

MÉTODO PARA DETECTAR UN MUTANTE DENTRO DE UNA POBLACIÓN DE ORGANISMOS APLICANDO EL ENFOQUE DE AGRUPACIÓN Y DIVISIÓN

ÁREA DE LA INVENCION

- 5 La presente invención provee métodos y procesos altamente acelerados que hacen prácticamente posible expandir y abordar la preparación, selección y/o propagación de un organismo con mutación(es) predeterminada(s) en uno o más nucleótidos de interés (NOI, por sus siglas en inglés). Los métodos de la invención son, por ejemplo, útiles para avanzar en el ritmo y capacidad de preparación de plantas con
- 10 mutación(es) predeterminada(s), específica(s) en uno o más NOI(s).

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- Los métodos genéticos para generar organismos genéticamente modificados (GMO y GM, por sus siglas en inglés) están ampliamente disponibles. Sin embargo, para
- 15 muchos propósitos, particularmente en las industrias de alimentación y bebida, el uso de GMOs es a menudo menos deseable. Así, existe una necesidad persistente de proveer métodos mejorados y más precisos para el mejoramiento tradicional de cultivos, incluyendo cereales tales como la cebada, simplemente para obtener materiales de partida a medida, mejores, para aplicación en el desarrollo y fabricación
- 20 de nuevos productos. Inconvenientes similares existen en relación con otros organismos, incluyendo microorganismos y animales. Desafortunadamente, ha habido una inconveniente carencia de métodos en los abordajes de mejoramiento tradicional para encarar el hallazgo de mutaciones en nucleótidos predefinidos de los genomas, limitando así el progreso del desarrollo de materias primas.
- 25 Están disponibles métodos para permitir la edición del genoma e introducción de cortes de ADN de doble hebra en sitios diana en el genoma de un organismo, por ej. la tecnología CRISPR-Cas9 (Jiang et al., 2016). Dos distintas complicaciones principales permanecen asociadas con la tecnología CRISPR-Cas9:
- En primer lugar, la tecnología CRISPR-Cas9 puede ser considerada como basada
 - 30 en GM. Así, falta información legislativa básica sobre cómo las autoridades apuntan a regular las nuevas herramientas en la edición del genoma, incluyendo introducción de cortes en ADN de doble hebra en sitios diana en el genoma.
 - En segundo lugar, existen complicaciones importantes relacionadas con escisiones fuera de la diana con la tecnología CRISPR-Cas9.

Las mutaciones de la línea germinal en un contexto natural, por ej. aquellas que conducen a consecuencias fenotípicas en organismos, representan tanto la causa principal de variación de rasgos o características heredables como la última fuente de cambio evolucionario en virtud de efectos ventajosos y disruptivos a nivel molecular.

5 Las mutaciones surgen en respuesta a una cantidad de factores, incluyendo:

- Errores de replicación;
- Daño en el ADN, ya sea reparado incorrectamente o dejado sin reparación;
- Daño en el ADN causado por factores exógenos –tales como agentes químicos, luz ultravioleta y radiación ionizante;

- 10
- Factores endógenos, por ej. especies de oxígeno reactivo, aldehídos o errores mitóticos;
 - Enzimas involucradas en la reparación de ADN o edición del genoma;
 - Virus y retrotransposones endógenos que insertan fragmentos de ADN.

15 Además, el entendimiento actual es que la exposición a un mutágeno puede inducir numerosas mutaciones somáticas de genes, la mayoría de las cuales sin ventajas selectivas notorias, pero algunas pueden alterar funciones celulares clave. Adicionalmente, es probable que algunas propiedades relacionadas al genoma no sean mutacionales, por ejemplo cambios y alteraciones epigenéticos en el microentorno celular.

20 El mejoramiento tradicional de cultivos ha involucrado mutagénesis aleatoria seguida por relevamiento de un rasgo o característica deseados. Desafortunadamente, hay una carencia de métodos de relevamiento eficientes para identificar cambios genéticos predeterminados, es decir sustituciones nucleotídicas específicas en genes o elementos regulatorios de organismos mutagenizados, por ej. cereales, sin empleo de

25 métodos de base GM. Ciertamente, las plantas GM han experimentado una ventaja competitiva de más de 10 años de duración en relación con enfoques directos para el desarrollo *per se* de rasgos o características y adopción por parte de la más amplia comunidad científica. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, los métodos de base GM pueden ser menos preferibles.

30 Los resultados de la tecnología de secuenciación del genoma desarrollada recientemente revolucionaron el entendimiento de la arquitectura genética de los rasgos o características (y cambios correspondientes en respuesta a la mutagénesis).

Existe, por ejemplo, una expectativa extendida de que el secuenciación completo del genoma y novedosos métodos computarizados, asistidos por grandes esfuerzos de secuenciación de ADNg de alto rendimiento, ayudará a responder varias cuestiones biológicas básicas y acelerará la caracterización de mutantes, por ej. utilizando la planta de cereal monocotiledónea cebada.

En eucariotas, parece que algunos procesos de mutación muestran considerable variación en la distribución genómica (Pleasance et al., 2010; Schuster-Böckler y Lehner, 2012). El número de mutaciones puntuales varía a lo largo del genoma y es típicamente mayor en regiones de secuencia de bajos niveles de expresión genética, cromatina reprimida y tiempos de replicación tardíos. Algunas de estas variaciones pueden ser impulsadas por acceso reducido de la maquinaria de reparación de apareamiento erróneo de las regiones de cromatina cerradas.

Dada la información del arte previo provista arriba, aquellos expertos en el arte de la investigación en cereales conocerán que los avances analíticos han colocado a la investigación en cebada y cereales en los umbrales de nuevas fronteras, específicamente en la interfase I+D entre el entendimiento profundo basado en biología molecular y la aplicación industrial de plantas con nuevas características. Habiendo dicho esto, a pesar de los avances en las tecnologías de secuenciación del genoma para identificación de mutantes, tales métodos aún continúan insumiendo tiempo y desafíos logísticos, y permanecen poco útiles para la identificación de mutaciones predeterminadas específicas.

Dos propiedades adicionales son de interés, no sólo con respecto a la identificación de plantas con determinadas mutaciones, sino también para aprovechar mejoras:

- Delimitación del grado de tasas de mutación en línea germinal y somática en cereales.
- Los enfoques actuales apuntan a la reducción de la búsqueda de mutantes a fragmentos de ADNg basada en el análisis de secuencias de ADNg independiente de contexto [por ej. la metodología Tilling, la cual está restringida a la selección de a lo sumo 5000 a 10000 mutantes, y diferencias en punto de fusión entre los fragmentos de ADNg derivados de mutantes y de tipo salvaje (Botticella et al., 2011)].

Hasta ahora, se consideraba no realista el hallazgo de mutaciones predeterminadas y complejas utilizando métodos no-GM. También siguiendo esta línea, no había pistas

sobre en qué tamaños de muestra se debía trabajar para identificar robustamente sustituciones nucleotídicas específicas de interés. Esto ahora es posible siguiendo las guías provistas en la presente descripción.

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención describe métodos para hallar organismos individuales, tradicionalmente desarrollados, que tienen mutación(es) predeterminada(s) en nucleótidos de interés en una o más secuencia(s) diana. Dichas mutaciones pueden ser mutaciones en genes que confieren rasgos o características útiles específicos.

10 En particular, en base a novedosos y sorprendentes conocimientos de las estructuras mutacionales, la invención provee un nuevo método para todo el genoma, destacable aunque relativamente simple, para aplicación en el hallazgo de mutantes. La invención provee métodos para identificar organismos con una mutación predeterminada en uno o más NOI(s). La mutación predeterminada puede ser
15 cualquier mutación deseada. Así, la invención provee métodos no-GM, los cuales permiten la identificación de organismos con mutaciones particulares. Esto es posible a causa de la explotación inventiva de las técnicas de PCR, particularmente PCR digital. De manera acorde, la invención describe un novedoso enfoque que encara el contexto de ADN mutacional a relevar, combinado con un sistema logísticamente
20 inventivo que permite el análisis de colecciones gigantes de organismos mutados.

También se describen acciones de procesamiento minimizado y tiempo reducido para alcanzar la desafiante tarea de encontrar mutaciones raras, es decir aquellas que se espera sean localizadas en las regiones de cromatina cerradas antes mencionadas de los núcleos de cereales, incluyendo aquellos de cebada. El acceso a secuencias
25 genómicas completas puede ser utilizado para el diseño de cebadores y/o sondas para los métodos. Así, la secuencia genómica completa de cebada (ensamble genómico de cebada en Ensembl Plants, versión 082214v1) puede ser utilizada para el diseño de cebadores y sondas para genes específicos, es muy útil para aumentar la tasa de hallazgo de una planta con una mutación predeterminada.

30 En una forma de realización, la presente invención provee métodos para buscar –mediante mejoramiento tradicional o convencional- mutaciones predeterminadas que son, por ejemplo, mutaciones que dan por resultado una sustitución nucleotídica en un gen, o genes, relacionados con un rasgo o característica del cereal. Con los métodos

descriptos se presentan vías para asistir en la dilucidación de los mecanismos subyacentes relacionados con mutagénesis endógena e inducida.

