubo en un agitador horizontal y se agitó vigorosamente durante 40 minutos. Después de 40 minutos, se decantó la solución de lavado y los embriones se lavaron brevemente con H₂O.

Para la extracción de ADN, se colocó cada embrión en un pocillo de un bloque de 96 pocillos y a cada embrión se añadieron 60 µL de una solución constituida por tampón de fosfato de sodio 10 mM, pH 7.0 y > 1 – 5 U de celulasa (celulasa de *Aspergillus* sp., Sigma). Se colocó un bloque de 96 pocillos en un agitador horizontal y los bloques se agitaron lentamente durante 1 hora. La celulasa altera la integridad física de las células del escutelo o eje embrionario, lo que resulta en la liberación del contenido celular de las células cuya integridad física se ha alterado en la solución. Las concentraciones de los componentes en la solución de empapado pueden ser mayores o menores y el experto en la técnica las puede modificar fácilmente. Asimismo, el tiempo de empapado se puede acortar o prolongar. Se podría añadir a la solución enzimática cualquier otro agente químico que no dañe la viabilidad de los embriones y que no tenga un efecto negativo importante sobre la actividad de la enzima.

Después de 1 hora, la solución de empapado se transfirió a un bloque nuevo de 96 pocillos. Los embriones se lavaron brevemente en una solución de MS/3% de sacarosa y se transfirieron a un papel de filtro empapado con MS/3% de sacarosa para comparar la tasa de germinación con la de los embriones no tratados (= controles). Las tasas de germinación de los controles y de los embriones tratados fueron comparables. Para los análisis del marcador molecular, se utilizó directamente como molde para PCR Taqman el ADN de 20 embriones liberado en la solución de empapado. En este punto, podrían aplicarse cualesquiera procesos de limpieza del ADN. Podría aplicarse la modificación del ADN (p. ej., pasos de limpieza adicionales mediante precipitación con alcohol). Se muestran los resultados de la PCR directa en la Fig. 13.

Ejemplo 13. Empapado de embriones diploides en pectinasa para facilitar la extracción de ADN.

Experimento 1. Para retirar el tejido del endospermo adherente, se combinaron todos los embriones y se transfirieron a un tubo de 50 mL que contenía 40 mL de tampón MS y un 3% de sacarosa. Para mejorar la eficacia del lavado, se colocó el tubo en un agitador horizontal y se agitó vigorosamente durante 40 minutos. Después de 40 minutos, se decantó la solución de lavado y los embriones se lavaron brevemente con H₂O.

Para la extracción de ADN, se colocó cada embrión en un pocillo de un bloque de 96 pocillos y a cada embrión se añadieron 60 µL de una solución constituida por tampón de fosfato de sodio 10 mM, pH 7.0 y > 1 – 5 U de pectinasa (pectinasa de *Aspergillus aculeatus*, Sigma). Se colocó un bloque de 96 pocillos en un agitador horizontal y los bloques se agitaron lentamente durante 1 hora. La pectinasa altera la integridad física de las células del escutelo o eje embrionario, lo que resulta en la liberación del contenido celular de las células cuya integridad física se ha alterado en la solución. Las concentraciones de los componentes en la solución de empapado pueden ser mayores o menores y el experto en la técnica las puede modificar fácilmente. Asimismo, el tiempo de empapado se puede acortar o prolongar. Se podría añadir a la solución enzimática cualquier otro agente químico que no dañe la viabilidad de los embriones y que no tenga un efecto negativo importante sobre la actividad de la enzima. Después de 1 hora, la solución de empapado se transfirió a un bloque nuevo de 96 pocillos. Los embriones se lavaron brevemente en una solución de MS/3% de sacarosa y se transfirieron a un papel de filtro empapado con MS/3% de sacarosa para comparar la tasa de germinación con la de los embriones no tratados (= controles). Las tasas de germinación de los controles y de los embriones tratados fueron comparables. Para los análisis del marcador molecular, se utilizó directamente como molde para PCR Taqman el ADN de 20 embriones liberado en la solución de empapado. En este punto, podrían aplicarse cualesquiera procesos de limpieza del ADN. Podría aplicarse la modificación del ADN (p. ej., pasos de limpieza adicionales mediante precipitación con alcohol). Se muestran los resultados de la PCR directa en la Fig. 14.

REIVINDICACIONES

1. Un método de muestreo de un embrión vegetal inmaduro no destructivo que conserva la viabilidad, que comprende los pasos de: retirar una muestra tisular que comprende al menos una porción del escutelo del embrión vegetal;
5 donde el contenido celular obtenido mediante el muestreo de tejido se somete a análisis genético, químico o bioquímico, y
donde los embriones extraídos se colocan en almacenamiento en estasis para conseguir un estado latente hasta que se conozca el resultado del análisis genético, químico o bioquímico.
2. El método de muestreo de un embrión vegetal de acuerdo con la reivindicación anterior, donde dicho método es automático o semiautomático.
- 10 3. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, donde la muestra retirada comprende tejido del extremo que no pertenece al coleóptilo del embrión.
4. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, donde la muestra retirada comprende tejido de la región ecuatorial o media del embrión.
5. Un método para el progreso de las plantas en función de los datos, que comprende los pasos de:
15 a. Inducir haploides;
b. Extraer e identificar embriones vegetales inmaduros en una población mixta de embriones diploides y haploides;
c. tomar una muestra de embriones vegetales inmaduros de acuerdo con el método de las reivindicaciones 1-4; y
d. Opcionalmente, aplicar un proceso de duplicación cromosómica.
- 20 6. Un método para el progreso de plantas en función de los datos de acuerdo con la reivindicación 5, donde los embriones se almacenan de una manera que conserve la viabilidad en un entorno nutricional, temperatura y atmósfera controlados.
7. Un método de progreso de las plantas en función de los datos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 6 donde
a. El embrión se manipula utilizando un brazo robótico;
25 b. Se utiliza una cámara para seleccionar los haploides o no haploides; y
c. Se utiliza un sistema de visión o con cámara para guiar al instrumento de muestreo hacia el tejido que se va a muestrear.

