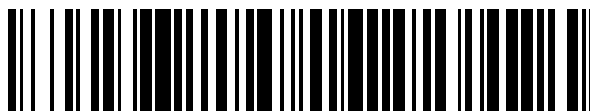


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 688 175**

51 Int. Cl.:

**A01H 5/10** (2008.01)

**A01H 1/04** (2006.01)

**A01C 1/00** (2006.01)

**G01N 33/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.05.2014 PCT/EP2014/061036**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.12.2014 WO14195199**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.05.2014 E 14727458 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.07.2018 EP 3003014**

54 Título: **Aislamiento de ADN no disruptivo de semillas de maíz**

30 Prioridad:

**03.06.2013 US 201361830242 P**

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

**31.10.2018**

73 Titular/es:

**SYNGENTA PARTICIPATIONS AG (100.0%)  
Schwarzwaldallee 215  
4058 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**HANNAPPEL, ULRICH STEPHAN**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 688 175 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

Aislamiento de ADN no disruptivo de semillas de maíz

### Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a sistemas y procesos para aislar ADN de materiales biológicos tales como semillas mientras que se retiene una semilla viable para uso posterior. La semilla de la que se aísla el ADN sigue siendo viable y se utiliza o descarta en base al análisis de ADN de la solución de remojo de semillas. La solución de remojo de semillas puede tener básicamente todo el ADN maternal de confusión de la semilla eliminado de las soluciones de remojo de semillas al emplear pretratamientos de semillas intactas. Este método es particularmente útil para semillas de maíz.

### 10 Antecedentes de la invención

La investigación de la industria de las semillas comerciales en plantas resulta en mejoras genéticas en las semillas. Varios procesos diferentes pueden resultar en semillas mejoradas, sistemas haploides/haploides dobles, reproducción tradicional o asistida por genotipos, mutación, transformación, etc. La semilla mejorada cuando es genéticamente estable se aumenta de forma tal que haya una gran cantidad de la semilla mejorada para la venta a  
15 los cultivadores. En el proceso de aumentar las líneas o encontrar y desarrollar líneas estables la semilla se planta y cosecha y se selecciona a lo largo de varias estaciones. Hasta que la planta tenga una mejora deseada hereditaria fija y estable, no todas las semillas expresan la mejora. En el proceso de reproducción las semillas sin mejora de la población se retiran antes de plantar la siguiente generación de semillas. Se utilizan muestreos estadísticos que se evalúan para determinar si la mejora está en la semilla cuando se aumenta la población de semillas. Los resultados  
20 de la prueba determinan si hay semillas que deberían eliminarse porque carecen de mejoras. Este proceso no es eficiente porque a menudo resulta en pérdida de algunas semillas deseadas y mantenimiento de alguna semilla no deseada.

Para superar las deficiencias de los muestreos estadísticos, la industria de las semillas ha desarrollado sistemas y métodos de muestreo de material de forma no destructiva de las semillas para su evaluación. Principalmente, el  
25 objetivo de estos métodos es retirar una porción de una semilla, la 'astilla de la semilla', que se utiliza para el muestreo. A la 'astilla de la semilla' o muestra de la semilla a menudo se le ha extraído el ADN, en el que se analizan las características de semilla deseadas. Dependiendo de los resultados de la prueba de muestra de semillas, la semilla viable correlacionada se utiliza para plantar o se descarta.

Las eficiencias en la producción de astillas de semillas y semillas desastilladas viable han sido el centro del  
30 desarrollo de dispositivos mecánicos para automatizar el proceso. Se han desarrollado dos tipos de dispositivos de "desastillado" automatizados. Cada uno tiene un dispositivo para retirar material de una semilla: uno usa una brocada y el otro usa un láser. Estos dispositivos tienen un transportador de semillas para transportar la semilla al compartimiento en una bandeja de semillas; y un transportador de muestra para transportar el material eliminado de la semilla a un compartimiento correspondiente en una bandeja de muestras. La semilla de muestra se utiliza para  
35 extracción de ADN que se evalúa. La semilla viable se almacena. Y cada proceso correlaciona las astillas de semilla con la semilla viable de la cual se descascarilló. La astilla se utiliza para pruebas y la semilla se descarta, se almacena o se utiliza para plantar.

En funcionamiento las ubicaciones de esta bandeja de muestra y la bandeja de semillas deben estar asociadas de  
40 manera que cuando las muestras de semilla se evalúan, los resultados de la prueba se puedan emplear para seleccionar o clasificar las semillas. Estos dispositivos se configuran para evaluar grandes cantidades de semillas que resultan en dos conjuntos de almacenamiento de bandeja, dos conjuntos de documentación de bandejas y dos conjuntos de ubicaciones que deben coordinarse de manera que se mantenga asociación entre los dos conjuntos de semillas de muestra y la semilla no evaluada viable.

Los métodos y dispositivos de la técnica anterior para el sistema automatizado requieren dos partes de semilla  
45 esenciales, la semilla viable para plantar y la muestra de la semilla, en otras palabras, la astilla para pruebas, véase, por ejemplo, el documento WO 2011/119763. La astilla proporcionó el ADN de la semilla para pruebas. Aunque estos sistemas automatizados diferentes tienen diferentes medios para posicionar las semillas para el corte, el corte de la astilla de semilla de la semilla, para transportar la semilla y la astilla, etc., ambos sistemas son trabajosos y complejos. Estos sistemas de desastillado de semilla requieren que se mantenga una correlación constante entre las  
50 dos partes de semilla esenciales. Los sistemas automatizados existentes requieren una bandeja de material de semilla y una bandeja de las astillas de semilla. Estos sistemas requieren el uso de dos partes de semilla, cada una de las cuales se almacena y manipula por separado, pero con una asociación conocida. Este proceso requiere que la astilla y semilla correspondientes se ajusten correctamente de modo que los resultados de la prueba para la astilla resulten en la eliminación del material de semilla no deseado correcto. La presente invención aborda la complejidad  
55 de que se necesiten dos partes de semilla esenciales y la necesidad de rastrear la bandeja de semillas y la bandeja de astillas, lo que provoca varias de las complejidades existentes de las invenciones anteriores.

### Compendio de la invención

La presente invención no requiere que se haga un seguimiento de dos partes de semillas esenciales. En una realización, el método de la presente invención se desarrolla para analizar una población de semillas. En una realización, las semillas son semillas de maíz. El método tiene pasos de exposición del endospermo de la semilla, de semillas individuales en una población de semillas, preservando a la vez la viabilidad de germinación de las semillas, y empapando la semilla expuesta viable en una solución de liberación o aislamiento de ADN no disruptiva, formando así una solución de semilla a partir de cada una de las semillas individuales en la población y analizando la solución de semillas en presencia o ausencia de uno o más rasgos de interés. En una realización de la invención, la solución de liberación o aislamiento de una solución de liberación o aislamiento de ADN no disruptiva es una solución alcalina. La solución alcalina en algunos casos es hidróxido de sodio o hidróxido de potasio u otras soluciones alcalinas.

Adicionalmente, el método también puede tener un paso de pretratamiento que reduce el ADN maternal que se libera hacia la solución de semillas. El pretratamiento puede ser al menos un remojo de la semilla intacta, antes de la exposición del endospermo de la semilla para motivar la liberación del ADN maternal desde la porción externa de la semilla.

En una realización, el pretratamiento puede ser un pretratamiento de la semilla para inhibir la liberación del ADN maternal. El pretratamiento puede ser con una solución alcalina o puede ser un recubrimiento o pulverización de semillas sobre la porción externa de la semilla. El pretratamiento puede ser pulverización con pintura metálica.

El método también puede incluir el paso de utilizar un dispositivo de la técnica anterior para exponer el endospermo de la semilla. En una realización, se retira la punta de la semilla. El dispositivo utilizado puede ser un láser, un cuchillo, una cuchilla de afeitar o un sistema de corte de semillas automatizado.

Por lo tanto, la exposición puede formarse mediante eliminación de una pequeña porción de la semilla, o mediante un túnel a través del endospermo, o mediante corte e una porción de cuña de la semilla dejando una porción del endospermo expuesto. En una divulgación se expone el endospermo harinoso.

Se proporciona un método para analizar una población de semillas: el paso de pretratamiento, al menos una vez, de una semilla intacta de la población que forma una solución de semilla intacta, reduciendo así la presencia de ADN maternal de la porción externa de la semilla expuesta en la solución de remojo de semilla. De esta forma, en una realización, la cantidad de ADN liberado a la solución de remojo puede reducirse por un abordaje de remojo de "dos pasos". En una realización, la cantidad de ADN (maternal) de pericarpio de la porción externa de la semilla liberada a la segunda solución de remojo es considerablemente más baja. En una realización, solo el alelo presente en el tejido de endospermo es detectable en la segunda solución de remojo.

El método para analizar una población de semillas en donde la solución no disruptiva es una solución no disruptiva de liberación o aislamiento de ADN. Dicha solución no disruptiva de liberación o aislamiento de ADN es una solución alcalina. El método puede emplear una solución de hidróxido de sodio. Soluciones alternativas incluyen otras soluciones alcalinas tales como hidróxido de potasio, y similares. Las semillas continúan siendo viables en todo momento.

Las semillas se eliminan y secan después del remojo en solución. Las semillas luego pueden almacenarse durante al menos una semana. El ADN que se libera a la solución de remojo puede concentrarse utilizando isopropanol.

En algunas realizaciones la solución de remojo de semilla se utiliza para determinar el carácter genotípico o el carácter fenotípico de las semillas en la población con la solución aislada de semilla viable expuesta.

El método incluye el diagnóstico de si una o más semillas de la población exhiben la presencia o ausencia de uno o más de los rasgos de interés; y (opcionalmente) clasificar las semillas. El ADN aislado en la solución de remojo puede evaluarse para uno o más rasgos de interés que comprenden un marcador genético, un polimorfismo de un solo nucleótido, una repetición de secuencia simple, un haplotipo y similar.

En otra realización adicional, el método para analizar una población de semillas tiene uno o más rasgos no deseables de interés como los rasgos de interés. En esta realización el método tiene un paso de clasificación de una o más semillas de la población de semillas en base a la presencia o ausencia de dicho o dichos rasgos de interés no deseables, y el descarte o la retención de las semillas clasificadas.