La invención está definida en las reivindicaciones anexas.

La invención provee métodos para identificar un organismo de una especie predefinida que porta una o más mutación(es) predeterminada(s) en NOI(s) de una secuencia diana, comprendiendo dicho método las etapas de:

- a) Proveer un conjunto (pool) 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 ADNg, comprendiendo cada una ADNg 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 ADNg de un subconjunto, en donde cada amplificación por PCR comprende una pluralidad de amplificaciones por PCR compartimentadas cada una comprendiendo parte de dicha muestra de ADNg, un conjunto de cebadores que flanquean la secuencia diana y reactivos para PCR, amplificando de este modo la secuencia diana;
- e) Detectar producto(s) de amplificación por PCR que comprenden una o más secuencias diana que comprenden la(s) mutación(es) en el(los) NOI(s) de interés, identificando de este modo subconjunto(s) que comprende(n) dicha mutación;
- f) Dividir los organismos, o partes reproductivas de los mismos, de dicho subconjunto identificado en subconjuntos secundarios;
- g) Preparar muestras de ADNg, comprendiendo cada una ADNg 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 ADNg de un subconjunto secundario, un conjunto de cebadores que flanquean la secuencia diana y reactivos para PCR, amplificando de este modo la secuencia diana.
- i) Detectar productos de amplificación por PCR que comprenden una secuencia diana que comprende 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(s) reproductiva(s) del mismo, dentro de dicho subconjunto secundario que porta(n) dicha(s) mutación(es).

5 La invención también provee organismos identificados por los métodos de la invención. Por ejemplo, la invención provee una planta de cebada que porta una mutación en el gen HvGS1-3 que codifica la glutamina sintasa, en donde dicho gen mutado codifica proteína HvGS1-3 mutada con actividad reducida.

10 La invención es ilustrada adicionalmente en la presente en 5 corrientes de trabajo (WSs, por sus siglas en inglés), las cuales en un modo secuencial permiten la identificación de una mutación nucleotídica predeterminada, específica, en una colección de granos mutantes de cereales: los detalles de WS1 describen procedimientos para establecer colecciones de plantas de cereales inducidas tradicionalmente; los detalles de WS2 detallan cómo estructurar muestras de granos
15 complejas; WS3 resalta como identificar aquellas muestras de granos que comprenden mutantes; los datos analíticos relacionados con WS4 describen cómo hallar granos de cereales mutados, individuales, y; WS5 se focaliza en cómo el uso combinado de dos diferentes instrumentos de PCR digital facilitan la selección de números ultra-altos de muestras de ADN_g derivadas de granos de cereales.

20

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **Figura 1** ilustra un ejemplo del concepto experimental global de la presente solicitud.

25 La **Figura 2** ilustra un ejemplo del concepto experimental global de la presente solicitud, utilizando la especie vegetal cebada como un ejemplo. **A** se relaciona con la propagación de granos de cebada mutados (WS1 como se explica en la descripción detallada de la invención); **B** muestra aspectos de la producción de una biblioteca ordenada de granos mutados (WS2 como se explica en la descripción detallada de la invención); **C** provee un resumen de cómo determinar si una fracción de granos
30 contiene granos individuales de interés (WS3 como se explica en la descripción detallada de la invención); **D** se focaliza en cómo identificar, en muestras con mezclas de granos, un grano con una mutación específica (WS4 como se explica en la descripción detallada de la invención); **E** provee una ilustración del proceso de trabajo

involucrado en la detección de ADN mutado en muestras de ADNg combinado (WS5 como se explica en la descripción detallada de la invención).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

5

Definiciones

El término “alelo” se refiere a una versión o estado específicos de un gen. La expresión “alelo mutante” como se usa en la presente se refiere a un gen que porta una o más mutación(es) predeterminada(s) en el(los) NOI(s). Cuando una mutación es una delección de un gen entero, el alelo mutante puede también ser un alelo que carece de dicho gen.

El término “aproximadamente” como se utiliza en la presente en relación con números se refiere a $\pm 10\%$, preferiblemente $\pm 5\%$, por ejemplo $\pm 1\%$.

La expresión “sonda bloqueante” como se utiliza en la presente se refiere a un oligonucleótido, que no puede ser extendido en el extremo 3' mediante una ADN polimerasa. La sonda bloqueante en general será un oligonucleótido, el cual es idéntico o complementario a la secuencia diana, incluyendo el NOI de referencia unido a un agente bloqueante, el cual inhibe la extensión de la sonda bloqueante mediante una ADN polimerasa.

El término “genotipo” como se utiliza en la presente se refiere a un organismo que comprende un conjunto específico de genes. Así, dos organismos que comprenden genomas idénticos son del mismo genotipo. Un genotipo de un organismo en relación con un gen particular está determinado por los alelos portados por dicho organismo. En organismos diploides el genotipo para un gen dado puede ser AA (homocigota, dominante) o Aa (heterocigota) o aa (homocigota, recesivo).

La expresión “sonda para detección de mutantes” como se utiliza en la presente se refiere a un oligonucleótido opcionalmente unido a medios detectables, en donde el oligonucleótido es idéntico, o complementario, a la secuencia diana, incluyendo la mutación predeterminada del NOI.

El término “PCR” como se utiliza en la presente se refiere a una reacción en cadena de polimerasa. Una PCR es una reacción para amplificación de ácidos nucleicos. El método se basa en ciclismo térmico, y consiste en ciclos repetidos de calentamiento y enfriamiento de la reacción para obtener fusión y replicación enzimática secuenciales

de dicho ADN. En la primera etapa, las dos hebras que forman la doble hélice de ADN son físicamente separadas a una elevada temperatura en un proceso también conocido como fusión del ADN. En la segunda etapa, la temperatura es disminuida permitiendo la replicación enzimática del ADN. La PCR puede también involucrar incubación a temperatura adicional con el objeto de aumentar el apareamiento de los cebadores y/u optimizar la(s) temperatura(s) para replicación. En una PCR, la temperatura generalmente transcurre en ciclos entre las varias temperaturas durante una cantidad de ciclos.

La expresión “reactivos para PCR” como se utiliza en la presente se refiere a reactivos, los cuales son agregados a una PCR además de una muestra y un conjunto de cebadores. Los reactivos para PCR comprenden al menos nucleótidos y una polimerasa de ácido nucleico. Además, los reactivos para PCR pueden comprender otros compuestos tales como sal(es) y buffer(s).

El término “ddPCR” se refiere a la reacción en cadena de polimerasa digital en gotas. En la ddPCR, se llevan a cabo una o más amplificaciones por PCR, en donde cada reacción es separada en una pluralidad de gotas de emulsión agua-aceite, de modo que la amplificación por PCR de la secuencia diana puede ocurrir en cada gota individual.

El término “reproducción” como se utiliza en la presente se refiere tanto a reproducción sexual como asexual. Así, la reproducción puede ser la multiplicación de un organismo de una manera clonal (también conocida como “reproducción asexual”). La reproducción también puede ser la generación de progenie de un organismo, donde la progenie comprende alelo(s) del organismo parental. Así, la reproducción de un organismo que comprende un alelo mutante puede referirse a la generación de progenie de dicho organismo, en donde la progenie comprende al alelo mutante. Preferiblemente, el alelo mutante porta una o más de la(s) mutación(es) en el(los) NOI(s).

La expresión “partes reproductivas de un organismo” como se utiliza en la presente se refiere a cualquier parte de un organismo que bajo las condiciones adecuadas puede crecer en forma de un organismo completo. A modo de ejemplo, en formas de realización de la invención en donde la especie es una planta, la parte reproductiva de dicho organismo puede, por ejemplo, ser una semilla, un grano o un embrión de dicha planta. En formas de realización de la invención, en donde la especie es un

organismo unicelular, entonces las partes reproductivas es el organismo entero, es decir una célula.

La expresión “conjunto de cebadores que flanquean una secuencia diana” como se utiliza en la presente se refiere a un conjunto de dos cebadores que flanquean una
5 secuencia diana, de modo que un cebador comprende una secuencia idéntica al extremo 5’ de la secuencia diana (también referida como “cebadores directos”) y un cebador que comprende una secuencia complementaria del extremo 3’ de la secuencia diana (también referido como “cebador inverso”). El “conjunto de
10 cebadores” es capaz de amplificar la secuencia diana cuando es agregado a una PCR junto con un ácido nucleico que comprende la secuencia diana y los reactivos para PCR bajo condiciones que permiten la amplificación de dicha secuencia diana.

La expresión “secuencia diana” como se utiliza en la presente se refiere a cualquier secuencia de ácido nucleico dentro de la cual es deseable generar o identificar una mutación. Más aún la secuencia diana es preferiblemente una secuencia de ácido
15 nucleico, la cual puede ser amplificada mediante tecnología PCR utilizando cebadores que flanquean la secuencia diana. Adicionalmente, la secuencia diana comprende generalmente uno o más NOI(s). La invención provee métodos para producir y/o identificar organismo(s) que porta(n) una mutación en dicho NOI. La secuencia diana puede, por ejemplo, ser una secuencia de ácido nucleico asociada con un rasgo o
20 característica específico.

