

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar un organismo de una especie predefinida que porta una o más mutación(es) predeterminada(s) en nucleótido(s) de interés [NOI(s)], en una secuencia diana, comprendiendo dicho método las etapas de:
 - a) Proveer un conjunto de organismos de dichas especies, o partes reproductivas de los mismos, que representan una pluralidad de genotipos;
 - b) Dividir dicho conjunto en uno o más subconjuntos de organismos, o partes reproductivas de los mismos;
 - c) Preparar muestras de ADN_g, comprendiendo cada una ADN genómico (ADN_g), de cada genotipo dentro de un subconjunto, manteniendo al mismo tiempo el potencial de multiplicación de organismos de cada genotipo dentro de dicho subconjunto;
 - d) Llevar a cabo una pluralidad de amplificaciones por PCR, comprendiendo cada una la muestra de ADN_g de un subconjunto, en donde cada amplificación por PCR comprende una pluralidad de amplificaciones por PCR compartimentadas, comprendiendo cada una, una parte de dicha muestra de ADN_g, uno o más conjunto(s) de cebadores, flanqueando cada conjunto una secuencia diana y reactivos para PCR, amplificando de este modo la(s) secuencia(s) diana;
 - e) Detectar producto(s) de amplificación por PCR que comprende(n) una o más secuencia(s) diana que comprende(n) la(s) mutación(es) en el(los) NOI(s), identificando de este modo subconjunto(s) que comprenden dicha mutación;
 - f) Dividir los organismos, o partes reproductivas de los mismos, de dicho subconjunto identificado en subconjuntos secundarios;
 - g) Preparar muestras de ADN_g, comprendiendo cada una ADN_g, a partir de cada genotipo dentro de un subconjunto secundario, manteniendo al mismo tiempo el potencial para multiplicación de organismos de cada genotipo dentro de dicho subconjunto secundario;
 - h) Llevar a cabo una pluralidad de amplificaciones por PCR, comprendiendo cada una la muestra de ADN_g de un subconjunto secundario, uno o más conjunto(s) de cebadores flanqueando cada uno una secuencia diana y reactivos para PCR, amplificando de este modo la(s) secuencia(s) diana;
 - i) Detectar productos de amplificación por PCR que comprenden una o más secuencia(s) diana que comprende(n) la(s) mutación(es) predeterminada(s) en el(los) NOI(s), identificando de este modo subconjuntos secundarios bajo la etapa h) que comprenden dicha mutación;
 - j) Identificar un organismo, o parte reproductiva del mismo, dentro de dicho subconjunto secundario que lleva dicha(s) mutación(es).

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la(s) amplificación(es) por PCR de la etapa d) es(son) llevadas a cabo mediante un método que comprende las siguientes etapas:
 - Preparar una o más amplificaciones por PCR que comprenden una muestra de ADN_g, uno o más conjunto(s) de cebadores flanqueando cada uno una secuencia diana y reactivos para PCR;
 - Particionar dicha(s) amplificación(es) por PCR en una pluralidad de compartimentos espacialmente separados;
 - Llevar a cabo amplificación(es) por PCR;
 - Detectar productos de amplificación por PCR.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dichos compartimentos espacialmente separados son gotas, tales como gotas de emulsión agua-aceite.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde cada gota tiene un volumen promedio en el rango de 0,1 a 10 nL.
5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde cada PCR está compartimentada en el rango de 1000 a 100.000 compartimentos espacialmente separados.
6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde los reactivos para PCR comprenden una o más sondas para detección de mutaciones, en donde cada sonda para detección de mutaciones comprende un oligonucleótido opcionalmente ligado a medios detectables, en donde el oligonucleótido es idéntico, o complementario, a una secuencia diana, que incluye una mutación predeterminada del NOI.
7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde los reactivos para PCR comprenden una o más sonda(s) para detección de referencia, en donde cada sonda para detección de referencia comprende un oligonucleótido opcionalmente ligado a medios detectables, en donde el oligonucleótido es idéntico, o complementario, a una secuencia diana, que incluye un NOI de referencia.
8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 y 6, en donde la(s) sonda(s) para detección de mutantes es(están) unidas a un fluoróforo y a un secuestrante, y la sonda para detección de referencia está unida a un fluoróforo diferente y a un secuestrante.

9. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde los reactivos para PCR comprenden un exceso de al menos 2 veces de la(s) sonda(s) para detección de mutantes respecto de la(s) sonda(s) para detección de referencia.
10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho conjunto de organismos es preparado sometiendo a los organismos de dichas especies, o partes reproductivas de los mismos, a mutagénesis aleatoria.
11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el conjunto de organismos comprende al menos 10.000, preferiblemente al menos 100.000, aún más preferiblemente al menos 500.000 organismos, o partes reproductivas de los mismos, con diferentes genotipos.
12. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde los métodos comprenden una etapa de reproducción de los organismos, o partes reproductivas de los mismos, dentro del conjunto, y en donde dicha etapa de reproducción puede ser llevada a cabo simultáneamente con, o subsiguiente a, la etapa b) de división de los organismos en subconjuntos.
13. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la especie es una planta, y las etapas a) y b) de dicho método comprenden las etapas de:
 - Proveer una pluralidad de semillas de una planta;
 - Someter a dichas semillas a mutagénesis aleatoria, obteniendo de este modo semillas de generación M0;
 - Hacer crecer dichas semillas de generación M0 en forma de plantas maduras, y obtener semillas de dichas plantas maduras, en donde dichas semillas son semillas de generación M1;
 - Opcionalmente repetir las etapas previas X veces para obtener plantas que comprenden semillas de generación M(1+X);
 - Obtener semillas de generación M1 o M(1+X) a partir de dichas plantas maduras, obteniendo de este modo un conjunto de semillas;
 - Dividir dicho conjunto de las diversas etapas en subconjuntos, en donde todas las semillas a partir de una planta madura dada son colocadas en el mismo subconjunto.
14. El método de acuerdo con la reivindicación 13, en donde se proveen al menos 100.000, tal como al menos 500.000 semillas.

15. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde la especie es un organismo unicelular, y las etapas a) y b) de dicho método comprenden las etapas de:
- Proveer una pluralidad de organismos unicelulares;
 - Someter dichos organismos a mutagénesis aleatoria;
 - Dividir los organismos mutagenizados en subconjuntos;
 - Someter cada subconjunto a una etapa de reproducción.
16. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde uno o más subconjunto(s) que comprende(n) la mutación, estando cada uno dividido en al menos 10, preferiblemente al menos 90 subconjuntos secundarios.
17. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la especie es una especie unicelular, y la etapa f) comprende las siguientes etapas:
- Proveer un subconjunto que comprende la(s) mutación(es) en uno o varios NOI(s);
 - Reproducir algunos, o todos los organismos, de dicho subconjunto de una manera clonal para obtener cultivos clonales;
 - Combinar una fracción de organismos a partir de una pluralidad de dichos cultivos clonales para obtener subconjuntos secundarios.
18. El método de acuerdo con la reivindicación 17, en donde cada subconjunto secundario comprende fracciones en el rango de 10 a 100 cultivos clonales.
19. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde la especie es una planta, y las etapas f) y g) comprenden las siguientes etapas:
- Proveer un subconjunto que comprende una pluralidad de semillas de una planta, en donde dicho subconjunto comprende una o varias mutación(es) de los NOI(s);
 - Dividir las semillas de dicho subconjunto en subconjuntos secundarios, comprendiendo cada uno en el rango de 1 a 100 semillas;
 - Obtener una muestra de cada semilla del subconjunto secundario –de una manera que deje las semillas suficientemente intactas para desarrollarse en una planta– y combinar todas las muestras de todas las semillas de cada subconjunto secundario;
 - Preparar una muestra de ADN_g a partir de dichas muestras combinadas.

20. El método de acuerdo con la reivindicación 19, en donde dicha muestra es obtenida mediante perforación de un orificio en la semilla seguido de recolección de la harina obtenida.
21. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la amplificación por PCR de la etapa h) comprende una pluralidad de amplificaciones por PCR compartimentadas.
22. El método de acuerdo con la reivindicación 20, en donde la(s) amplificación(es) por PCR de la etapa h) es(son) como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5.
23. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la especie es una especie unicelular, y en donde la etapa j) de identificar el organismo comprende las etapas de:
- Proveer un subconjunto secundario que comprende la mutación en el NOI;
 - Reproducir algunos o todos los organismos de dicho subconjunto de una manera clonal;
 - Determinar qué clon(es) comprende(n) organismos que comprenden la mutación en el NOI.
24. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 y 19 a 22, en donde la especie es una planta, y en donde la etapa j) de identificación del organismo comprende las etapas de:
- Proveer un subconjunto secundario que comprende un organismo, o partes reproductivas del mismo, que comprende la mutación en el NOI;
 - Cultivar todas las semillas dentro de dicho subconjunto secundario para permitir la germinación, y opcionalmente desarrollar plantas de cada semilla;
 - Obtener una muestra de cada semilla germinada;
 - Ensayar dicha muestra en cuanto a la presencia de dicha mutación en el NOI, identificando de este modo una planta que porta la mutación en el NOI;
 - Opcionalmente hacer crecer dicha planta hasta la madurez.
25. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el método comprende además una etapa de identificación de un super-conjunto que comprende una o más mutación(es) en el(los) NOI(s), en donde el super-conjunto es un grupo de subconjuntos.