Otra divulgación es una población voluminosa de semillas viables, en donde básicamente todas las semillas en la población tienen una porción de endospermo de semillas expuesto en donde básicamente todas las semillas en la población tienen la presencia o ausencia de al menos un rasgo en común dirigido, y en donde la presencia o ausencia de dicho o dichos rasgos en las semillas en la población se determina mediante análisis de la solución de semillas de la semilla viable. Adicionalmente esta solución de semilla no se forma de una muestra de semilla separada tomada de la semilla viable, sino que la solución de semilla es de la propia semilla.

**Breve descripción de los dibujos**

Fig. 1: Representación de una semilla de maíz con la punta de la semilla extraída de una semilla como las 12 semillas en el Ejemplo 1. La semilla se remojó en NaOH. La punta (no se muestra) se descartó.

Fig. 2: Representación de plantas que han germinado de las semillas del Ejemplo 1.

5 Fig. 3: Gráfica de discriminación alélica del ensayo 1 del Ejemplo 1, ADN obtenido de las semillas. La flecha está marcando la muestra no coincidente. Las 'X' en la esquina superior izquierda son los alelos Y (no indeterminados) y las 'X' en la esquina inferior derecha son los alelos X (no indeterminados). El eje Y se lee "Alelo Y (Prueba robot 2)" y el eje X se lee "Alelo X (Prueba robot 1)" en la gráfica de la Figura 3, y en todas las demás figuras con gráficas de discriminación alélica.

10 Fig. 4: Gráfica de discriminación alélica del ensayo 1, ADN extraído de tejido de hojas. Las 'X' en la esquina superior izquierda son los alelos Y (no indeterminados) las 'X' en la esquina inferior derecha son los alelos X (no indeterminados).

Fig. 5: Gráfica de discriminación alélica, ADN obtenido de la solución de remojo. Cada muestra se evaluó con dos concentraciones de ADN.

15 Fig. 6: Gráfica de discriminación alélica del ensayo 1 (puntos azules: ADN obtenido de la primera solución de remojo, puntos rojos: ADN obtenido de la segunda solución de remojo, cada muestra se evaluó con dos concentraciones de ADN. Los puntos en la gráfica a la izquierda de la línea punteada agregada corresponden a puntos azules. Los puntos en la gráfica a la derecha de la línea punteada agregada corresponden a puntos rojos.

20 Fig.7: Gráfica de discriminación alélica del ensayo 1. Puntos azules: ADN obtenido de la primera solución de remojo, puntos rojos: ADN obtenido de la segunda solución de remojo. Cada muestra se evaluó con dos concentraciones de ADN. Los puntos en la gráfica a la izquierda de la línea punteada agregada corresponden a puntos azules. Los puntos en la gráfica a la derecha de la línea punteada agregada corresponden a puntos rojos.

Fig. 8: Gráfica de discriminación alélica, ensayo 1. Plantilla de ADN: ADN obtenido de la primera solución de remojo. Cada muestra se evaluó con 2 concentraciones de ADN. La muestra con círculos y marcada con flechas son no coincidencias alélicas entre la primera y la segunda solución de remojo.

25 Fig.9: Gráfica de discriminación alélica, ensayo 1. Plantilla de ADN: ADN obtenido de la segunda solución de remojo. Cada muestra se evaluó con 2 concentraciones de ADN. La muestra con puntos circulares y marcada con flechas son no coincidencias alélicas entre la primera y la segunda solución de remojo.

Fig 10: Representación de las semillas antes de plantar.

Fig 11: Las semillas germinadas se muestran en la Fig. 10.

30 Fig.12: Gráfica de discriminación alélica, ensayo 1. ADN obtenido de las semillas (segunda solución de remojo).

La Fig. 13 muestra una gráfica de discriminación alélica, ensayo 1, ADN extraído de tejido de hojas.

Fig. 14: Gráfica de discriminación alélica, ensayo 2, ADN obtenido de las semillas (segunda solución de remojo).

Fig. 15: Gráfica de discriminación alélica, ensayo 2, ADN extraído de tejido de hojas.

35 Fig. 16 A y B: Representación de las semillas germinadas que se pulverizan como un pretratamiento para reducir el aislamiento del ADN materno.

### Descripción detallada de la invención

40 La reproducción de semillas se ha hecho más eficiente mediante los procedimientos que permiten que el fitogenetista entienda más claramente el material genético y las variantes alélicas que están presentes o ausentes del material de reproducción. La comprensión genética de las plantas se recopila a través del análisis del ADN de las plantas o e ADN de la semilla de la planta. El ADN aislado de la semilla puede usarse para evaluar las semillas para la presencia o ausencia de las características deseadas para las poblaciones de reproducción. La presente invención es un método para aislar ADN de las semillas, mediante remojo de las semillas en una solución alcalina para solubilizar ADN, principalmente de una porción de semilla interna del endospermo harinoso en la solución de remojo de semilla que forma una solución de semilla y una semilla remojada viable con parte del endospermo expuesto. La solución de semilla está compuesta principalmente por ADN de semilla del endospermo de la semilla remojada. La semilla en remojo se seca y la semilla continúa siendo viable.

50 La solución de semilla contendrá ADN. El ADN se obtiene del endospermo de la semilla mediante remojo de las semillas expuestas en una solución alcalina, tal como NaOH. También pueden utilizarse en este proceso otras soluciones alcalinas. La prueba simple para utilizar otras soluciones es determinar si la semilla que se remoja en la solución tiene la calidad y cantidad suficiente de ADN útil para las pruebas deseadas y si se retiene la viabilidad de la semilla. Si la solución proporciona estos dos parámetros entonces puede utilizarse la solución. La concentración

de NaOH se mantiene baja y el tiempo de remojo se mantiene corto, entonces se mantiene la viabilidad de las semillas en remojo.

- 5 La semilla expuesta se remoja y la solución de semilla contendrá ADN de endospermo y ADN maternal del pericarpio. Muchas de las pruebas que usan la solución de semilla no requieren la presencia de ADN maternal. La cantidad de ADN de pericarpio (tejido maternal) puede reducirse mediante prerrejo de las semillas intactas en álcali antes de exponer las partes del tejido de endospermo.

### Cebado de semillas

El cebado de semillas es una técnica de hidratación controlada (remojo en agua u otra solución) y secado que resulta en una germinación más rápida cuando las semillas se vuelven a embeber.

- 10 Las semillas se remojan en una solución que altera las células y solubiliza el ADN a la solución. Las semillas se retiran de la solución de remojo, se secan y se almacenan. El ADN solubilizado puede utilizarse para evaluar las semillas almacenadas en busca de la presencia de variantes alélicas. Basado en los resultados de la evaluación, las semillas almacenadas pueden seleccionarse y plantarse.

### Procedimiento

- 15 Remojo de semillas en una solución de NaOH moderada (2 pasos):

Paso 1: Remojo de semillas en NaOH para alterar las células de pericarpio de modo que liberen ADN maternal. (Solución de remojo a descartar).

Se retira la parte superior de las semillas (por ejemplo, mediante cuchilla de afeitar, cuchillo, láser, etc.) para exponer el endospermo harinoso.

- 20 Paso 2: Remojo de semillas en NaOH para solubilizar el ADN (principalmente) del endospermo harinoso a la solución de remojo.

Después del remojo (con o sin agitación, agitación vorticial, etc.) las semillas se retiran de la solución de remojo, se secan y se almacenan. El ADN de la solución de remojo puede limpiarse y/o concentrarse para servir como plantillas para, por ejemplo, marcadores moleculares.

- 25 No se tienen que recolectar astillas de semillas. Se elimina la complejidad del sistema de dos semillas. El sistema de una semilla puede automatizarse fácilmente.

- 30 La solución de remojo de semilla de la presente divulgación se usa para evaluar la semilla en busca de un rasgo genético o químico preservando al mismo tiempo la viabilidad de la germinación de la semilla en remojo. Los resultados de las pruebas pueden ser de diagnóstico para el rasgo, y permiten que se clasifiquen, evalúen, descarten o seleccionen las semillas. La semilla viable puede plantarse y pueden cosecharse nuevas semillas de la planta y el protocolo de remojo de semillas puede realizarse en la nueva semilla.

- 35 Una divulgación de la semilla es una semilla de maíz, endógama, híbrida, haploide, haploide doble, transformada, mutada, etc. Puede emplearse cualquier semilla en el protocolo si continúa siendo viable después de la exposición del endospermo al protocolo de remojo. La semilla que puede utilizarse son semillas de grano como el maíz, trigo, arroz y similares, semillas oleaginosas o semillas de vegetales, frutas o flores que pueden mantener su viabilidad después del remojo, y proporcionan la calidad y cantidad de ADN necesaria para las pruebas.

- 40 Además, el ADN en la solución de remojo de semillas puede amplificarse mediante un método de amplificación adecuado conocido y los productos están disponibles en el mercado para amplificación de ADN. Se evalúa el marcador genético en el ADN que puede asociarse con la selección de QTL, haplotipos, alelos o genes. Los marcadores genéticos incluyen, a modo no taxativo, polimorfismos de un solo nucleótido, repeticiones simples de secuencia y similares. Las pruebas pueden emplear material de secuencia de ADN o ARN, promotores, genes, regiones no traducidas de genes, satélites, astillas con marcadores, perfiles de transcripción, patrones de metilación, alelos y similares.

- 45 Las pruebas a menudo buscan rasgos agronómicos como rendimiento, emergencia, encamado, altura, madurez, resistencia a las enfermedades, resistencia a las plagas. Estas pruebas también pueden identificar la resistencia o susceptibilidad al estrés biótico y abiótico, resistencia a herbicidas y características morfológicas. Las pruebas pueden diagnosticar la presencia o ausencia de otros rasgos para uso en los alimentos o la industria. Las pruebas pueden utilizarse para detectar la zigosis del embrión o la presencia de un transgén. Las pruebas pueden utilizarse para introgresión del rasgo o pruebas de pureza o ploidía.