La expresión “sonda para detección de referencia” como se utiliza en la presente se refiere a un oligonucleótido opcionalmente ligado a medios detectables, en donde el oligonucleótido es idéntico o complementario a la secuencia diana, incluyendo el NOI de referencia. En general, la secuencia diana, que incluye el NOI de referencia,
25 corresponde a la secuencia diana antes de la mutagénesis. La “sonda para detección de referencia” puede ser también referida como “sonda de tipo salvaje”.

La expresión “Corriente de trabajo” (WS por sus siglas en inglés) como se utiliza en la presente se refiere a una serie de una o más etapas de un método.

30 **Método de identificación de un organismo**

La presente invención se refiere a métodos para identificar un organismo de una especie predefinida –por ejemplo cualquiera de las especies descritas en la presente, a continuación, en la sección “Especies”, portando una mutación en un NOI en una

secuencia diana [por ejemplo cualesquiera de las mutaciones descritas en la presente a continuación en la sección “Nucleótidos(s) de interés”]– y dichos métodos que comprenden las etapas de:

- 5 a. Proveer un conjunto de organismos de especies predefinidas especificadas, o partes reproductivas de los mismos, que representan una pluralidad de genotipos, por ejemplo, cualquiera de los conjuntos descritos en la presente a continuación en las secciones “Conjunto de organismos”;
- 10 b. Dividir dicho conjunto en uno o más subconjuntos de organismos o partes reproductivas de los mismos, por ejemplo como se describe en la presente a continuación en la sección “División de conjuntos en subconjuntos”;
- 15 c. Preparar muestras de ADNg, cada una comprendiendo ADNg de cada genotipo dentro de un subconjunto, al tiempo que se mantiene el potencial para la multiplicación de organismos de cada genotipo dentro de dicho subconjunto, lo cual –por ejemplo– puede ser llevado a cabo como se describe en la presente a continuación en la sección “Preparación de muestras de ADN”;
- 20 d. Llevar a cabo una pluralidad de amplificaciones por PCR, cada una comprendiendo una muestra de ADNg a partir de un subconjunto, en donde cada amplificación por PCR comprende una pluralidad de amplificaciones por PCR compartimentadas tal que cada una comprende parte de dicha muestra de ADNg, un conjunto de cebadores que flanquean la secuencia diana y reactivos para PCR, amplificando de este modo la secuencia diana, lo cual –por ejemplo– puede ser hecho como se describe en la presente a continuación en la sección “Amplificación por PCR que comprende una pluralidad de amplificaciones por PCR compartimentadas”;
- 25 e. Detectar producto(s) de amplificación por PCR que comprende(n) una secuencia diana que comprende la(s) mutación(es) en lo(s) NOI(s), identificando de este modo subconjunto(s) que comprende(n) dicha mutación, lo cual –por ejemplo– puede ser llevado a cabo como se describe en la presente a continuación en la sección “Detección de producto(s) de amplificación por PCR”;
- 30 f. Dividir los organismos, o partes reproductivas de los mismos, de dichos subconjuntos identificados en subconjuntos secundarios, por ejemplo como se describe en la presente a continuación en la sección “División de subconjuntos en subconjuntos secundarios”;
- 35 g. Preparar muestras de ADNg comprendiendo cada una ADN genómico de cada genotipo dentro de un subconjunto secundario, al tiempo que se mantiene el

potencial para la multiplicación de los organismos de cada genotipo dentro de dicho subconjunto secundario, lo cual, por ejemplo, puede ser llevado a cabo como se describe en la sección “Preparación de muestra de ADN”;

- 5 h. Llevar a cabo una pluralidad de amplificaciones por PCR, cada una comprendiendo una muestra de ADN_g a partir de un subconjunto secundario, un conjunto de cebadores que flanquean la secuencia diana y reactivos para PCR, amplificando de este modo la secuencia diana, lo cual, por ejemplo, puede ser llevado a cabo como se describe en la sección “Identificación de subconjuntos secundarios”;
- 10 i. Detectar amplificación(es) por PCR que comprende(n) una secuencia diana que comprende la(s) mutación(es) en lo(s) NOI(s), identificando de este modo subconjuntos secundarios que comprenden dicha mutación, lo cual, por ejemplo puede ser llevado a cabo como se describe en la sección “Identificación de subconjuntos secundarios”;
- 15 j. Identificar un organismo dentro de dicho subconjunto secundario que porta dicha mutación, lo cual, por ejemplo, puede ser llevado a cabo como se describe en la sección “Identificación de organismo”.

La Etapa a. puede comprender por ejemplo proveer un conjunto de organismos preparado como se describe en WS1 en la presente.

- 20 La Etapa b. puede por ejemplo ser llevada a cabo como se describe en WS2 en la presente.

Las Etapas c., d. y e. pueden por ejemplo ser llevadas a cabo como se describe en WS3 en la presente.

- 25 Las Etapas f., g., h., i. y j. pueden por ejemplo ser llevadas a cabo como se describe en WS4 en la presente.

- 30 Los reactivos para PCR, en general, comprenden al menos nucleótidos y una polimerasa de ácido nucleico. Adicionalmente, los reactivos para PCR pueden preferiblemente también comprender una o más sondas para detección, por ejemplo una sonda para detección de mutación y/o una sonda para detección de referencia como se describe anteriormente en la presente en la sección “Detección de producto(s) de PCR”.

En adición a las etapas bosquejadas anteriormente, los métodos de la invención pueden comprender una o más etapas adicionales. Los métodos pueden, por ejemplo, comprender una etapa de preparación de dicho conjunto de organismos, por ejemplo mediante mutagénesis. Los métodos para preparar el conjunto de organismos se describen en la presente a continuación en la sección “Conjunto de organismos”.

Los métodos también pueden comprender una etapa de reproducción de uno o más de dichos organismos, o parte(s) reproductiva(s) de lo(s) mismo(s). Dicha etapa de reproducción puede en el caso de organismos simples, por ejemplo organismos unicelulares que se reproducen asexualmente, comprender una o múltiples divisiones celulares. En el caso de organismos más complejos, por ejemplo organismos que se reproducen sexualmente, esta etapa puede incluir cultivar dichos organismos, o partes reproductivas de los mismos, a través de uno o más ciclos.

A continuación, se hace referencia solamente a “organismo”. Sin embargo, las mismas consideraciones aplican a métodos que utilizan partes reproductivas de organismos. Cada etapa de cultivo de un organismo puede dar por resultado progenie, la cual no es idéntica al organismo original. Por ejemplo, después de mutagénesis aleatoria de organismos poliploides, la mayor parte de los organismos portará cualquier mutación aleatoria solamente en un alelo, y así ser genéticamente heterocigota con respecto a esa mutación. Generalmente, los organismos de la progenie comprenden organismos sin la mutación, organismos progenie genéticamente heterocigota para la mutación y organismos progenie genéticamente homocigota para la mutación. En consecuencia, un conjunto de progenie de un conjunto original de organismos, o partes reproductivas de los mismos, no será idéntico al conjunto original, pero representará al menos cualquier mutación en el(los) NOI(s) presente(s) en el conjunto original –ya sea organismos heterocigota y/u homocigota. Por ejemplo, al menos alguno de dicha progenie comprenderá el alelo mutante. De manera similar, la progenie de un subconjunto, un super-conjunto o un subconjunto secundario puede no ser idéntico al subconjunto, super-conjunto o subconjunto secundario originales, pero representará al menos en general cualquier mutación en el(los) NOI(s) presente(s) en el subconjunto, super-conjunto o subconjunto secundario originales, ya sea en forma de heterocigotas u homocigotas.

La etapa b) de división del conjunto en uno o más subconjuntos puede así comprender una etapa de reproducción de organismos, o partes reproductivas de los mismos.

5 Esto puede, por ejemplo, ser llevado a cabo simultáneamente con la división del conjunto en subconjuntos. Alternativamente, esto puede ser hecho después de la división del conjunto en subconjuntos. En consecuencia, los métodos de la invención pueden a continuación de la etapa b) comprender una etapa de reproducción de los organismos, o partes reproductivas de los mismos, dentro de dichos subconjuntos.

10 De modo similar, los métodos de la invención pueden a continuación de la etapa f) comprender una etapa de reproducción de los organismos, o partes reproductivas de los mismos, dentro de dichos subconjuntos secundarios. Sin embargo, en algunas formas de realización de la invención, y en particular en formas de realización de la invención en donde la especie es una planta, tal como un cereal, entonces puede ser preferido que los métodos no comprendan una etapa de reproducción de los organismos, o partes reproductivas de los mismos, de los subconjuntos secundarios entre las etapas f) y g).

15 En algunas formas de realización de la invención, los métodos comprenden una etapa de reproducción de los organismos, o partes reproductivas de los mismos, contenidos en el subconjunto secundario que comprende la mutación en el NOI. Dicha etapa puede ser llevada a cabo en cualquier momento útil, por ejemplo entre las etapas i) y j) como se ha bosquejado anteriormente.