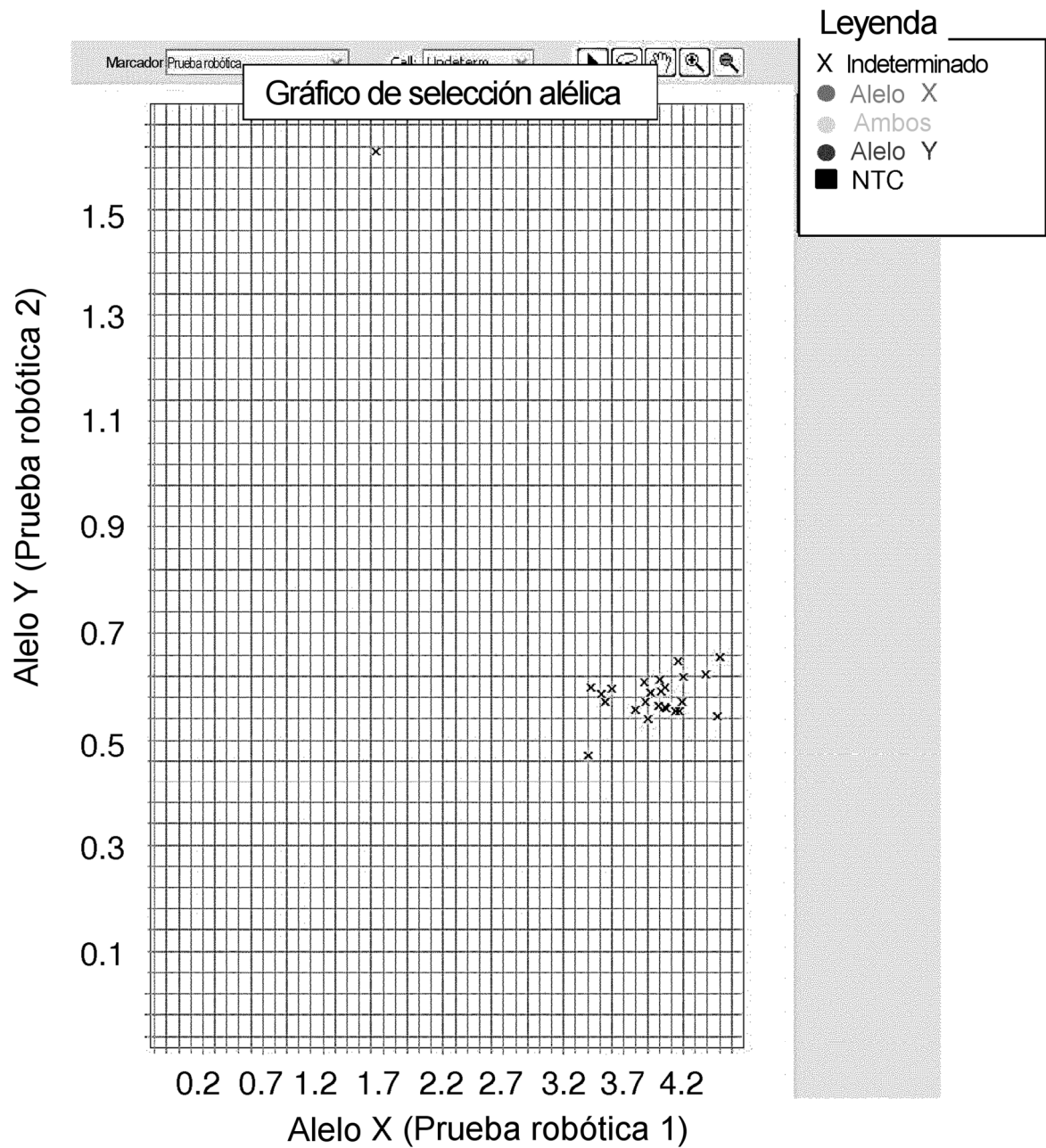


Figura 1. Identificación alélica de embriones de maíz haploides individuales después del empapado 1 hora en NaOH 5 mM.

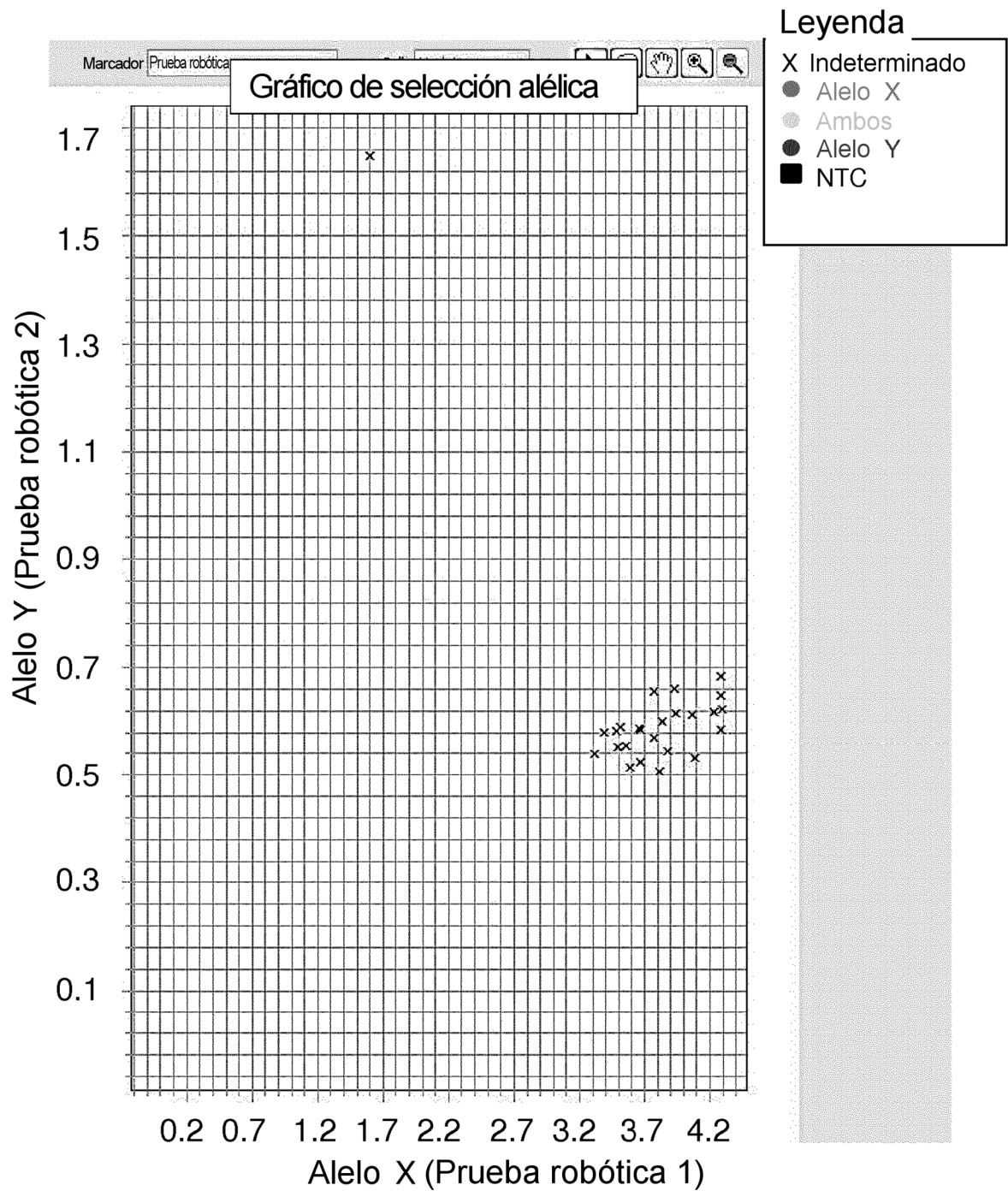


Figura 2. Identificación alélica de embriones de maíz haploides individuales después del empapado 1 hora en NaOH 10 mM.