- 50 La selección de poblaciones de reproducción puede iniciarse en base a los resultados de las pruebas. Después de que se forma la solución de semilla de la semilla en remojo, se seca la semilla en remojo. Las semillas en remojo secas pueden agruparse con todas las semillas deseadas de la población plantada en un vivero de reproducción o separadas siendo identificadas las semillas específicas cuando se planten. La selección de semillas y el número de

5 ciclos de reproducción depende del rasgo y los métodos de reproducción empleados. Si la semilla que se selecciona es endógama, entonces las etapas del proceso de reproducción pueden incluir cruzar la semilla seleccionada con otra endógama para formar la semilla híbrida. Dependiendo de la prueba deseada el protocolo de remojo puede utilizarse en semillas con germoplasma que incluye también semillas híbridas. El maíz es particularmente útil para este protocolo de remojo.

La identificación de la semilla viable evaluada permite uso reducido de tiempo, menos energía y esfuerzo por parte del fitogenetista. Además, resulta en menos uso de tierra y más poblaciones en la misma tierra.

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la invención, pero no deberían considerarse restrictivos del alcance de la invención.

## 10 EJEMPLO

### Ejemplo 1

#### Comparación de perfiles alélicos de ADN de semilla y de hoja

15 A un total de 12 semillas de maíz se les cortó la punta con una cuchilla de afeitado para exponer el endospermo harinoso. Las semillas se colocaron en 500 ul de 20 mM de NaOH durante 2 horas, con agitación vorticial constante (Figura 1).

Después de dos horas, las semillas se retiraron y se secaron a 30°C en una incubadora, luego se almacenaron a temperatura ambiente durante una semana. El ADN que se liberó a la solución de remojo se concentró por medio de precipitación de isopropanol.

20 Las semillas se plantaron en macetas simples en el invernadero. Todas las semillas germinaron y produjeron plantas (Figura 2). En la etapa de las 3 hojas, el tejido de hoja se cosechó para aislamiento de ADN. El ADN de la solución de remojo y del tejido de hojas se usó para pasar marcadores moleculares (ensayos Taqman). Se compararon las denominaciones alélicas de ADN de semilla y ADN de hoja.

Resultados:

Ensayo 1: Las denominaciones de alelos de ADN de semilla y hoja coincidieron para las 12 plantas (Figura 4).

25 Ensayo 2: Las denominaciones de alelos de ADN de semilla y hoja coincidieron para 11 plantas (Figura 3).

Se observó una no coincidencia en la que el locus se denominó heterocigótico para ADN de semilla, homocigótico para ADN de hoja.

Explicación: Diferencia alélica entre el ADN de tejido de endospermo y tejido de pericarpio (tejido maternal).

30 Conclusiones: El ADN puede obtenerse de la solución alcalina en la que se remojaron las semillas; las semillas pueden secarse y almacenarse; las semillas son viables; y ADN de pericarpio podría provocar no coincidencias entre las células alélicas de semillas y plantas.

### Ejemplo 2

#### Liberación de ADN de pericarpio a la solución de remojo

35 El objetivo del siguiente experimento era demostrar que una cantidad considerable de ADN se libera del tejido de pericarpio a la solución de remojo de NaOH.

Se colocaron doce semillas de maíz (sin retirar la punta, es decir, tejido de endospermo no expuesto) en 500 ul de NaOH 20mM.

- Los tubos se agitaron durante 2 horas a temperatura ambiente;
- Después de dos horas, las semillas se retiraron de la solución de remojo y el ADN liberado se concentró por medio de concentración de isopropanol; y
- El ADN obtenido de la solución de remojo se usó para realizar el ensayo 1

Los resultados se muestran en la Fig. 5, que muestra una gráfica de discriminación alélica de ADN obtenida de la solución de remojo. Cada muestra se evaluó con dos concentraciones de ADN.

45 La conclusión de este experimento fue que una cantidad considerable de ADN de tejido de pericarpio se libera a la solución de remojo.

### Ejemplo 3

**Reducción de la cantidad de ADN de pericarpio aislado**

El objetivo del siguiente experimento fue evaluar un método que reduciría la cantidad de ADN de pericarpio aislado.

- Se colocaron doce semillas de maíz (sin retirar las puntas, es decir, tejido de endospermo no expuesto) en 500 ul de NaOH 20mM.
- 5 - Los tubos se agitaron durante 1 hora a temperatura ambiente;
- Después de 1 hora las semillas se retiraron al segundo tubo que contenía 500 ul de NaOH 20 mM y se agitaron durante 1 hora;
- Después de 1 hora, las semillas se retiraron del segundo tubo;
- El ADN liberado del primer y el segundo remojo se concentró por medio de la precipitación de isopropanol.

10 **Resultados**

La Figura 6 muestra los resultados del experimento del Ejemplo 3. Muestra la gráfica de discriminación alélica del ensayo 1 (puntos azules: ADN obtenido de la primera solución de remojo, puntos rojos: ADN obtenido de la segunda solución de remojo). Cada muestra se evaluó con dos concentraciones de ADN.

**Ejemplo 4**

15 **Reducción adicional en ADN de pericarpio**

El objetivo del siguiente experimento fue el mismo que para el experimento 3 pero con modificación del procedimiento de remojo para reducir adicionalmente el ADN de pericarpio aislado.

- Se colocaron doce semillas de maíz (sin retirar las puntas, es decir, tejido de endospermo no expuesto) en 500 ul de NaOH 20mM.
- 20 - Los tubos se agitaron durante 1.5 horas a temperatura ambiente;
- Después de 1.5 horas las semillas se retiran al segundo tubo que contiene 500 ul de NaOH 10 mM y se agitaron durante 0.5 horas;
- Después de 1 hora, las semillas se retiraron del segundo tubo;
- El ADN liberado del primer y el segundo remojo se concentró por medio de la precipitación de isopropanol.

25 Los resultados del experimento 4 se muestran en la Figura 7, que permite una gráfica de discriminación alélica, ensayo 1. Los puntos azules indican ADN objetivo de la primera solución de remojo. Los puntos rojos indican ADN obtenido de la segunda solución de remojo. Cada muestra se evaluó con dos concentraciones de ADN.

La conclusión de los experimentos 3 y 4 es que la cantidad de ADN liberado a la solución de remojo puede reducirse por un abordaje de remojo de “dos pasos”.

30 **Ejemplo 5**

**Mayor eficiencia del proceso de remojo de dos pasos**

El objetivo del siguiente experimento fue medir el efecto del abordaje de remojo de 2 pasos en el aislamiento de ADN de las semillas en la precisión predictiva.

- 35 - Doce semillas (endospermo harinoso no expuesto) se remojaron en NaOH 20 mM durante 1.5 horas (agitación vorticial) a temperatura ambiente;
- Las semillas se quitaron de la solución de remojo, se secaron durante poco tiempo y el endospermo harinoso de cada semilla se expuso al retirar el tejido de semilla externo de la punta de semilla con una cuchilla de afeitar. Las semillas se colocaron luego en un segundo tubo que contenía 500 ul de NaOH 10 mM y se agitaron vorticialmente a temperatura ambiente durante 0.5 horas;
- 40 - Se retiraron las semillas, se enjuagaron un poco en Tris 0.5 mM y agua, se secaron durante la noche a 30°C en una incubadora y luego se almacenaron a temperatura ambiente durante una semana;
- El ADN liberado a la primera y la segunda solución de remojo se concentró por medio de la precipitación de isopropanol.

Los resultados se muestran en la Figura 8 y la Figura 9.

5 La Figura 8 muestra una gráfica de discriminación alélica, ensayo 1. La plantilla de ADN utilizada fue ADN obtenido de la primera solución de remojo. Cada muestra se evaluó con 2 concentraciones de ADN. La muestra con círculos y marcada con flechas son no coincidencias alélicas entre la primera y la segunda solución de remojo. La Figura 9 muestra una gráfica de discriminación alélica, ensayo 1. Plantilla de ADN: ADN obtenido de la segunda solución de remojo. Cada muestra se evaluó con 2 concentraciones de ADN. La muestra con puntos circulares y marcada con flechas son no coincidencias alélicas entre la primera y la segunda solución de remojo.

Conclusión del experimento 5. Alelo adicional del tejido de pericarpio que no está presente en el tejido de endospermo se libera a la solución de remojo. La cantidad de ADN de pericarpio liberada a la solución de remojo 2 es considerablemente más baja, solo se detecta el alelo presente en el tejido de endospermo.

## 10 **Ejemplo 6**

### **Comparación de callos alélicos de ADN de semilla y ADN de tejido de hoja**

Objetivo: Comparar los callos alélicos del ADN obtenido de las semillas (abordaje de remojo en dos pasos) y el ADN aislado del tejido de hoja de semillas germinadas.

15 Doce semillas del experimento 5 se plantaron en macetas únicas en un invernadero. Las semillas remojadas y secadas sin la parte superior de las semillas exponen el endospermo. Ver la Figura 10. Todas las semillas germinaron. Ver la Figura 11.

Los resultados de la Fig. 12 muestran una gráfica de discriminación alélica, ensayo 1. ADN obtenido de las semillas (segunda solución de remojo). Y la Fig. 13 muestra una gráfica de discriminación alélica, ensayo 1, ADN extraído de tejido de hojas.

20 La Fig. 14 muestra una discriminación alélica, ensayo 2, ADN obtenido de las semillas (segunda solución de remojo). Y la Fig. 15 muestra una gráfica de discriminación alélica, ensayo 2, ADN extraído de tejido de hojas.

Resultados finales: Se evaluaron las coincidencias de callos alélicos de ADN de semilla y coincidencias de ADN de hoja para ambos ensayos.

25 Conclusión del experimento 6. Los callos alélicos de las plantas pueden predecirse con precisión mediante remojo de las semillas de remojo en álcali antes de plantar.

## **Ejemplo 7**

### **Capacidades de germinación de la semilla pretratada**

30 Para evitar la liberación del ADN de pericarpio a la solución de remojo la semilla sin endospermo expuesto puede pretratarse. Un pretratamiento consiste en pulverización de las semillas con una solución antes del corte y el remojo de las semillas. A continuación se presenta un ejemplo: las semillas se pulverizaron con pintura magnética antes de retirar la parte superior de las semillas. Las semillas pulverizadas germinaron en toalla de papel.