20 Los métodos pueden también comprender una etapa de identificación de un grupo de subconjuntos que comprenden la mutación en el NOI. Dicha etapa puede ser llevada a cabo en cualquier momento útil, pero es frecuentemente llevada a cabo después de la etapa c) de los métodos anteriores –y puede, por ejemplo, ser llevada a cabo como se describe en la sección “Super conjuntos” en la presente a continuación.

25 En una forma de realización, los métodos de la invención pueden resumirse en 4 a 5 corrientes de trabajo individual, por ejemplo WS1 a WS5, cada una dividida en un número de “Etapas” individuales como se describe a continuación. Mientras que los métodos que comprenden, o que incluso consisten en WS1 a WS5, representan formas de realización preferidas de la invención, la invención no está limitada a métodos que comprenden estas WSs. Por ejemplo, los métodos de la presente invención pueden comprender solamente WS2 a WS5, y carecer de WS1. Tal método
30 está, por ejemplo, ilustrado en la Figura 1. Un ejemplo de un método que comprende WS1 a WS5 está además ilustrado en la Figura 2, dividida en 5 partes, en las cuales:

- La Figura 2A se refiere a un ejemplo específico de WS1 en una forma de realización de la invención, en donde la especie es cebada. La figura ilustra la

propagación de granos de cebada mutada, como se detalla en WS1 en la presente.

- La Figura 2B muestra un ejemplo de aspectos de preparación de una biblioteca ordenada de granos mutados, como se detalla en WS2 en la presente (ver Ejemplo 1 y Ejemplo 2).
- La Figura 2C provee un ejemplo de un resumen de cómo determinar si una fracción del “Total de grano” contiene grano(s) caracterizado(s) por una mutación en el NOI, como se detalla en WS3 en la presente (ver Ejemplo 3 a Ejemplo 7).
- La figura 2D destaca un ejemplo de WS4, es decir procedimientos para determinar cuál(es) del(de los) granos(s) en una fracción del “Total de grano” -donde se muestra previamente que dicha fracción contiene granos que contienen la(s) mutación(es) en NOI(s), ver Figura 2C– alberga la mutación en el(los) NOI(s), como se detalla en la Etapa 4 en la presente (ver Ejemplo 8 a Ejemplo 15).
- La Figura 2E presenta un ejemplo de una visión general de procedimientos en WS5 en la cual se utiliza una tecnología PCR compartimentada (por ejemplo ddPCR) para determinar aquellos “Super conjuntos” de ADN_g, es decir alícuotas combinadas de muestras de ADN_g (Ejemplo 17), que comprenden la mutación que corresponde a aquélla en el NOI.

20 **Nucleótidos de interés (NOI)**

La invención se refiere a métodos para la identificación de uno o más organismo(s) que porta(n) mutación(es) en uno o más nucleótidos de interés. En particular, los métodos permiten la identificación de organismo(s) que porta(n) una o más mutaciones predeterminadas en el(los) NOI(s). De manera acorde, el método permite la identificación de un organismo que porta una mutación específica, aún basándose en los métodos no-GM.

La mutación puede ser cualquier mutación, en donde dicho uno o más NOIs de interés difieren del(de los) NOI(s) correspondiente(s) en una secuencia de referencia. Con frecuencia, la secuencia de referencia es una secuencia de tipo salvaje. Sin embargo, la secuencia de referencia puede ser también cualquier otra secuencia.

La mutación puede ser cualquier tipo de mutación, por ejemplo una delección, una inserción, una sustitución o una mezcla de las mencionadas anteriormente.

El(los) NOI(s) puede(n) ser un único nucleótido o varios nucleótidos, y por lo tanto el(los) NOI(s) puede(n) consistir en al menos uno, tal como 1, por ejemplo 2, tal como 3, por ejemplo 4, tal como 5, por ejemplo 6, tal como 7, por ejemplo 8, tal como 9, por ejemplo 10, tal como 10 a 20, por ejemplo desde 20 a 50, tal como más de 50 nucleótidos.

En formas de realización preferidas de la invención, el NOI consiste en un único nucleótido –en cuyo caso la mutación, por ejemplo, puede ser una sustitución de un único nucleótido. Tales mutaciones son también conocidas como mutaciones puntuales.

En otras formas de realización de la invención, la mutación puede ser una delección de dicho NOI. En otras formas de realización, la mutación puede ser una inserción de uno o más nucleótidos entre dos nucleótidos de interés.

En una forma de realización, la secuencia de referencia es una secuencia de tipo salvaje, es decir la secuencia más frecuentemente existente en la naturaleza, y la mutación es así una mutación comparada con dicha secuencia de tipo salvaje.

En una forma de realización, la mutación puede estar asociada con un rasgo deseable dentro de dicha especie. Dependiendo del tipo de especie, el rasgo deseado puede ser seleccionado de una multitud de diferentes rasgos. En formas de realización de la invención, en donde la especie es una planta domesticada, dicho rasgo podría, por ejemplo, tener viabilidad mejorada, resistencia mejorada a diversos factores ambientales, crecimiento mejorado o más alto rendimiento. En formas de realización de la invención, en donde la especie es una planta utilizada para producción de comida, producción de alimentos o bebida, el rasgo podría también relacionarse con valor nutricional aumentado, propiedades de sabor mejoradas, propiedades de almacenamiento mejoradas o aumentada utilidad para la producción de dicha comida, alimento o bebida.

El NOI puede ser ubicado en cualquier secuencia diana en cualquier ácido nucleico. Con frecuencia, la secuencia diana es parte de una secuencia de ADN_g. Más preferiblemente, la secuencia diana es parte de una secuencia de ADN_g. Así, la mutación puede ser una mutación del ADN_g de dicho organismo. El NOI puede estar posicionado en cualquier parte de un ADN_g, tanto en regiones codificantes como no codificantes. De manera frecuente el NOI puede estar posicionado en cualquier parte de un gen, por ejemplo dentro de una región codificante (por ejemplo dentro de un

exón), en un intrón o en regiones regulatorias de un gen, por ejemplo en promotores, terminadores y/o intrones.

Especie

5 Los métodos de la invención comprenden la identificación de un organismo de una especie predefinida. La especie puede ser cualquier especie, incluyendo organismos multicelulares y unicelulares. Por ejemplo, la especie puede ser una especie contenida en el Open Tree of Life, por ejemplo, la taxonomía de referencia de Open Tree of Life, versión 2.9 borrador 12 generado el 12 de octubre de 2015.

10 La especie puede ser procariota, tal como una bacteria. Ejemplos de bacterias incluyen aquellas utilizadas en la producción de alimentos, por ejemplo bacterias de un género seleccionado del grupo que consiste en *Acetobacter*, *Arthrobacter*, *Alactobacillus*, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Brachybacterium*, *Brevibacterium*, *Carnobacterium*, *Corynebacterium*; *enterococcus*, *Gluconacetobacter*, *Hafnia*, *Halomonas*, *Kocuria*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Macrococcus*,
15 *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Proteus*, *Pseudimonas*, *Psychrobacter*, *Staphylococcus*, *Streptomyces*, *Tetragenococcus*, *Weissella* y *Zymomonas*.

La especie puede ser también eucariota, por ejemplo seleccionada del grupo que consiste en hongos, algas, plantas y animales.

20 En una forma de realización, la especie está seleccionada del conjunto que consiste en hongos. Así, la especie puede ser un organismo unicelular o multicelular. Por ejemplo, la especie puede ser un hongo de un género seleccionado del grupo que consiste en *Aspergillus*, *Candida*, *Cystofilobasidium*, *Cyberlindnera*, *Debaryomyces*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Issatchenkia*, *Kazachstania*, *Kloeckera*, *Klyveromyces*, *Mucor*,
25 *Neurospora*, *Penicillium*, *Pichia*, *Rhizopus*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Torulaspora*, *Torulopsis*, *Thrichosporon*, *Verticillium*, *Yarrowia* y *Zygorhizopus*.

En particular, la especie puede ser levadura, tal como levadura seleccionada del grupo que consiste en *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pastorianus*,
30 *Saccharomyces bayanus* y *Saccharomyces uvarum*. Otras levaduras de interés incluyen especies de *Brettanomyces*, y lo similar.

En una forma de realización preferida de la invención, la especie es una planta. Dicha planta puede ser una planta verde, por ejemplo una planta seleccionada del grupo que

consiste en plantas de flores, coníferas, gimnospermas, helechos, licopodios (*Lycopodia spp*), hornabeques (hornworts, Anthocerotophyta), liverworts (hepáticas), musgos y algas verdes. La planta puede ser, por ejemplo, una monocotiledónea o dicotiledónea.

- 5 En particular, la planta puede ser una planta domesticada. Dicha planta domesticada pueden ser cualquier planta cultivada por los seres humanos, por ejemplo como una fuente de alimento, producto alimenticio o una materia prima para la producción de artículos o para propósitos estéticos.