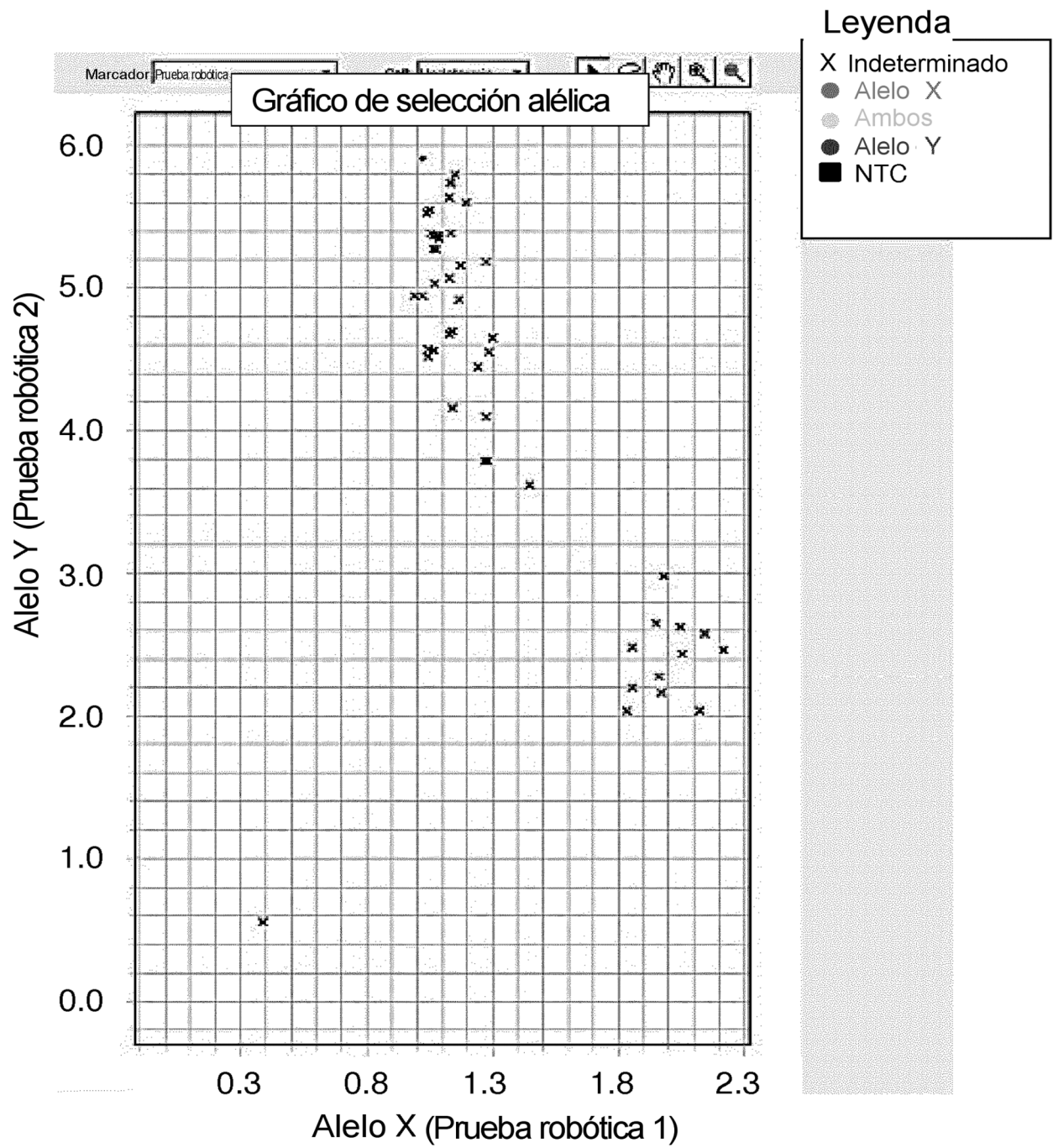


Figura 3. Identificación alélica de embriones de maíz haploides individuales después de utilizar el método de lavado del endospermo.

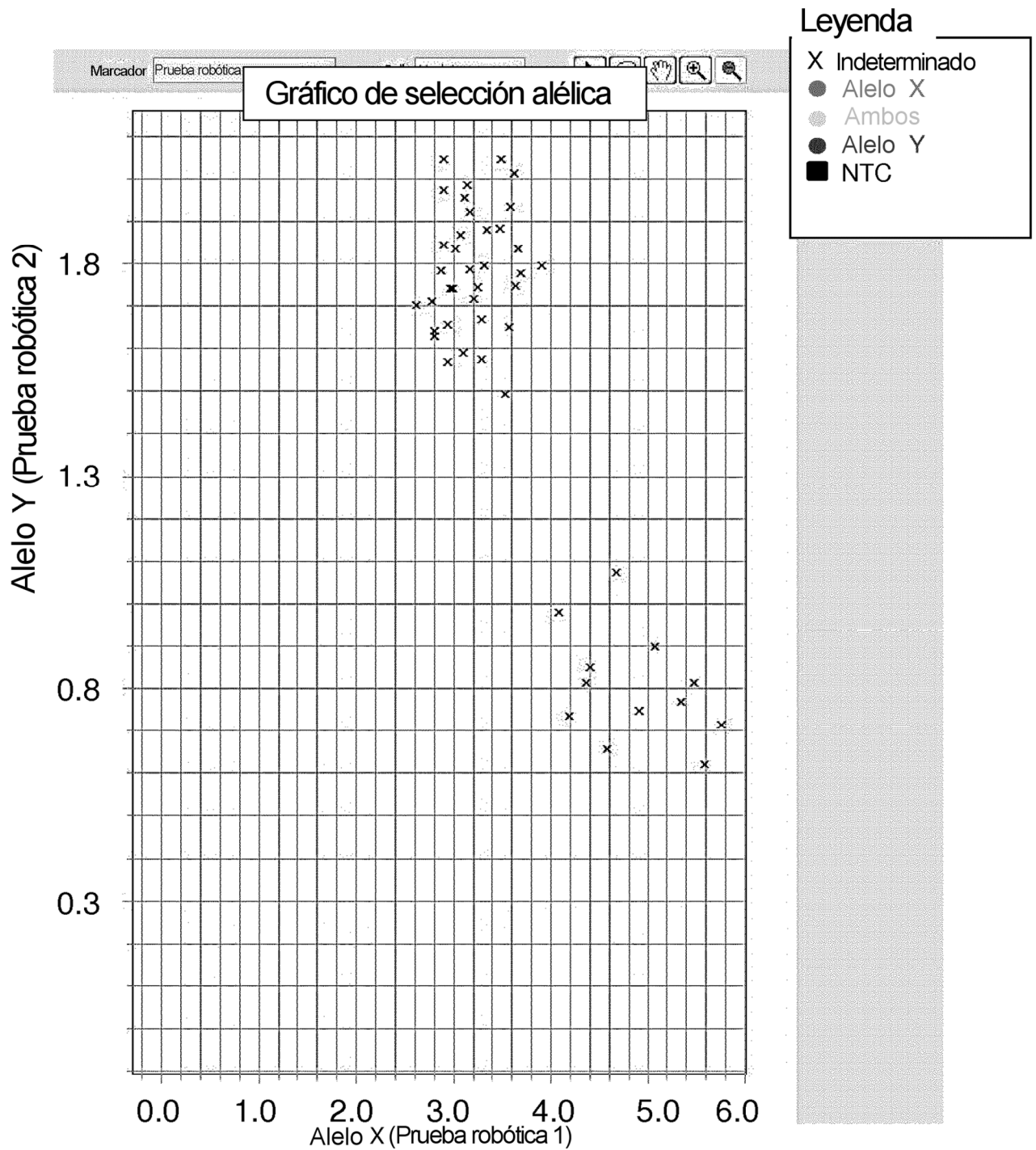


Figura 4. Identificación alélica de embriones de maíz haploides individuales después de utilizar el método 2 de lavado del endospermo.