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.



**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para analizar una población de semillas, comprendiendo el método: exponer el endospermo de la semilla, de semillas individuales en una población de semillas mientras se conserva la viabilidad de germinación de las semillas, remojar la semilla viable en una solución alcalina formando así una solución de remojo de semilla de al menos una de las semillas individuales en la población de semillas y analizar la solución de remojo de semillas para la presencia o ausencia de uno o más rasgos de interés, en donde el ADN aislado en la solución de remojo de semilla se evalúa para uno o más rasgos de interés que comprenden un marcador genético, un polimorfismo de un solo nucleótido, una repetición de secuencia simple, un haplotipo.
- 10 2. El método para analizar una población de semillas de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende: el paso de pretratamiento, al menos una vez, de una semilla intacta de la población que forma una solución de semilla intacta, por el que se reduce la presencia de ADN materno de la porción externa de la semilla expuesta en la solución de remojo de semilla.
- 15 3. El método para analizar una población de semillas de acuerdo con la reivindicación 1 a 2, que comprende determinar el carácter genotípico o el carácter fenotípico de las semillas en la población con la solución de semillas aislada de la semilla viable expuesta.
4. El método para analizar una población de semillas de acuerdo con la reivindicación 1 a 3 que comprende: el diagnóstico de si una o más semillas de la población exhibe la presencia o ausencia de uno o más de los rasgos de interés; y (opcionalmente) clasificar las semillas.