- 10 En una forma de realización preferida de la invención, la especie es un cereal. Un "cereal", como se define en la presente, es un miembro de la familia de las plantas Graminae, cultivadas principalmente por sus semillas o granos que contienen almidón. Los cereales incluyen, pero no están limitados a, cebada (*Hordeum*), trigo (*Triticum*), arroz (*Oryza*), maíz (*Zea*), centeno (*Secale*), avena (*Avena*), sorgo (*Sorghum*) y un híbrido de trigo y centeno *Triticale*.

- 15 La planta también puede ser otras plantas domesticadas, incluyendo tomate.

Como se mencionó anteriormente, la especie también puede ser un animal, por ejemplo un animal domesticado, tal como un animal seleccionado del grupo que consiste en vaca, gallina, cerdo, oveja, cabra, camello, caballo, pavo, pato y conejo.

Conjunto de organismos

- 20 Los métodos de la invención comprenden proveer un conjunto de organismos de una especie dada que representa una pluralidad de genotipos. Dicha especie puede, por ejemplo, ser cualquiera de las especies descritas anteriormente en la presente en la sección "Especie".

- 25 De este modo, el conjunto de organismos comprende una pluralidad de organismos, los cuales todos pertenecen a la misma especie, pero que representan diferentes genotipos de dicha especie. El conjunto puede comprender más de un organismo de cada genotipo. Sin embargo, el conjunto debe comprender una pluralidad de organismos de diferentes genotipos. Preferiblemente el conjunto comprende al menos 100, más preferiblemente al menos 1000, aún más preferiblemente 5000, aún más
30 preferiblemente 10.000, aún más preferiblemente al menos 50.000, aún más preferiblemente al menos 100.000, por ejemplo al menos 500.000, tal como al menos 1.000.000 organismos, o partes reproductivas de los mismos, con diferentes genotipos.

Se prefiere que el conjunto de organismos comprenda un número suficiente de organismos, o partes reproductivas de los mismos, con diferentes genotipos, tal que el conjunto teóricamente puede comprender todas las mutaciones posibles en todos los genes de dicho organismo. Por ejemplo, en formas de realización de la invención, en donde la especie es cebada, se cree que un conjunto que comprende ~500.000 granos de cebada mutagenizados aleatoriamente comprenderá teóricamente todas las posibles mutaciones en todos los genes de dicha cebada (basado en la presunción de ~10.000 mutaciones de una única base en un grano mutagenizado con NaN_3 1 mM). Para mejorar la eficiencia de los métodos de la invención, el conjunto puede comprender tantos organismos como al menos 2x, tal como al menos 3x, o partes reproductivas de los mismos, con genotipos diferentes de los que se espera teóricamente que comprendan todas las mutaciones posibles. Así, el conjunto de organismos puede comprender al menos 500.000, tal como al menos 1.000.000, por ejemplo al menos 1.500.000, o partes reproductivas de los mismos, con diferentes genotipos. Este puede ser el caso, por ejemplo en formas de realización, en donde la especie en cuestión es cebada.

En algunas formas de realización, el conjunto puede comprender al menos 30.000 organismos, o partes reproductivas de los mismos, con diferentes genotipos, tal como en el rango de 30.000 a 500.000.

En algunas formas de realización, el conjunto de organismos puede comprender al menos 5.000.000, tal como en el rango de 1.000.000 a 100.000.000 organismos, o partes reproductivas de los mismos con genotipos diferentes. Este puede, por ejemplo, ser el caso en formas de realización de la invención, en donde el organismo es un organismo pequeño, por ejemplo un organismo unicelular.

En otras formas de realización, el conjunto puede comprender un rango de 100.000 a 500.000 organismos, o partes reproductivas de los mismos, con genotipos diferentes. Este puede, por ejemplo, ser el caso en formas de realización de la invención, en donde el organismo es un organismo unicelular.

Una ventaja de los métodos de la presente invención es que los métodos permiten un relevamiento de un gran número de organismos de diferentes genotipos. Por lo tanto, el conjunto de organismos puede comprender un número muy grande de organismos de genotipos diferentes. Además, los métodos de la invención pueden permitir identificar un organismo con una mutación predeterminada en cualquier NOI. A fin de ser capaz de identificar un organismo con una mutación en cualquier NOI, esto puede

requerir que el conjunto de organismos comprenda un gran número de genotipos diferentes, tales como los números anteriormente mencionados de genotipos diferentes.

El conjunto de organismos puede obtenerse de cualquier modo útil.

- 5 En una forma de realización, el conjunto de organismos es obtenido mediante la recolección de organismos individuales. Esto puede ser hecho por ejemplo a partir de bancos de semillas (siempre que la especie sea una planta), a partir de colecciones de células (siempre que la especie sea un organismo unicelular) o a partir de otras colecciones de organismos. Esto se puede lograr mediante la recolección de organismos individuales, o muestras de dichos organismos, de cualquier otro modo.

- 10 En una forma de realización preferida de la invención, el conjunto de organismos es preparado mediante mutagénesis, en particular, mediante mutagénesis aleatoria. Así, una pluralidad de organismos puede ser sometido a mutagénesis a fin de obtener el conjunto de organismos. Dicha mutagénesis puede ser en particular mutagénesis aleatoria, la cual –por ejemplo– puede ser llevada a cabo como se describe más adelante.

En formas de realización de la invención, en donde el organismo es un organismo unicelular, entonces típicamente una pluralidad de organismos intactos es sometida a mutagénesis aleatoria.

- 20 En formas de realización de la invención, en donde la especie es un organismo multicelular, puede ser suficiente someter una parte reproductiva de dicho organismo multicelular a dicha mutagénesis aleatoria. En tales formas de realización, una pluralidad de organismos –o una pluralidad de partes reproductivas de organismos, o una mezcla de los mismos– es sometida a mutagénesis aleatoria.

- 25 En formas de realización de la invención, en donde la especie es una planta, entonces dicho conjunto puede comprender una pluralidad de semillas que representan una pluralidad de genotipos. De este modo, el conjunto puede comprender una pluralidad de semillas, las cuales han sido sometidas a mutagénesis. Sin embargo, el conjunto puede también comprender progenie de semillas, las cuales han sido sometidas a mutagénesis.

30 En la presente, semillas (por ejemplo, granos de cereales), que han sido sometidas a mutagénesis pueden ser referidas como generación M0. Dichas semillas, por ejemplo granos de cereales, pueden ser sembradas y dejadas desarrollar hasta plantas

maduras, cuyas semillas son consideradas generación M1. La generación de semillas M1 puede ser sembrada y dejada crecer hasta plantas maduras cuyas semillas son consideradas generación M2 y así siguiendo. Este principio se ilustra en la Figura 2A.

5 El conjunto de organismos puede comprender semillas, por ejemplo granos, de cualquiera de las generaciones anteriormente mencionadas. Así, el conjunto no contiene necesariamente semillas sometidas previamente a mutagénesis directa. El conjunto de organismos puede también comprender semillas, por ejemplo granos de cereales, de generación M1, M2, o M3.

10 Dicha mutagénesis aleatoria puede ser llevada a cabo de cualquier manera útil, por ejemplo mediante irradiación o tratamiento químico. La irradiación puede ser irradiación UV, rayos X o irradiación radioactiva. La mutagénesis química puede ser un tratamiento con cualquier agente químico mutagenizante por ejemplo un agente químico seleccionado del conjunto que consiste en azida sódica (NaN_3), agentes alquilantes tales como N-etil-N-nitrosourea (ENU), metilnitronitrosoguanidina (MNNG) y metansulfonato de etilo (EMS, por sus siglas en inglés) o los agentes alquilantes
15 mencionados más adelante. Con frecuencia NaN_3 , ENU y EMS son utilizados para generar mutantes al azar. MNNG y EMS son utilizados con frecuencia para preparar cultivos de levadura mutagenizados al azar.

20 Para inducir mutaciones al azar en un ADN_g de plantas, los granos o tejidos vegetativos de plantas regenerables pueden ser tratados con un mutágeno, o una mezcla de mutágenos –incluyendo, pero no limitados a, agentes alquilantes tales como: sulfonatos, por ej. metan sulfonato de etilo (EMS), sulfonato de dietilo (DES, por sus siglas en inglés); mostazas de azufre, por ejemplo etil-2-cloroetil sulfuro; mostazas de nitrógeno, por ejemplo 2-cloroetil-dimetil amina, y epóxidos, por ejemplo óxido de etileno. Otros son etilenimina, hidroxilamina (NH_2OH), N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG), NaN_3 y diazometano. Los tejidos o granos tratados pueden luego ser propagados para generar organismos de descendencia. Tal mutagénesis aleatoria puede ser utilizada con plantas, tales como plantas de cultivo, incluyendo cereales –pero no limitados a trigo, maíz, arroz, sorgo y mijo– y plantas dicotiledóneas
25 de cultivo, incluyendo –pero no limitadas a– colza, algodón, soja y remolacha.
30

Los métodos de la invención no están restringidos a ningún tipo de mutagénesis en particular. Por lo tanto, puede utilizarse cualquier tipo de mutagénesis, tal como cualquier forma de mutagénesis aleatoria.