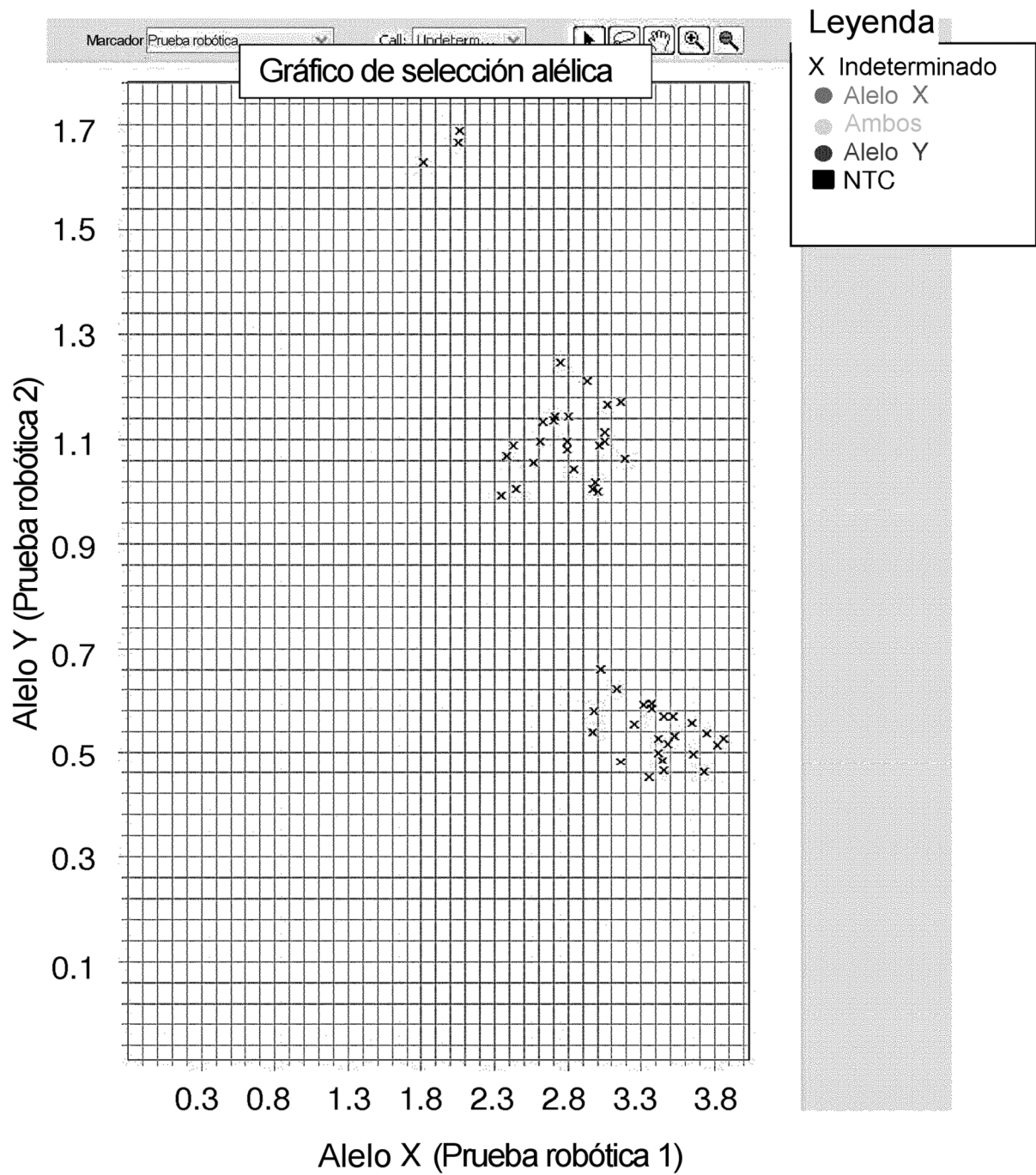


Figura 5. Identificación alélica de embriones de maíz diploides individuales empapados en NaOH 20 mM durante 1 hora.

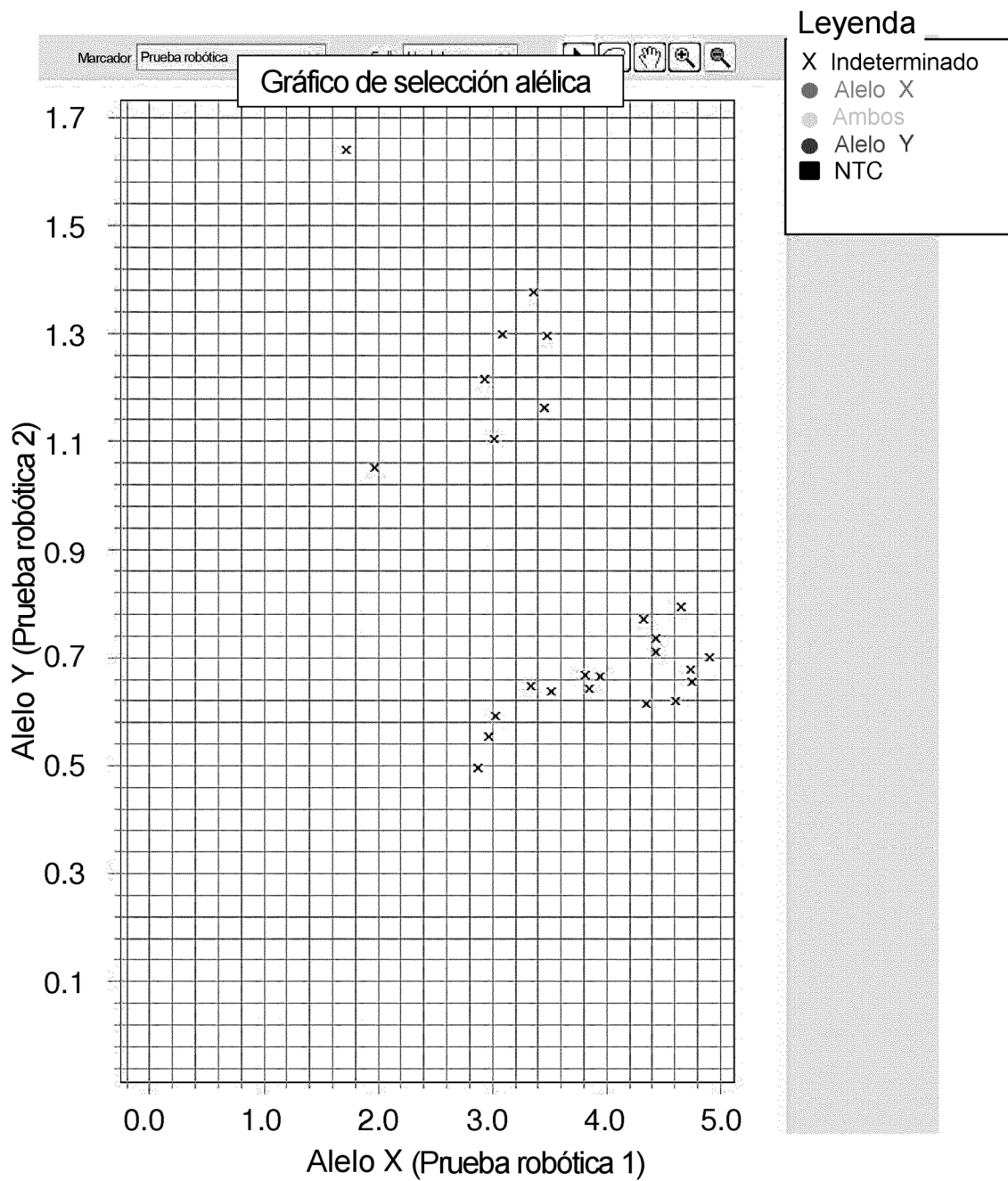


Figura 6. Identificación alélica de embriones de maíz diploides individuales como una función del muestreo tisular mediante la extracción de fragmentos sólidos del escutelo utilizando un orificio pequeño de una punta de pipeta.