Figura 1



Figura 2

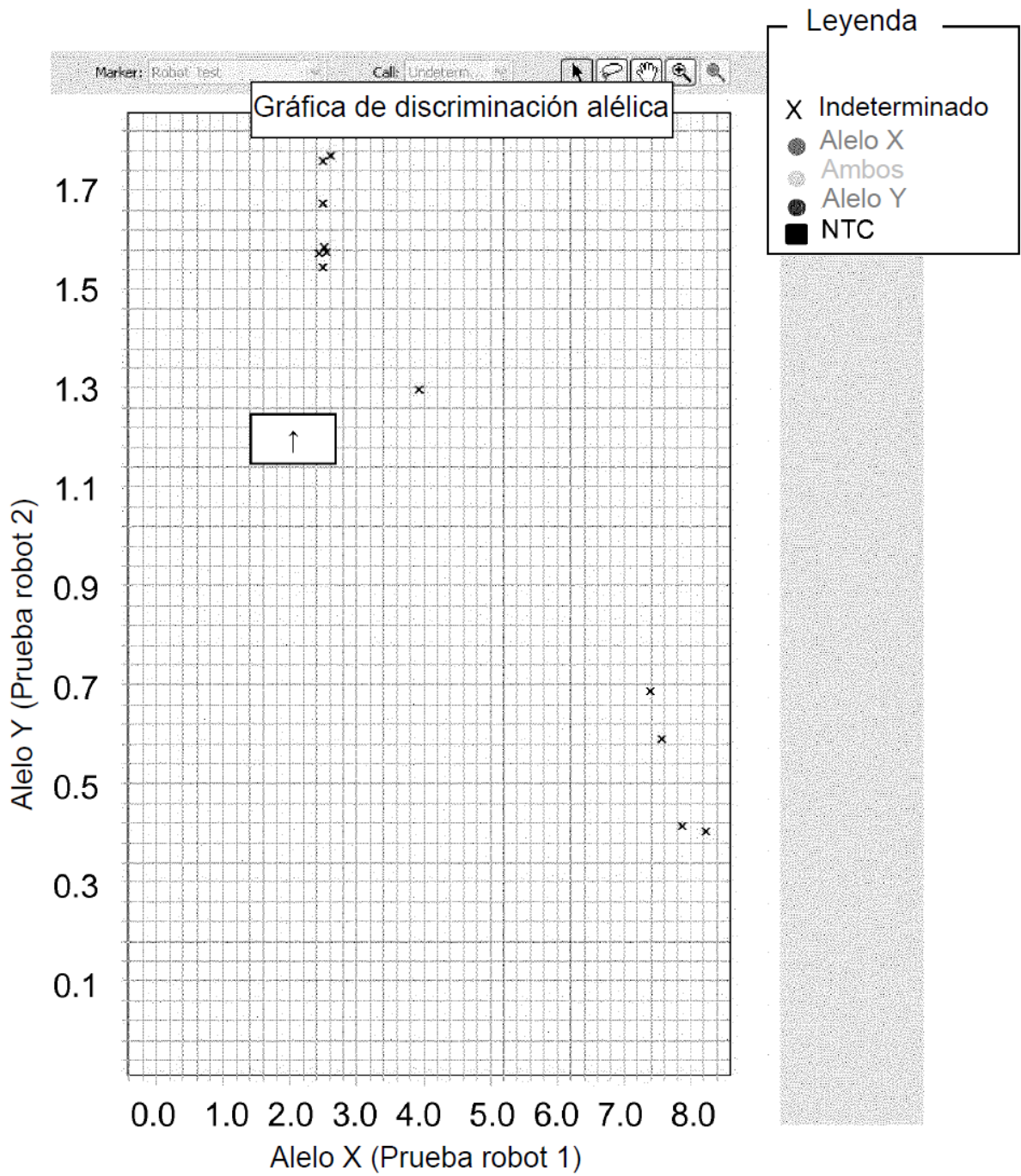


Figura 3

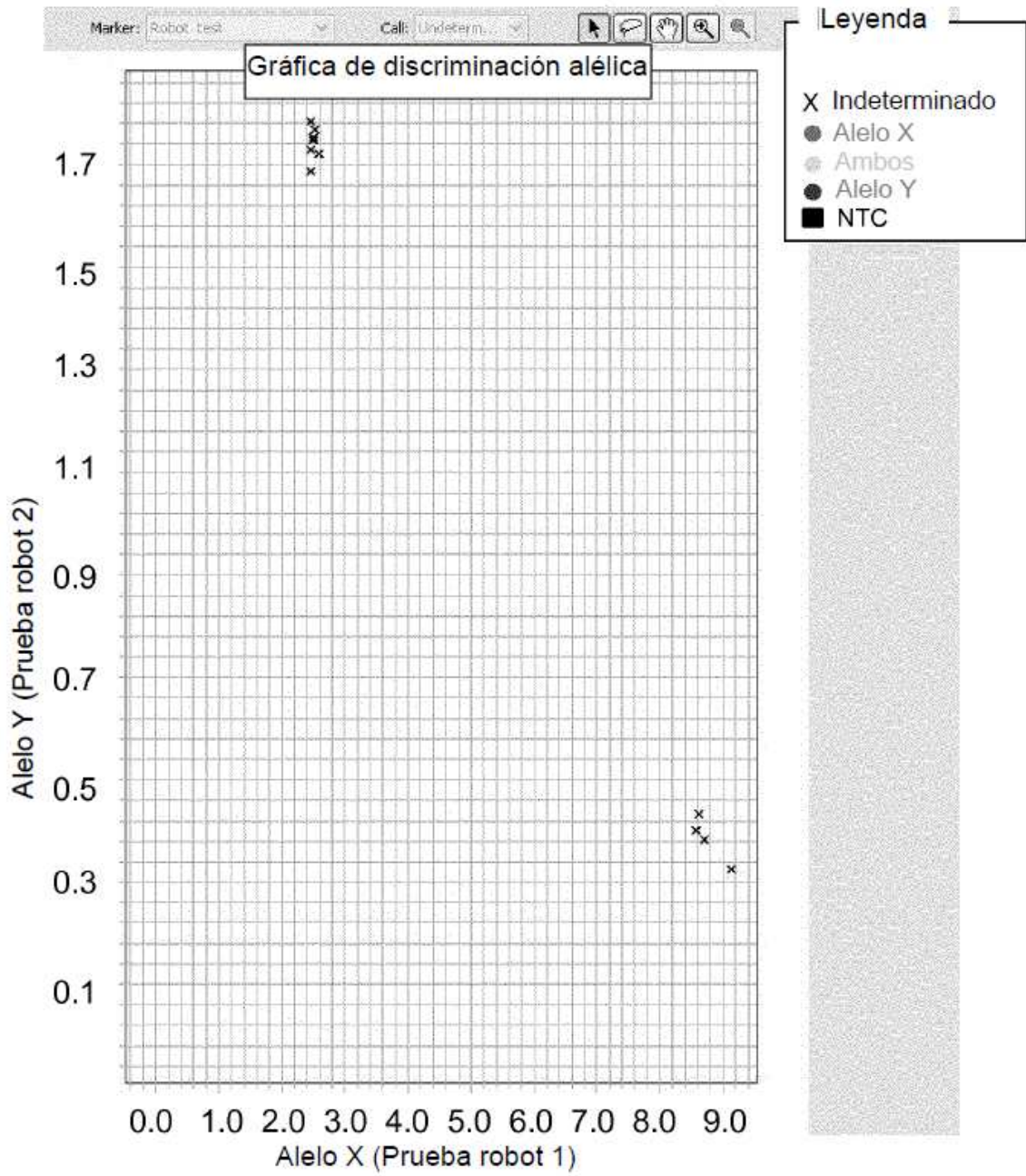


Figura 4

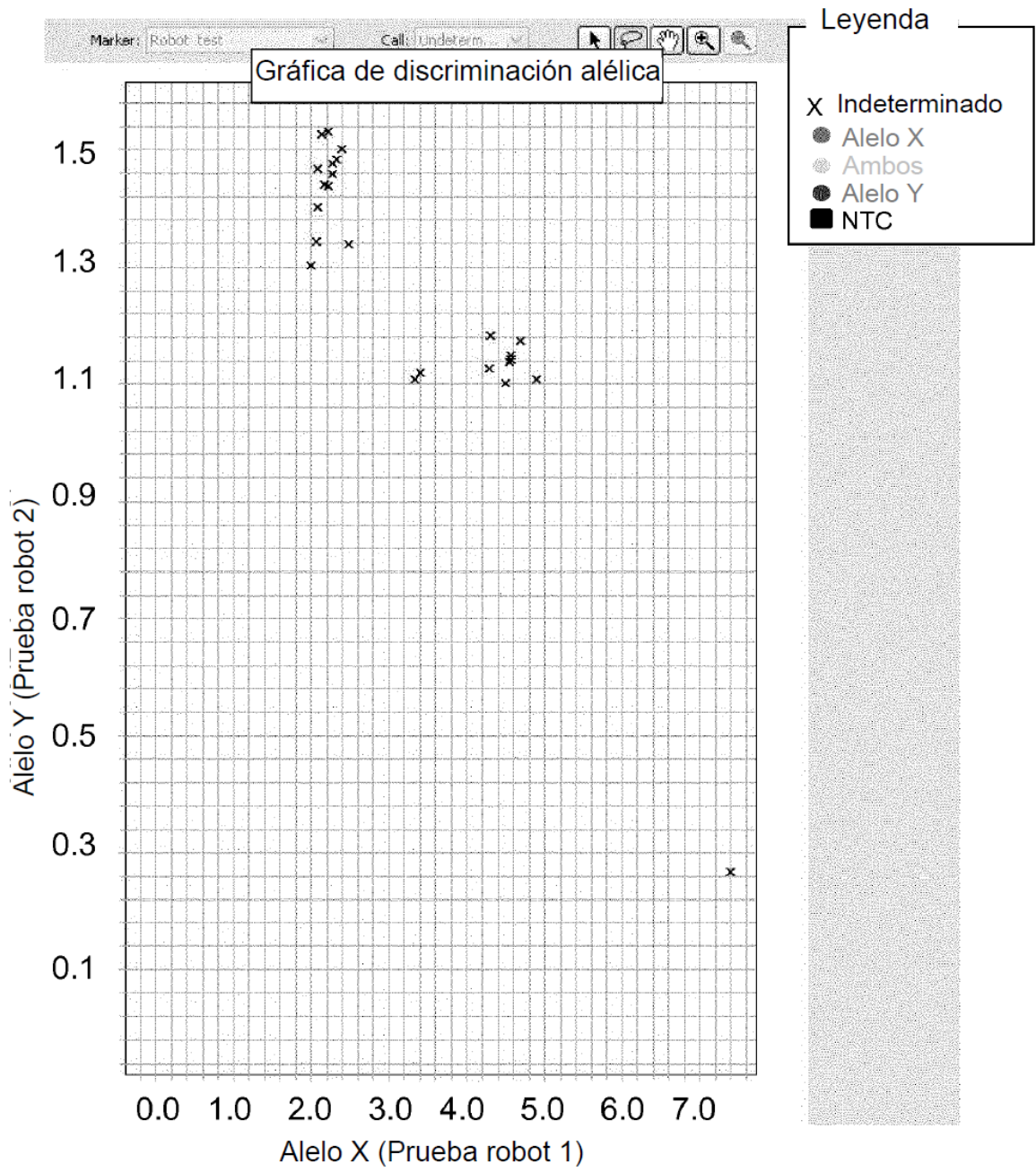


Figura 5