26. El método de acuerdo con la reivindicación 25, en donde el método comprende además las siguientes etapas llevadas a cabo después de la etapa c):
- Obtener una fracción de cada muestra de ADN_g a partir de cada subconjunto;
 - Combinar una pluralidad de fracciones en super-conjuntos, obteniendo de ese modo super-conjuntos de ADN_g que comprenden muestras de ADN_g a partir de una pluralidad de subconjuntos, en donde el ADN_g de cada subconjunto está solamente presente en un super-conjunto;
 - Llevar a cabo una pluralidad de amplificaciones por PCR, comprendiendo cada una un super-conjunto de muestras de ADN_g, en donde cada amplificación por PCR comprende una pluralidad de amplificaciones por PCR compartimentadas, cada una comprendiendo parte de dicha muestra de ADN_g, uno o más conjunto(s) de cebadores flanqueando cada uno una secuencia diana y reactivos para PCR, amplificando de este modo la(s) secuencia(s) diana;
 - Detectar producto(s) de amplificación por PCR que comprende(n) una o más secuencia(s) diana que comprende(n) la(s) mutación(es) en el(los) NOI(s), identificando de este modo super-conjunto(s) que comprende(n) dicha mutación.
27. El método de acuerdo con la reivindicación 26, en donde el método comprende además una etapa de enriquecimiento de los super-conjuntos de ADN_g llevada a cabo antes de llevar a cabo dicha PCR compartimentada.
28. El método de acuerdo con la reivindicación 27, en donde la etapa de enriquecimiento comprende llevar a cabo amplificaciones por PCR en un super-conjunto de ADN_g, en donde cada amplificación por PCR comprende un conjunto de cebadores que flanquean la secuencia diana, una sonda bloqueante y reactivos para PCR, en donde la sonda bloqueante está diseñada para inhibir la amplificación de la secuencia diana que comprende el NOI de referencia.
29. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 28, en donde la etapa d) de llevar a cabo amplificaciones por PCR es llevada a cabo solamente en muestras de ADN_g a partir de subconjunto(s) que comprende(n) una(s) de la(s) mutación(es).
30. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 29, en donde se preparan super-conjuntos en el rango de 5 a 100.

31. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 30, en donde la(s) amplificación(es) por PCR que comprende(n) un super-conjunto de muestras de ADN_g es(son) llevada(s) a cabo mediante un método que comprende las siguientes etapas:
- Preparar una amplificación por PCR que comprende la muestra de ADN_g, uno o más conjunto(s) de cebador(es) flanqueando cada uno una secuencia diana y reactivos para PCR;
 - Particionar dicha(s) amplificación(es) por PCR en una pluralidad de compartimentos espacialmente separados, en donde cada compartimento tiene un volumen promedio en el rango de 0,1 a 20 μ l;
 - Llevar a cabo una amplificación por PCR;
 - Detectar productos de amplificación por PCR.
32. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 31, en donde cada PCR es compartimentada en al menos 1.000.000 de compartimentos, tal como compartimentos espacialmente separados.
33. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 31 a 32, en donde dichos compartimentos espacialmente separados son gotas, tales como gotas de emulsión agua-aceite.
34. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, 15 a 18, 21 a 34, en donde la especie es un organismo unicelular, por ejemplo levadura.
35. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, 14, 17 a 20 y 23 a 28, en donde la especie es una planta, por ejemplo una planta de flor.
36. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, 16, 19 a 22 y 24 a 34, en donde la especie es un cereal, por ejemplo cebada.
37. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la mutación es una sustitución de un único nucleótido.
38. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el método es un método para identificar más de una mutación predeterminada.
39. El método de acuerdo con la reivindicación 38, en donde los reactivos para PCR comprenden una sonda para detección de mutantes específica para cada mutación predeterminada.

40. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 37, en donde el método es un método de identificación de una mutación predeterminada en una secuencia diana, y el método emplea solamente un conjunto de cebadores que flanquean dicha secuencia diana.
41. El método de acuerdo con la reivindicación 40, en donde los reactivos para PCR comprenden solamente una sonda para detección de mutación.