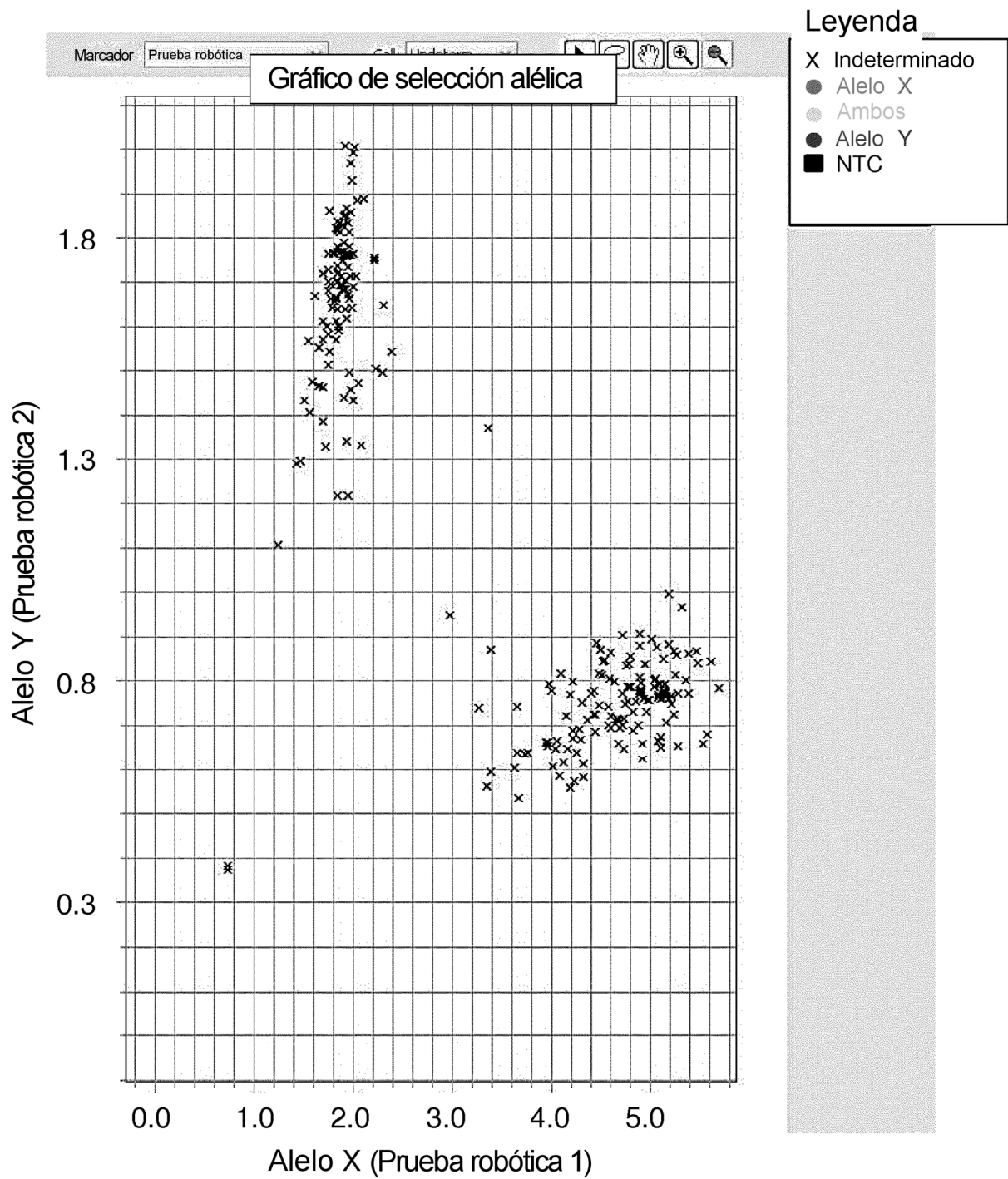


Figura 7. Identificación alélica de 288 embriones de maíz haploides individuales como una función del muestreo tisular mediante la extracción de fragmentos sólidos del escutelo utilizando un orificio pequeño de una punta de pipeta.