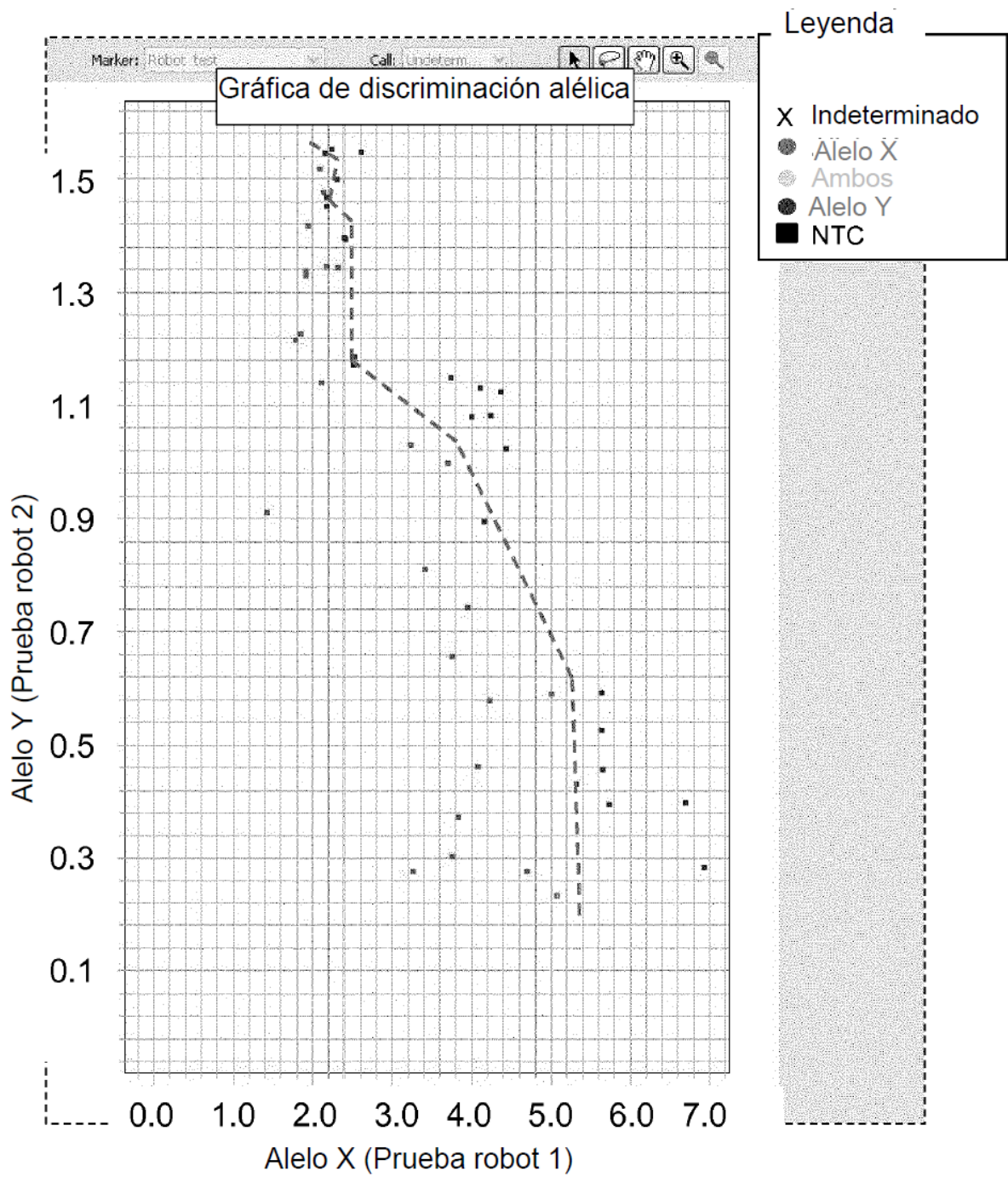


Figura 6

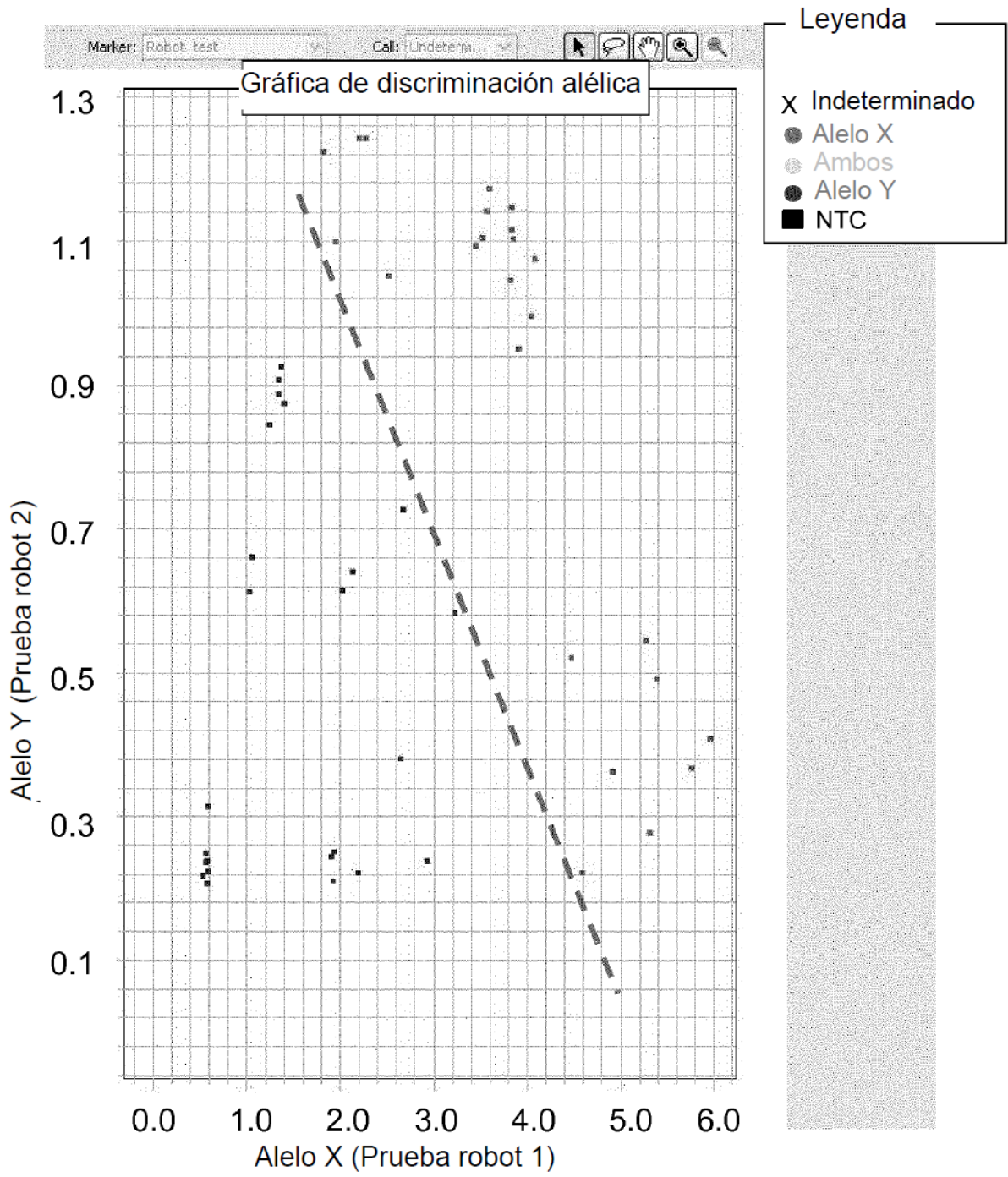


Figura 7



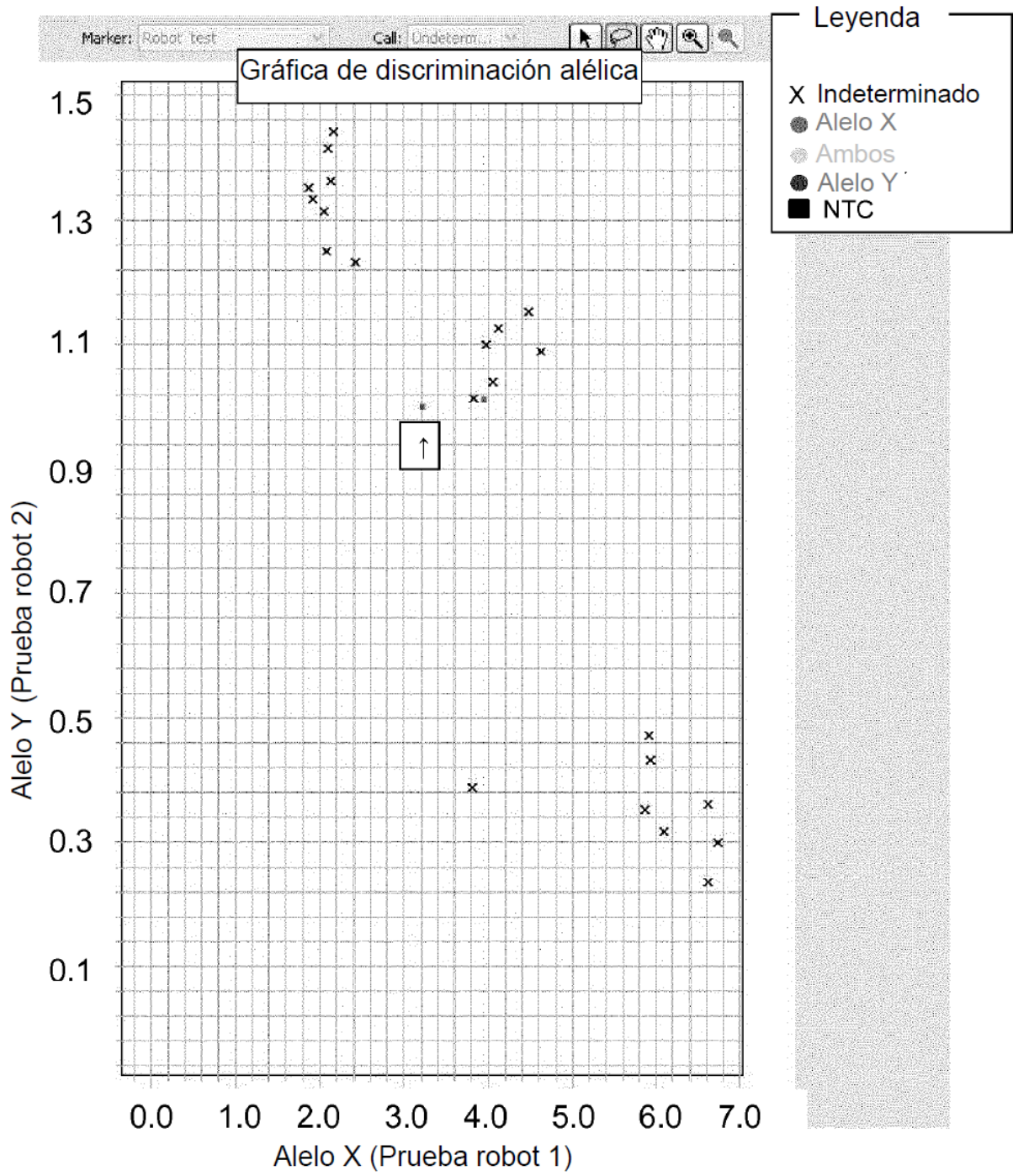


Figura 8

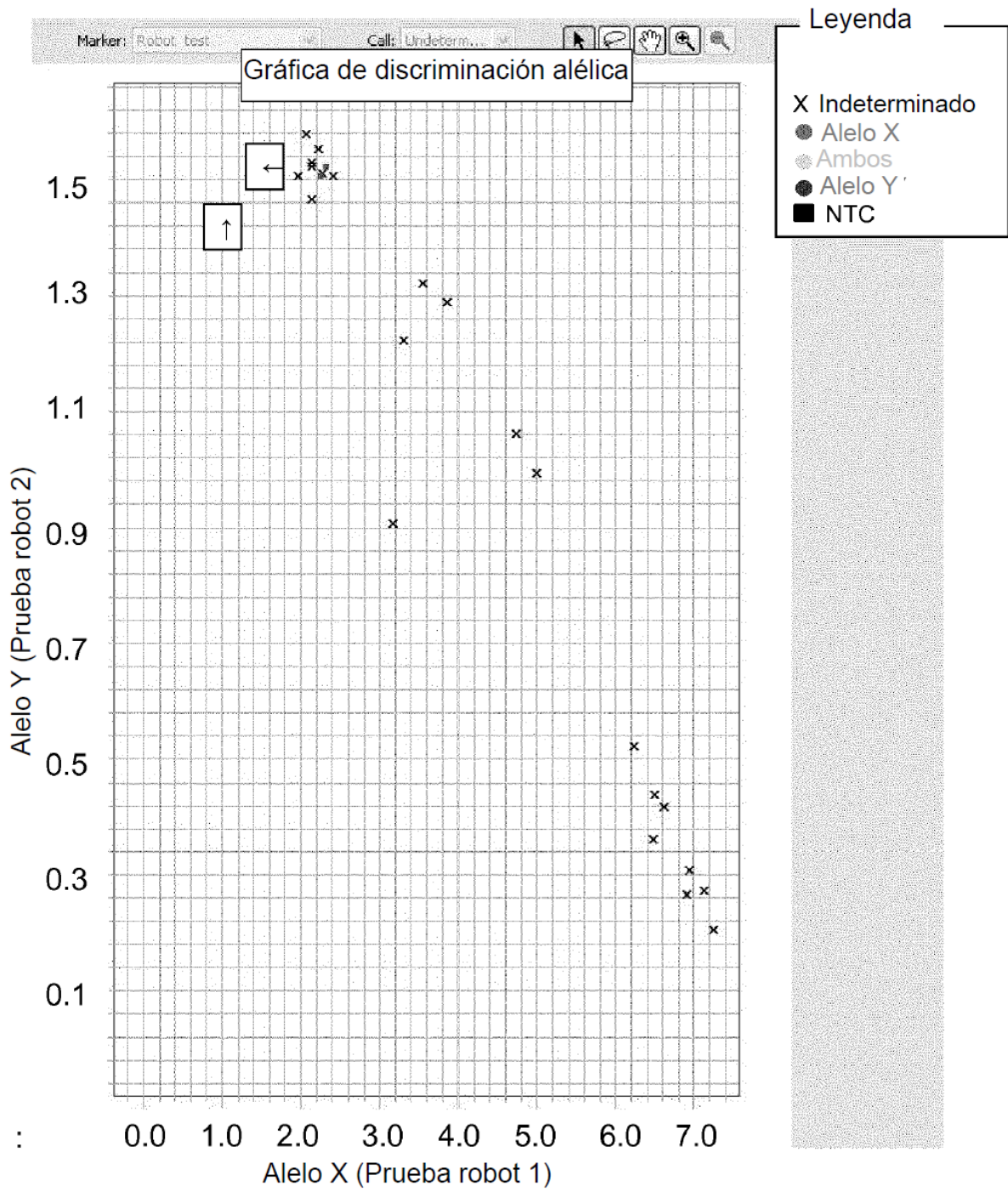


Figura 9