En una forma de realización de la invención, los conjuntos de organismos pueden ser preparados como se describe en la presente más adelante en la sección “WS1” de los Ejemplos. En formas de realización de la invención, en donde la especie es cebada, el conjunto de organismos puede ser preparado como se describe en la presente más adelante en la sección “WS1” de los Ejemplos en relación a cebada. La persona experta será capaz de adaptar los métodos descritos en WS1 para uso con otras plantas de flor, incluyendo otras plantas de cereales. En formas de realización de la invención en donde la especie es levadura, el conjunto de organismos puede ser preparado como se describe en la presente más adelante en la sección “WS1” de los Ejemplos en relación a levaduras. La persona experta será capaz de adaptar los métodos descritos en WS1 para uso con otros organismos unicelulares.

División de un conjunto de organismos en subconjuntos

Los métodos de la invención comprenden una etapa de división del conjunto de organismos en uno o más subconjuntos, en donde cada subconjunto comprende una pluralidad de organismos, o partes reproductivas de los mismos. Preferiblemente, cada subconjunto comprende una pluralidad de organismos, o partes reproductivas de los mismos, que representa una pluralidad de genotipos.

De modo usual, el conjunto es dividido en una pluralidad de subconjuntos, preferiblemente en al menos 5 subconjuntos, más preferiblemente en al menos 10 subconjuntos, aún más preferiblemente en al menos 30 subconjuntos, aún más preferiblemente en al menos 50 subconjuntos, aún más preferiblemente en al menos 70 subconjuntos, aún más preferiblemente en al menos 90 subconjuntos.

En algunas formas de realización, el conjunto es dividido en al menos 500, tal como al menos 1000, por ejemplo al menos 1500 subconjuntos. De este modo, en particular, se da el caso en formas de realización de la invención, en donde el conjunto comprende un gran número de organismos de diferente genotipo.

No hay en principio un límite superior del número de subconjuntos. Típicamente, sin embargo, el conjunto es dividido en a lo sumo 50.000, tal como a lo sumo en 25.000, por ejemplo a lo sumo en 10.000 subconjuntos.

En algunas formas de realización, el conjunto es dividido en subconjuntos en un rango de 90 a 500 subconjuntos.

Cada subconjunto comprende preferiblemente una pluralidad de organismos, o de partes reproductivas de los mismos, que representan una pluralidad de genotipos.

- Preferiblemente, cada subconjunto comprende al menos 10, más preferiblemente al menos 100, aún más preferiblemente al menos 500, aún más preferiblemente al menos 1000, aún más preferiblemente al menos 5000, aún más preferiblemente al menos 10.000, por ejemplo 50.000, tal como al menos 100.000 organismos, o partes reproductivas de los mismos, con genotipos diferentes. En algunas formas de realización, cada subconjunto comprende en el rango de 2000 a 10.000, tal como en el rango de 3000 a 5000 organismos, o partes reproductivas de los mismos, con genotipos diferentes.
- En algunas formas de realización cada subconjunto comprende en el rango de 1000 a 2000 organismos, o partes reproductivas de los mismos, que representan genotipos diferentes.
- Los subconjuntos pueden ser ordenados en cualquier modo deseado. Si un conjunto comprende una pluralidad de organismos del mismo genotipo, se prefiere que la mayoría de los organismos, o aún todos los organismos del mismo genotipo, estén contenidos dentro del mismo subconjunto. Esto puede ser asegurado en una cantidad de formas dependiendo de la especie, por ejemplo como se describe más adelante. En formas de realización de la invención, en la cual el conjunto de organismos, o partes reproductivas de los mismos, se prepara mediante mutagénesis aleatoria, puede ser preferido que dicho conjunto sea dividido de una forma tal que toda la progenie de un organismo de dicho conjunto, o parte reproductiva del mismo, esté comprendido dentro de un subconjunto.
- Por ejemplo, el conjunto puede ser dividido en subconjuntos, y dichos subconjuntos pueden ser sometidos a una etapa de reproducción. Es también posible que la etapa de reproducción sea llevada a cabo simultáneamente con la etapa de división del conjunto en subconjuntos de un modo que permita que la progenie de un único organismo, o parte reproductiva del mismo, termine en el mismo subconjunto.
- Se prefiere también que cada subconjunto comprenda más de un organismo, o parte reproductiva del mismo, de cada genotipo. Esto puede asegurarse de diferentes maneras. Por ejemplo, los subconjuntos pueden ser sometidos a una etapa de reproducción permitiendo la formación de progenie de cada organismo, o parte reproductiva del mismo, de dicho subconjunto. En particular, se prefiere que cada subconjunto comprenda suficientes organismos de cada genotipo a fin de dividir aleatoriamente el subconjunto en 2, 3 o 4 partes de un modo tal que cada parte, teóricamente, comprenda organismos (o partes reproductivas de los mismos), que

representan cada genotipo del subconjunto. Entonces, es preferido que cada subconjunto comprenda al menos 5, preferiblemente al menos 10, aún más preferiblemente al menos 15 organismos que representan cada genotipo. Esto puede, en particular, ser el caso en formas de realización de la invención, en donde la especie es una planta, por ejemplo un cereal. En formas de realización de la invención, en donde la especie es un organismo unicelular, entonces puede ser preferido que cada subconjunto comprenda muchos más organismos de cada genotipo, por ejemplo al menos 100, tal como al menos 1000, por ejemplo al menos 10.000.

Un ejemplo de un método para dividir el conjunto en subconjuntos es provisto en la Figura 1A.

En formas de realización de la invención, en donde la especie es un organismo unicelular, y el conjunto está preparado mediante mutagenización de una pluralidad de organismos unicelulares, los subconjuntos pueden, por ejemplo, ser preparados como sigue:

- Después de la mutagénesis, cada organismo unicelular puede ser dejado multiplicarse en un modo separado tal que cada organismo unicelular se desarrolle en un cultivo clonal. Esto puede hacerse cultivando colonias de cada clon en un medio sólido o cultivando cada clon en un espacio separado, por ejemplo en tubos o pocillos, con medio líquido. El subconjunto puede ser formado combinando organismos unicelulares a partir de una pluralidad de clones;
- Los organismos unicelulares pueden ser divididos en subconjuntos inmediatamente después de la mutagénesis, y se puede dejar que cada subconjunto se reproduzca.

En consecuencia, los métodos pueden comprender las etapas de:

- Proveer una pluralidad de organismos unicelulares por ejemplo levadura;
- Someter dichos organismos a mutagénesis aleatoria;
- Dividir los organismos mutagenizados en subconjuntos;
- Someter cada subconjunto a una etapa de reproducción.

Dicha etapa de reproducción puede comprender incubar cada subconjunto en medio de cultivo bajo condiciones que permiten el crecimiento de dicho organismo. Por ejemplo, la etapa puede involucrar incubar los subconjuntos en medio de cultivo durante un tiempo en el rango de 1 a 5 días a una temperatura que permite el crecimiento de dicho organismo.

En formas de realización de la invención, en donde la especie es una planta, el subconjunto puede ser preparado de un modo tal que todas las semillas de una planta particular estén contenidas dentro de un subconjunto. En consecuencia, en una forma de realización de la invención, los métodos comprenden las etapas de:

5

- Proveer una pluralidad de semillas de una planta, por ejemplo granos de cereales;
- Mutagenizar dichas semillas, obteniendo de este modo semillas de generación M0;
- Hacer crecer dichas semillas de generación M0 hasta plantas maduras, y obtener semillas a partir de dichas plantas maduras, en donde dichas semillas son semillas de generación M1;

10

- Opcionalmente repetir las etapa previa 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 (por ejemplo un conjunto de granos de cereal);

15

- Dividir dicho conjunto en subconjuntos, en donde todas las semillas (por ejemplo granos de cereal) a partir de una planta madura dada estén situadas dentro del mismo subconjunto.

20

Estas etapas están ilustradas en las Figuras 2A y 2B utilizando cebada como un ejemplo. El método puede comprender las etapas ilustradas en las Figuras 2A y 2B. Las etapas ilustradas en las Figuras 2A y 2B pueden ser llevadas a cabo utilizando cualquier planta de flor, y no están por lo tanto limitadas a cebada. Además, las etapas ilustradas en las Figuras 2A y 2B pueden ser llevadas a cabo utilizando cualquier número de plantas mutadas (los números provistos en la figura son meramente un ejemplo).

25

En concordancia, el método puede comprender las etapas de:

- Proveer una pluralidad de semillas de plantas, por ejemplo granos de cereales;
- Mutagenizar dichas semillas, obteniendo de este modo semillas de generación M0;
- Opcionalmente cultivar dichas semillas de generación M0 hasta plantas maduras, y obtener semillas a partir de dichas plantas maduras, en donde dichas semillas son semillas de generación M1;
- Opcionalmente repetir la etapa previa X veces para obtener plantas que comprenden semillas de generación M(1+X);

30

- Cultivar semillas de generación M0, M1 o M(1+X) en parcelas de campo discretas hasta plantas maduras, en donde las semillas de dichas plantas maduras constituyen el conjunto de semillas;
 - Dividir dichas áreas en sub-parcelas de campo;
- 5 – Cosechar todas las semillas de todas las plantas dentro de una sub-parcela de campo, obteniendo de este modo un subconjunto de semillas (por ejemplo un subconjunto de granos de cereal), el cual puede ser referido como “Total de grano” (ver Figura 2B).
- 10 En lugar de cultivar semillas en parcelas de campo, estas pueden ser cultivadas de cualquier modo útil para permitir dividir las plantas en subconjuntos, obteniendo así subconjuntos. Por ejemplo, las semillas pueden ser cultivadas en contenedores separados, comprendiendo cada uno una o más plantas. Estas semillas pueden ser también cultivadas en un invernadero.
- 15 Un ejemplo de un método para dividir un conjunto en un subconjunto es descrito en la presente más adelante en WS2.