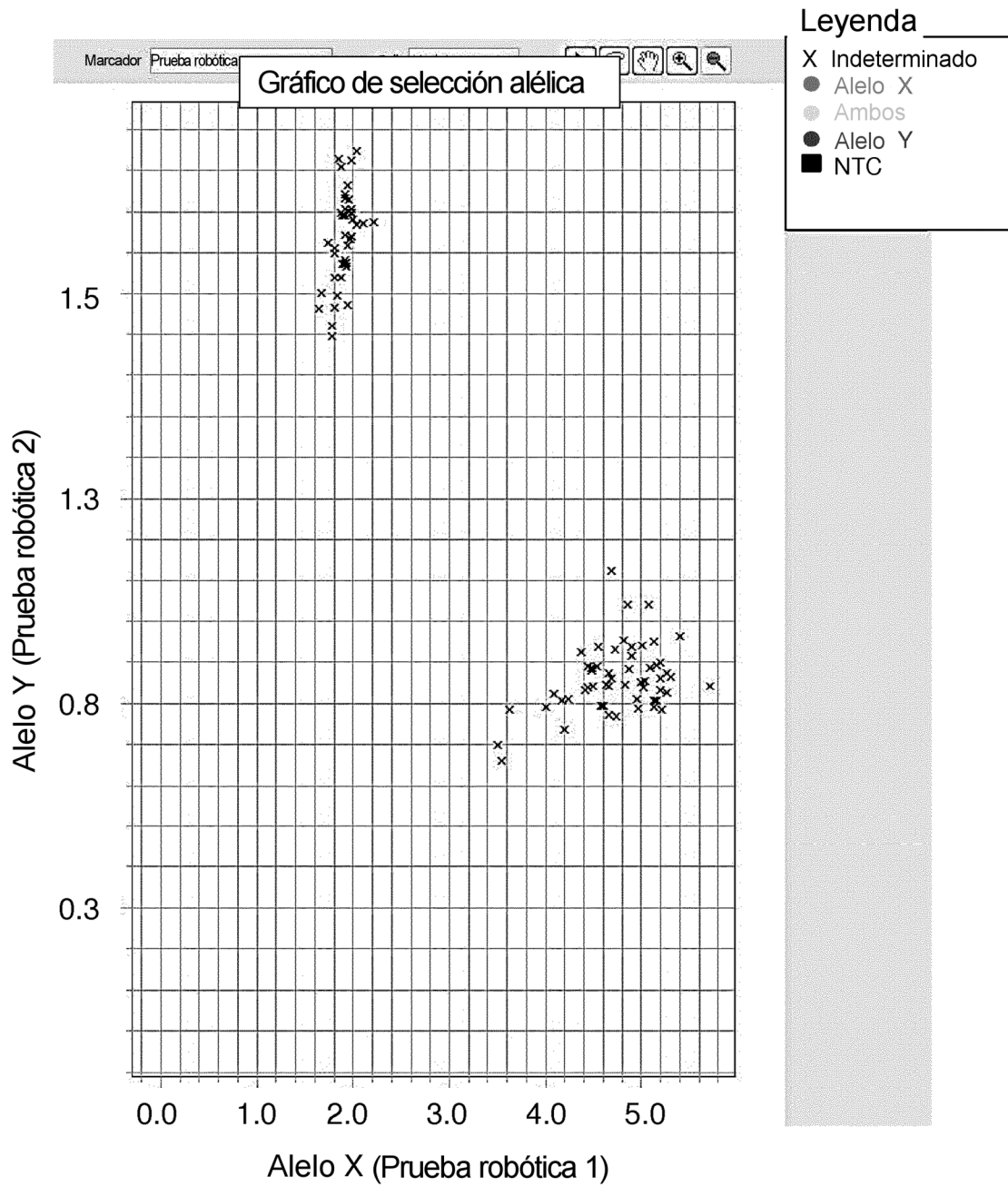


Figura 8. Identificación alélica de embriones de maíz haploides individuales como una función del muestreo tisular del escutelo penetrando con un palillo.

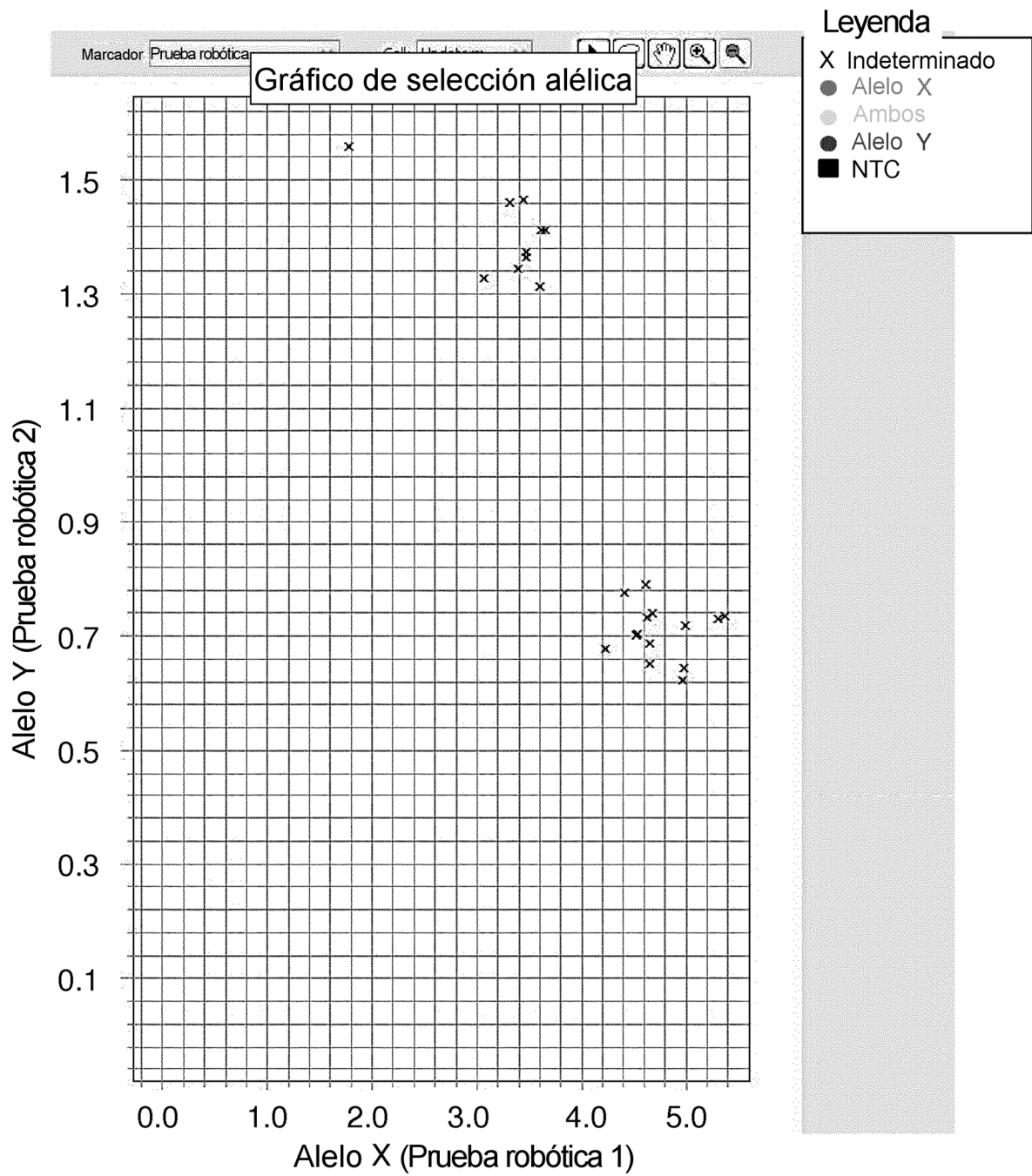


Figura 9. Identificación alélica de embriones de maíz diploides individuales como una función del muestreo tisular del escutelo penetrando con un palillo.