Figura 10

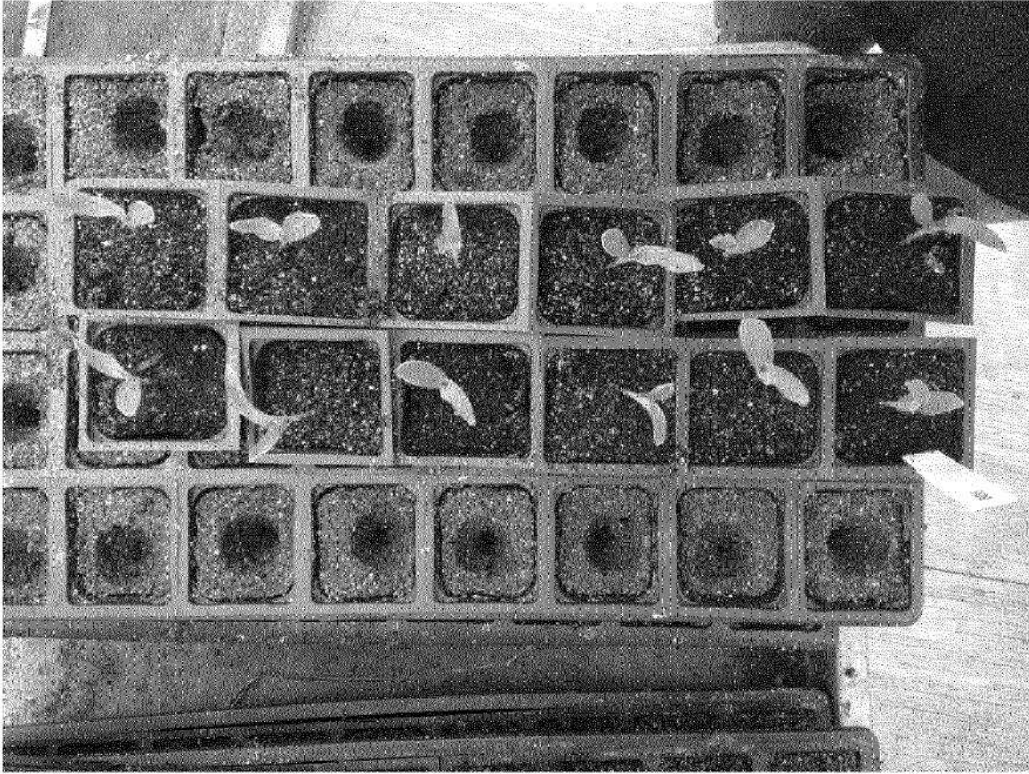


Figura 11

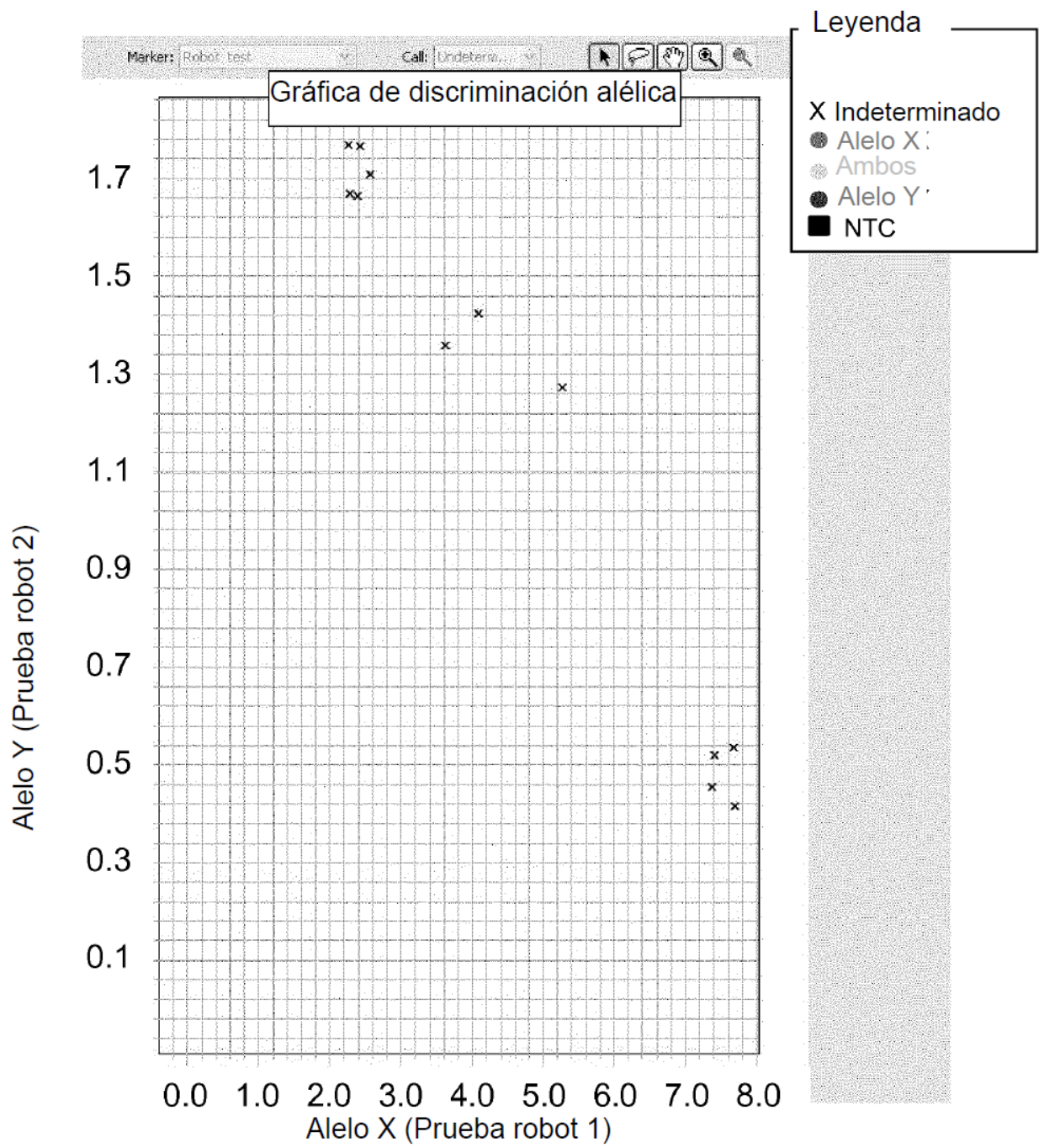


Figura 12

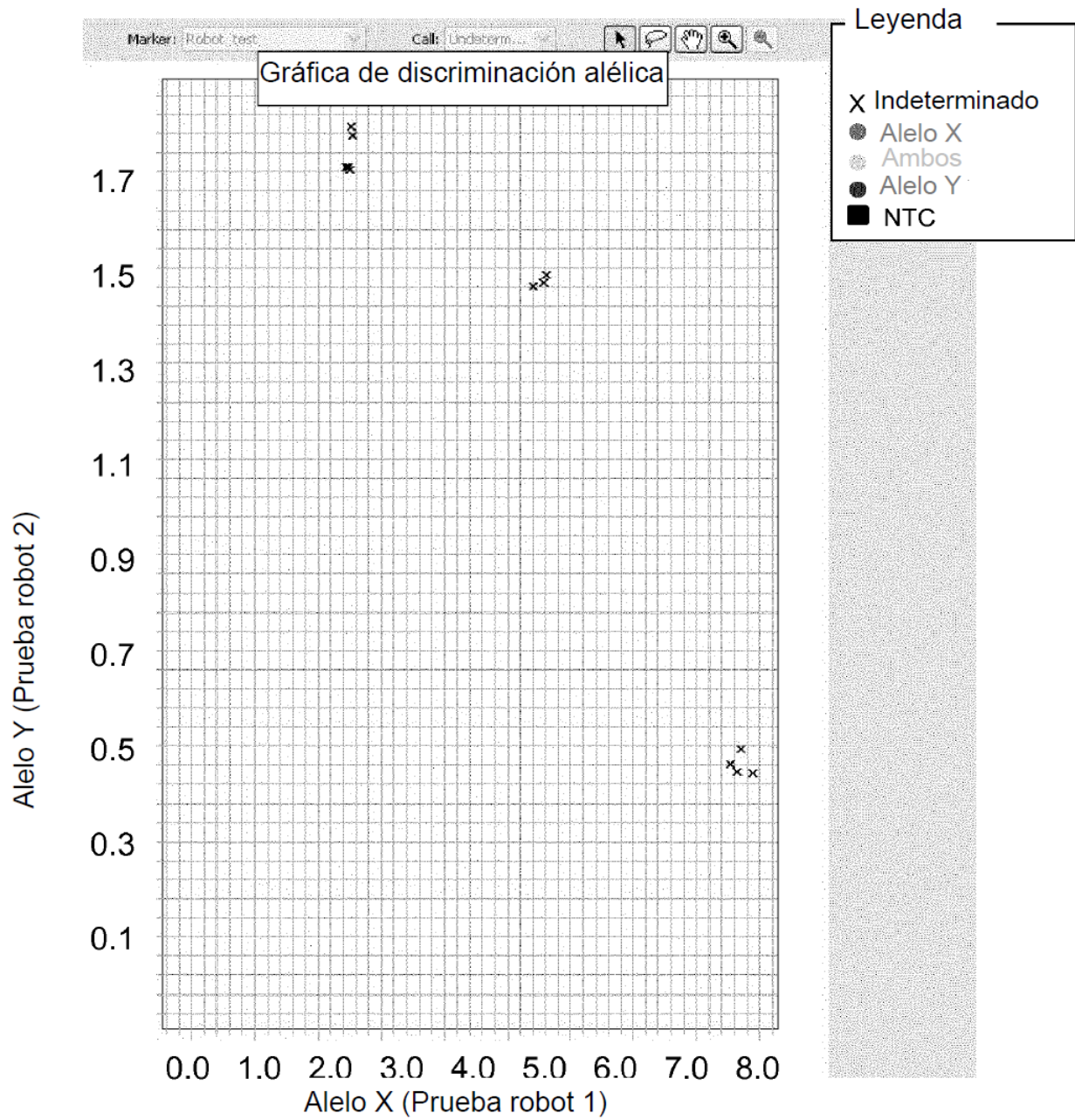


Figura 13