Identificación de subconjuntos

Los métodos de la invención comprenden las etapas de división de un conjunto de organismos, o partes reproductivas de los mismos en subconjuntos. Esto es seguido mediante una etapa de identificación de un subconjunto que comprende un organismo, o partes reproductivas del mismo, que comprende la(s) mutación(es) en el(los) NOI(s).

La identificación de dicho subconjunto puede comprender las etapas de:

- 25 a) Preparar muestras de ADN_g, cada una comprendiendo ADN_g de cada genotipo dentro de un subconjunto, lo cual por ejemplo, puede ser llevado a cabo como se describe en la presente más adelante en la sección “Preparación de muestras de ADN”;
- 30 b) Llevar a cabo una pluralidad de amplificaciones por PCR comprendiendo cada una, una pluralidad de amplificaciones por PCR compartimentadas, por ejemplo como se describe en la presente más adelante en la sección “Amplificación por PCR que comprende una pluralidad de amplificaciones por PCR compartimentadas”;

c) Detectar producto(s) de amplificación por PCR que comprende(n) mutación(es) en el(los) NOI(s) de interés, identificando de este modo dicho(s) subconjunto(s), por ejemplo como se describe en la presente más adelante en la sección “Detección de producto(s) de amplificación por PCR”.

5 El subconjunto puede, por ejemplo, ser identificado directamente siempre que el(los) producto(s) de amplificación por PCR, que comprende(n) la(s) mutación(es) en el(los) NOI(s) que puedan ser detectados directamente después o durante la amplificación por PCR. Esto puede ser hecho, por ejemplo si el(los) producto(s) de amplificación por PCR comprende(n) medios de detección, que den lugar a una o más señales
10 detectables, siempre que el(los) producto(s) de amplificación por PCR comprenda(n) la(s) secuencia(s) diana que comprende(n) la(s) mutación(es) en el(los) NOI(s). Tales medios de detección se describen en más detalle a continuación en la sección “Detección de producto(s) de amplificación por PCR”, y pueden, por ejemplo, ser sondas para detección de mutaciones.

15 Un ejemplo de un método para identificación de un subconjunto que comprende una o más mutaciones específicas se ilustra en la Figura 1B, destacando las siguientes etapas:

- Proveer un subconjunto;
- 20 – Preparar una muestra a partir de una parte de dicho subconjunto;
- Preparar una muestra de ADN_g a partir de dicha muestra;
- Preparar amplificaciones por PCR con todas las muestras de ADN_g individuales a partir de todos los subconjuntos, por ejemplo en pocillos individuales de una placa, por ejemplo en placas de microtítulo;
- 25 – Seleccionar aquellas muestras que comprendan la(s) mutación(es) en el(los) NOI(s).

Un ejemplo más específico de un método para identificar un subconjunto se muestra en la Figura 2C. En este ejemplo, la especie pertenece al conjunto de una planta de cereal. Los números específicos provistos en la Figura 2C son ejemplos solamente, y
30 la persona experta entenderá que el método puede ser llevado a cabo utilizando otra cantidad de granos. Por ejemplo, la identificación de un subconjunto que comprende la mutación en el NOI puede ser llevada a cabo como se bosqueja en WS3 en la presente más adelante.

Preparación de muestras de ADN

Los métodos de la invención comprenden una o más etapas de preparación de muestras de ADN, en particular de muestras de ADNg. En particular, los métodos
5 pueden comprender una etapa de preparación de muestras de ADNg a partir de un subconjunto, y una etapa de preparación de muestras de ADNg a partir de un subconjunto secundario. Los métodos pueden también comprender una etapa de preparación de muestras de ADNg a partir de un super-conjunto.

En general, dichas muestras de ADNg son preparadas de tal modo que la muestra de
10 ADNg en teoría comprenda ADNg de cada genotipo dentro de un subconjunto, subconjunto secundario o super-conjunto, mientras se mantiene el potencial para la reproducción de organismos de cada genotipo dentro de dicho subconjunto, subconjunto secundario o super-conjunto.

Esto puede ser asegurado de diferentes modos. Por ejemplo, puede ser preferido que
15 cada subconjunto y super-conjunto comprenda más de un organismo individual, o partes reproductivas del mismo, de cada genotipo. En particular, puede ser preferido que cada subconjunto o super-conjunto comprenda suficientes organismos de cada genotipo a fin de ser capaz de dividir aleatoriamente el subconjunto o el super-conjunto en 2, 3 o 4 partes de un modo tal que cada parte en teoría comprenda
20 organismos, o partes reproductivas de los mismos, que representen cada genotipo del subconjunto o super-conjunto.

De esa manera, una parte de los organismos, o partes reproductiva de los mismos, a partir del subconjunto o super-conjunto, por ejemplo en el rango de 10 a 90%, preferiblemente en el rango de 10 a 50%, tal como en el rango de 25 a 50% de los
25 organismos, o partes reproductivas de los mismos, de cada subconjunto o cada super-conjunto puede ser utilizado para preparar la muestra de ADNg. Dicha parte de los organismos, o partes reproductivas de los mismos, puede ser referida en la presente como "Muestra de organismos". El remanente de los organismos del subconjunto puede ser almacenado bajo condiciones que mantienen el potencial reproductivo de
30 dichos organismos o partes reproductivas de los mismos. En formas de realización donde el organismo es una planta puede ser suficiente almacenar semillas de dichas plantas. Las semillas, por ejemplo granos de cereal, pueden ser almacenadas con frecuencia en cualquier lugar seco y oscuro. En formas de realización de la invención donde el organismo es un organismo unicelular, puede ser preferido congelar dicho

organismo

—por ejemplo en presencia de un crioprotector tal como glicerol.

De modo similar, cada uno de dichos subconjuntos secundarios puede comprender más de un organismo individual, o partes reproductivas de los mismos, de cada genotipo. Así, una parte de los organismos —o partes reproductivas de los mismos— a partir del subconjunto secundario, por ejemplo en el rango de 10 a 90%, preferiblemente en el rango de 40 a 60%, tal como en el rango de 25 a 50% de los organismos, o partes reproductivas de los mismos, de cada subconjunto secundario puede ser utilizado para preparar la muestra de ADNg. Sin embargo, en algunas formas de realización, en particular cuando la especie es un organismo más grande, entonces puede preferirse que la muestra de ADNg del subconjunto secundario sea preparado a partir de una muestra de una parte de cada organismo, o partes reproductivas del mismo como se describe más adelante.

Está también comprendido dentro de la invención que la muestra de ADNg pueda ser preparada a partir de una muestra obtenida a partir de cada organismo, o parte reproductiva del mismo, o un subconjunto, de un subconjunto secundario o de un super-conjunto. Por ejemplo, está comprendido dentro de la invención que cada subconjunto, super-conjunto y subconjunto secundario pueda comprender solamente uno o unos pocos organismos, o partes reproductivas de los mismos, de cada genotipo. En tales formas de realización, la muestra de ADNg puede ser preparada a partir de una muestra obtenida a partir de cada organismo, o partes reproductivas del mismo. En general, es solamente posible obtener una muestra a partir de cada organismo en formas de realización de la invención, en donde la especie es de un tamaño suficiente para obtener tal muestra. Esto puede, en particular, ser relevante en formas de realización de la invención donde la especie es un animal o una planta, tal como una planta de flor.

Mientras el subconjunto y el super-conjunto comprenden preferiblemente varios organismos individuales, o partes reproductivas de los mismos, de cada genotipo como indicado en otra parte en la presente, entonces el subconjunto frecuentemente puede comprender solamente unos pocos —a veces solamente uno— organismos individuales, o partes reproductivas de los mismos, de cada genotipo. Así, en formas de realización de la invención, en donde la especie es una planta (por ejemplo un cereal), se prefiere que la muestra de ADNg a partir del subconjunto secundario sea

preparada obteniendo una muestra de cada organismo individual y preparando muestras de ADNg a partir de dichas muestras.

5 Cuando se obtienen muestras de cada organismo, o partes reproductivas de los mismos, se prefiere que las muestras sean obtenidas de un modo no significativamente dañino para dichos organismos, o partes reproductivas de los mismos, con respecto al potencial para reproducción. Así preferiblemente, la muestra comprende o consiste en una parte del organismo, o partes reproductivas del mismo, que no es esencial para la reproducción. La muestra puede ser obtenida de cualquier manera útil dependiendo de la especie, por ejemplo utilizando biopsia, corte,
10 perforación, raspado, desgarrar o aplicando una jeringa equipada con una aguja.