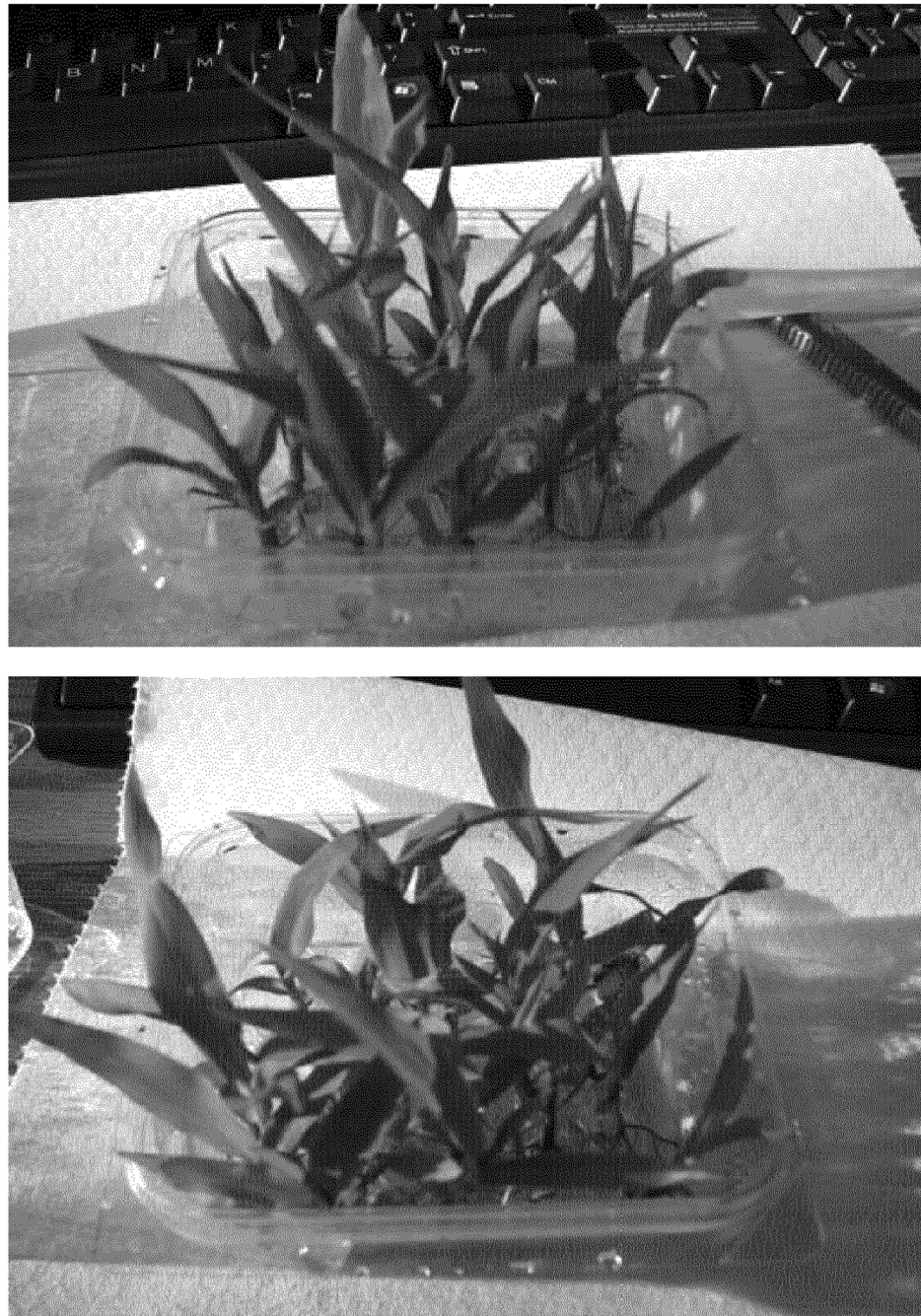


Figura 10. Plántulas haploides resultantes del empapado de embriones haploides en NaOH.

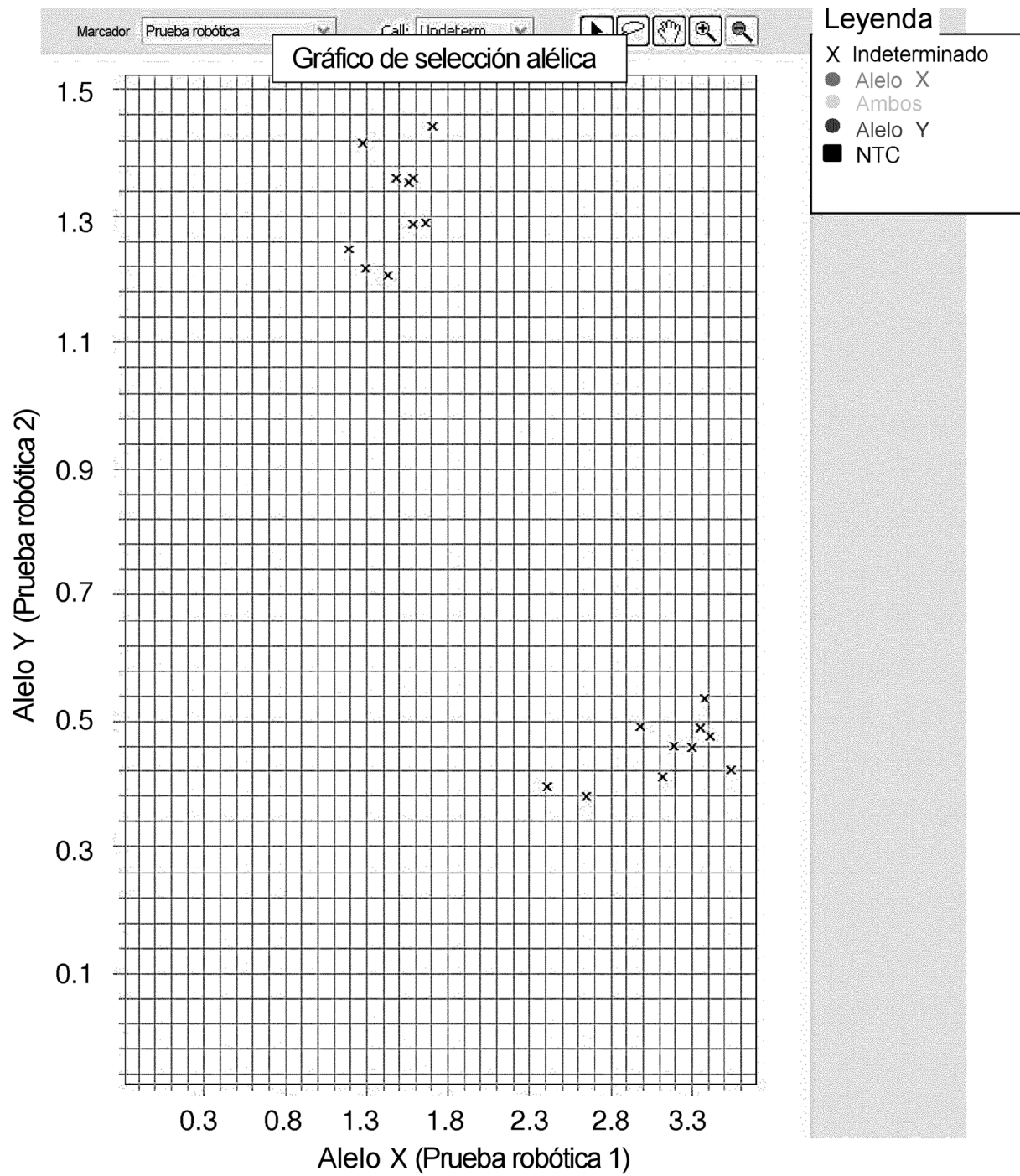


Figura 11. Identificación alélica de embriones de maíz haploides individuales empapados en TrisHCl 200 mM, pH 9.2/0.0025-0.005% de SDS