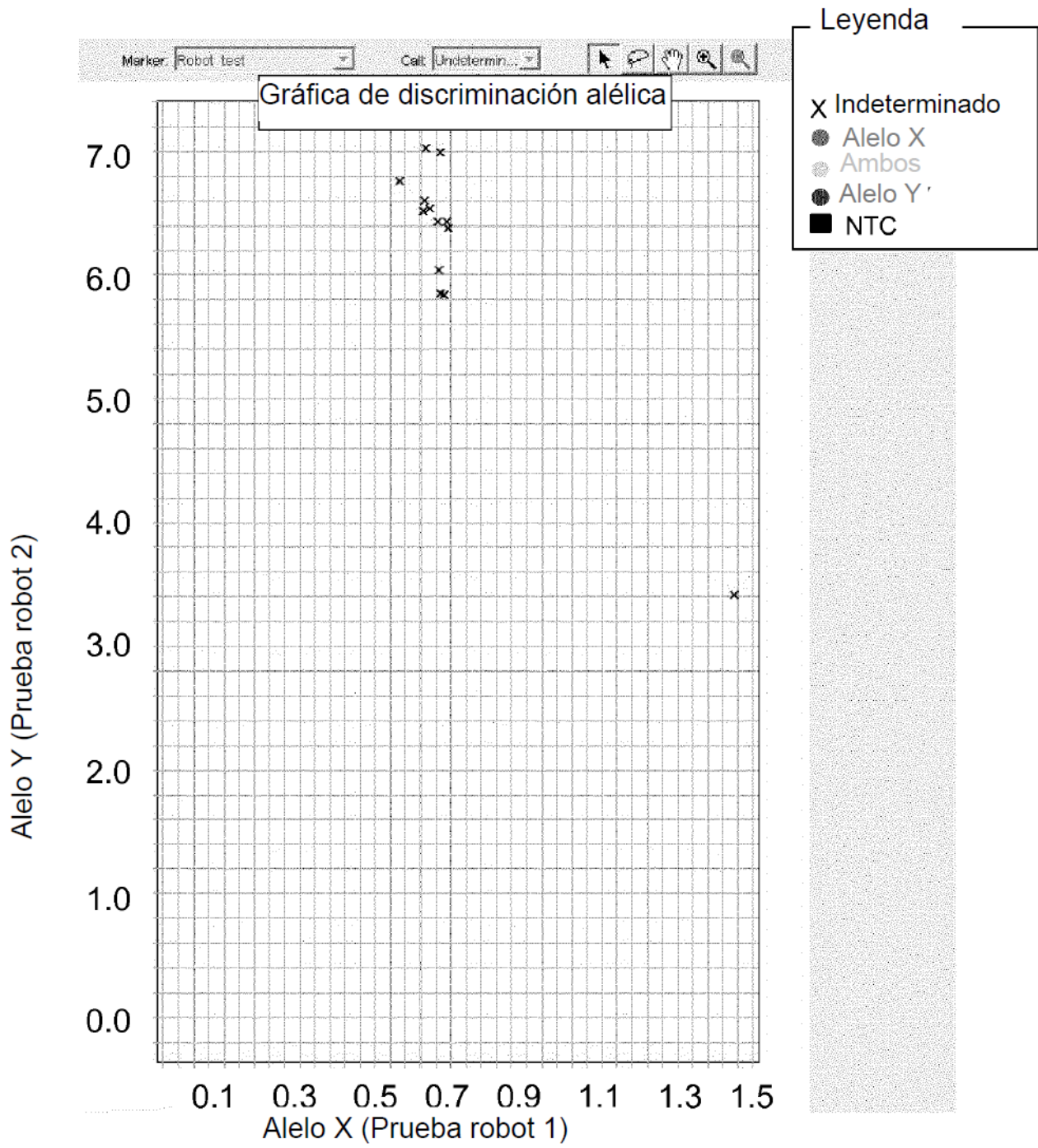


Figura 14

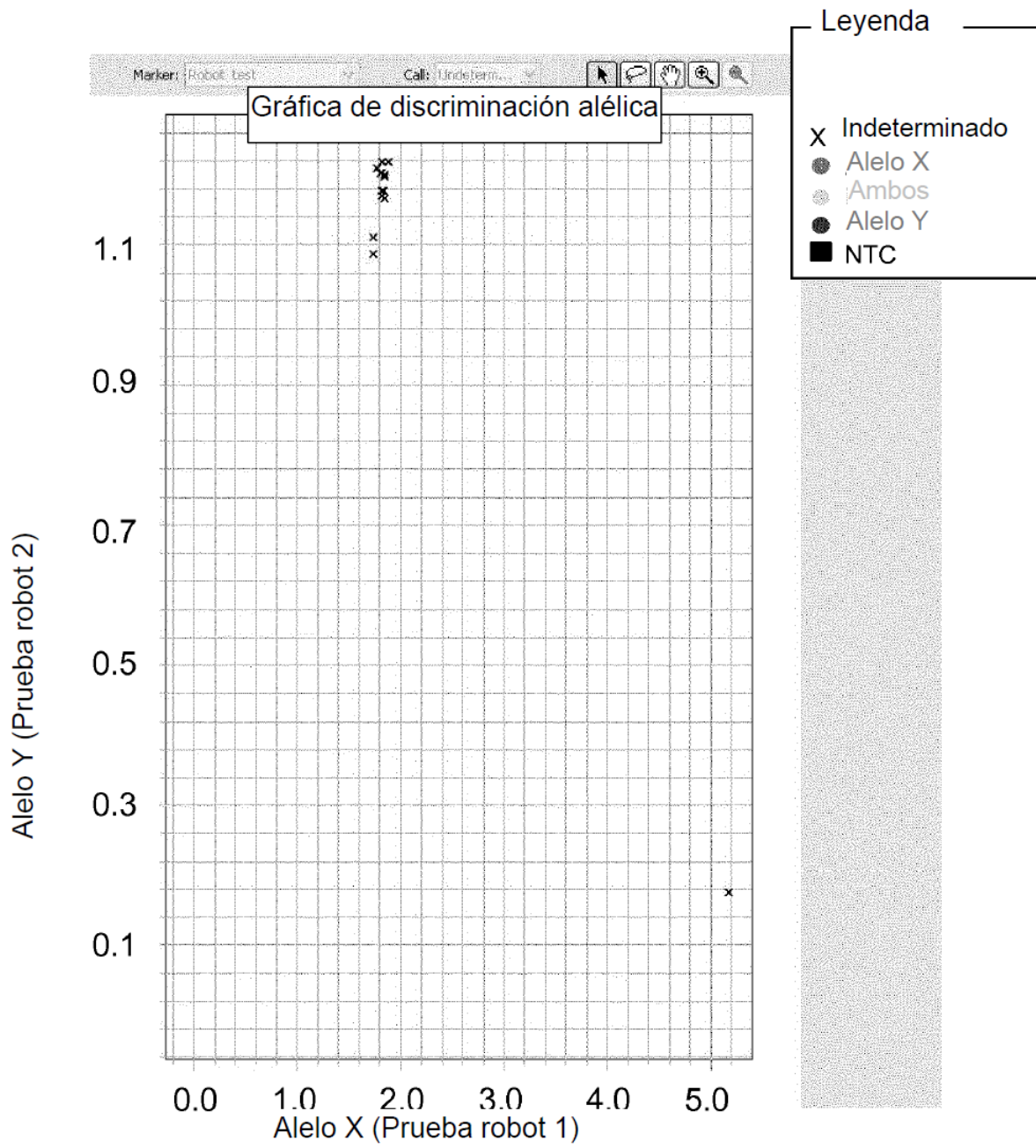


Figura 15



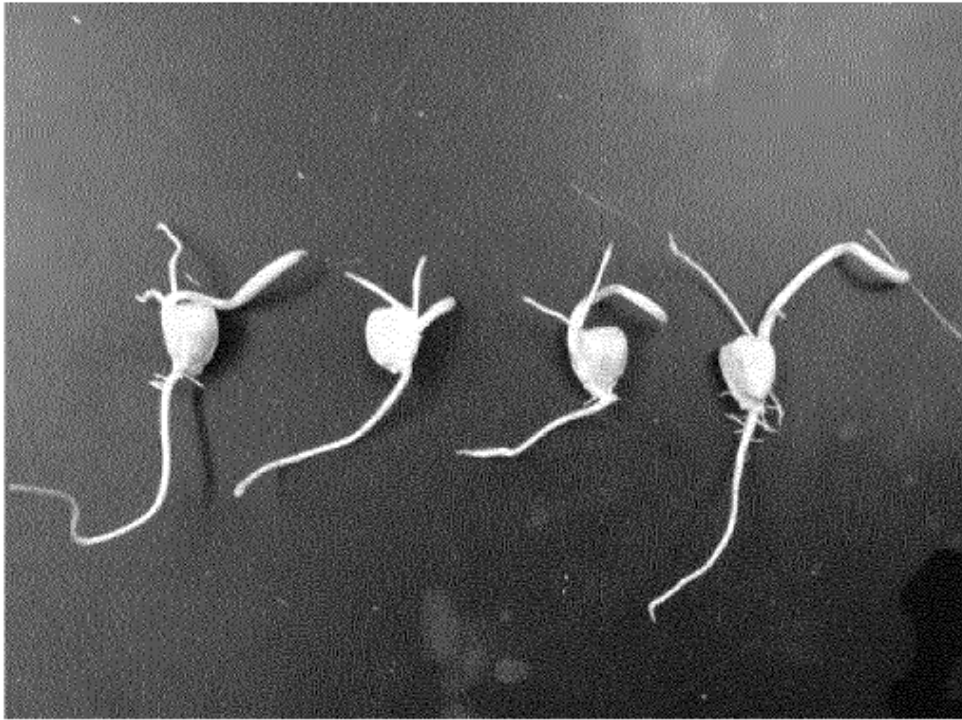


Figura 16A

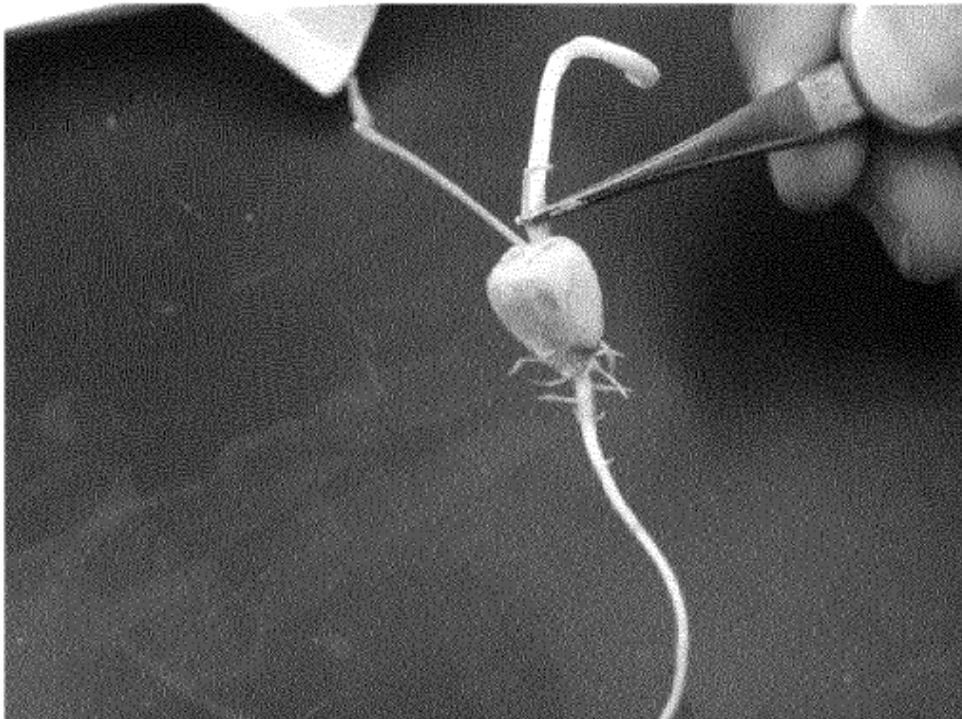


Figura 16B