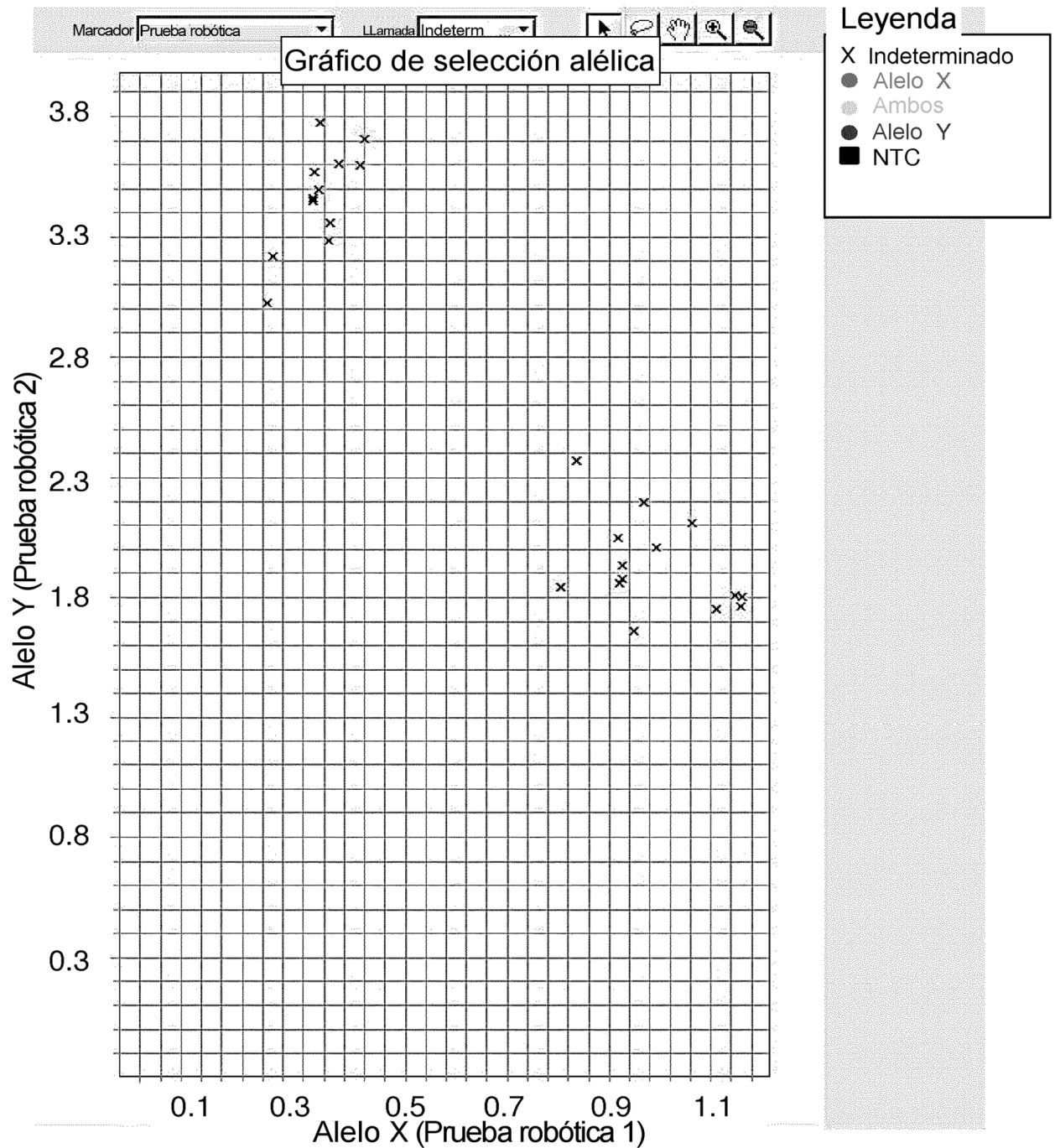


Figura 12. Identificación alélica de embriones de maíz haploides individuales empapados en TrisHCl 200 mM, pH 9.2/ 0.005% de SDS. Antes del empapado, algunas partes del tejido del escutelo y del eje embrionario de cada embrión se retiraron con una cuchilla de afeitar

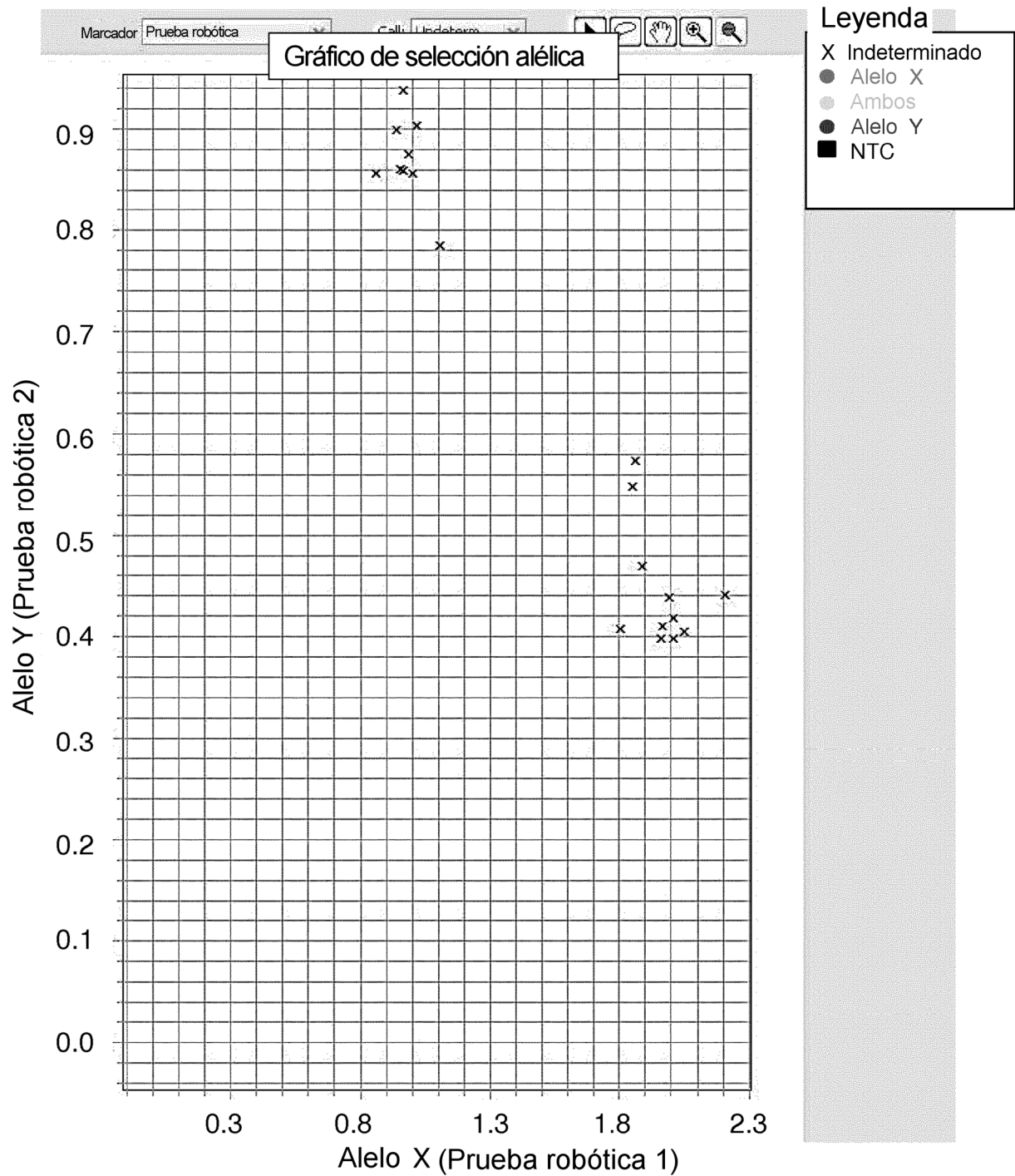


Figura 13. Identificación alélica de embriones de maíz haploides individuales empapados en una solución que contiene celulasa