A modo de ejemplo, en formas de realización donde la especie es un cereal y donde el subconjunto, super-conjunto o subconjunto secundario comprende granos de cereal, entonces dicha muestra comprende preferiblemente una parte del grano de cereal, el cual es no esencial para reproducción. La muestra puede ser obtenida de diferentes
15 maneras, por ejemplo retirando mediante corte parte(s) del grano utilizando cualquier instrumento afilado, al como un cuchillo, escalpelo o tijera, retirar por raspado parte del grano, o puede ser obtenido perforando un orificio dentro del grano. En el último caso, la muestra puede ser la harina obtenida después de perforar.

Una vez que la muestra de organismos, o la muestra obtenida a partir de los
20 organismos, o partes de los mismos, está disponible (referida en la presente también de modo general como “muestra”), la muestra de ADNg puede ser preparada a partir de dichas muestras de cualquier modo útil. Si dichas muestras contienen grandes estructuras, por ejemplo semillas enteras, la primera etapa para preparar una muestra de ADNg típicamente involucrará dividir dichos contenidos de dicha muestra en partes
25 más pequeñas, por ejemplo, mediante medios físicos, por ejemplo aplastando o moliendo. Los métodos de preparación de la muestra de ADNg típicamente comprende las etapas de romper células y/o tejidos, por ejemplo mediante detergente, mediante enzimas (por ejemplo liticase), mediante ultrasonido o mediante combinaciones de los mismos
30 –creando de este modo un lisado crudo. Dicho lisado puede ser separado de los residuos restantes mediante medios útiles. El lisado crudo puede constituir la muestra de ADNg. Alternativamente, el ADNg puede además ser purificado, por ejemplo separando dicho ADNg del remanente del lisado, por ejemplo por unión a una matriz selectiva, centrifugación, centrifugación por gradiente y/o precipitación (por ejemplo

utilizando un agente de precipitación, tal como una sal, un alcohol o perlas magnéticas). Antes de tal separación, otros componentes del lisado –incluyendo proteínas y/o nucleoproteínas– pueden ser desnaturalizados o destruidos, por ejemplo utilizando enzimas y/o agentes de desnaturalización. Otras moléculas que contienen ARN pueden ser retiradas, por ejemplo con la ayuda de enzimas. Métodos útiles para preparar muestras de ADN_g están por ejemplo, descritos en Sambrook et al., Molecular Cloning – Laboratory Manual, ISBN 978-1-936113-42-2.

Amplificación por PCR que comprende una pluralidad de amplificaciones por PCR compartimentadas

Los métodos de la invención comprenden una etapa de realización de una pluralidad de amplificaciones por PCR comprendiendo cada una muestra de ADN_g a partir de un subconjunto (por ejemplo preparado como se describe en las secciones anteriores) amplificando de este modo la secuencia diana. Cada amplificación por PCR puede comprender una pluralidad de amplificaciones por PCR compartimentadas comprendiendo cada una, una parte de dicha muestra de ADN_g, uno o más conjuntos de cebadores flanqueando la secuencia diana y los reactivos para PCR.

La reacción PCR completa que comprende una pluralidad de amplificaciones por PCR compartimentadas puede ser preparada en un número de diferentes maneras. En una forma de realización, la amplificación por PCR que comprende una pluralidad de amplificaciones por PCR compartimentadas puede ser conducida como una amplificación por PCR digital (dPCR por sus siglas en inglés). Cualquier amplificación por dPCR conocida por la persona experta puede ser utilizada en la invención. En general, al menos una amplificación por dPCR que comprende una pluralidad de amplificaciones por PCR compartimentadas se preparará para cada muestra de ADN_g preparada. Así, se preparará por subconjunto al menos una amplificación por dPCR que comprende una pluralidad de amplificaciones por dPCR compartimentadas.

En general, la amplificación por dPCR compartimentada es preparada en un método que comprende las etapas de:

- Preparar una amplificación por dPCR que comprende la muestra de ADN_g, un conjunto de cebadores que flanquean la secuencia diana y reactivos para PCR;

- Particionar dicha amplificación por dPCR de modo que las moléculas de ácido nucleico dentro de la muestra estén situadas y concentradas dentro de una pluralidad de compartimentos separados espacialmente;
- Llevar a cabo una amplificación por dPCR;
- 5 – Detectar productos de amplificación en base a dPCR.

Dichos compartimentos separados pueden ser cualesquiera compartimentos separados en los cuales pueden ser llevadas a cabo amplificaciones por PCR. Por ejemplo, puede ser un pocillo de una placa, por ejemplo un pocillo de una microplaca de pocillos o placa para microtítulo, pueden ser cámaras microfluídicas, pueden ser
 10 capilares, puede ser la fase dispersada de una emulsión, o puede ser una gota o cámara miniaturizada de una disposición de cámaras miniaturizadas. Los compartimentos separados pueden ser también puntos discretos sobre un soporte sólido, por ejemplo superficies discretas de unión a ácido nucleico.

Se prefiere generalmente que la muestra de ADN_g esté distribuida aleatoriamente dentro de las muestras para amplificación por dPCR compartimentada. Se prefiere
 15 también que cada amplificación por dPCR compartimentada solamente comprenda un pequeño número de ácidos nucleicos que comprenda la secuencia diana. Debido a la naturaleza de la distribución aleatoria, puede haber alguna variación en el número de moléculas de ácido nucleico comprendidas en cada amplificación por dPCR
 20 compartimentada. En una forma de realización, cada amplificación por dPCR compartimentada comprende, en promedio, a lo sumo 10, tal como a lo sumo 5 moléculas de ácido nucleico que comprenden la secuencia diana.

En una forma de realización preferida de la invención, la amplificación por dPCR que comprende una pluralidad de amplificación por PCR compartimentada es una reacción
 25 en cadena de polimerasa digital en gotas (ddPCR por sus siglas en inglés). La ddPCR es un método para llevar a cabo dPCR que está basado en una tecnología en gotas de emulsión agua-aceite. La amplificación por PCR es fraccionada en una pluralidad de micro gotas, y la amplificación por PCR de la secuencia diana tiene lugar en cada gota individual. En general la tecnología ddPCR utiliza reactivos para PCR y corrientes de
 30 trabajo similares a aquellas utilizadas para llevar a cabo PCRs convencionales. Así, el particionado de la amplificación por PCR es un aspecto clave de la técnica ddPCR.

De manera acorde, las amplificaciones por ddPCR compartimentadas pueden estar contenidas en gotas, las que pueden, por ejemplo, incluir composiciones de emulsión,

o mezclas de dos o más fluidos inmiscibles (por ejemplo como se describe en U.S. Pat. No. 7.622.280 o como se describe en los ejemplos en la presente más adelante). Las gotas pueden ser generadas mediante dispositivos descritos en WO/2010/036352. En particular, las gotas pueden ser preparadas utilizando un

5 generador de gotas, por ejemplo QX200 Droplet Generator disponible a partir de Bio-Rad Laboratories, EE.UU. (abreviado de aquí en adelante Bio-Rad). El término emulsión, como se utiliza en la presente, puede hacer referencia a una mezcla de líquidos inmiscibles (tal como aceite y agua). Las emulsiones pueden ser, por ejemplo, gotas de agua en aceite, por ejemplo como se describe en [Hindson, BJ et al.

10 (2011). High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. Anal Chem 83: 8604–8610]. Las emulsiones pueden así comprender gotas acuosas dentro de una fase continua de aceite. Las emulsiones pueden ser también emulsiones de aceite en agua, en donde las gotas son gotas de aceite dentro de una fase continua acuosa. Las gotas utilizadas en la presente están normalmente

15 diseñadas para evitar la mezcla entre compartimentos, donde el contenido de un compartimento individual no solamente está protegido de la evaporación, sino también de la coalescencia con los contenidos de otros compartimentos. De este modo, cada gota puede ser considerada como un compartimento espacialmente separado.

Cada gota para ddPCR puede tener cualquier volumen útil. Preferiblemente, sin embargo, las gotas tiene un volumen en el rango de nanolitros (nl). En concordancia,

20 se prefiere que el volumen de gota esté en promedio, en un rango de 0,1 a 10 nl.

Los métodos microfluídicos de producción de gotas de emulsión que utilizan flujo cruzado en microcanales con enfoque o agitación física son conocidos para producir emulsiones monodispersas o polidispersas. Las gotas pueden ser gotas

25 monodispersas. También, las gotas pueden ser generadas tal que sus tamaños no varían en más de $\pm 5\%$ del tamaño promedio de las gotas. En algunos casos, las gotas son generadas de modo que los tamaños de gotas solamente varían con $\pm 2\%$ del tamaño promedio de las gotas.

Una estabilidad mecánica superior puede ser útil para manipulaciones microfluídicas y procesamiento fluídico de mayor esfuerzo cizalla (por ejemplo, en capilares microfluídicos o a través de virajes de 90° , tal como válvulas en pasos fluídicos). Gotas pre- y pos-tratadas térmicamente, o cápsulas, pueden ser mecánicamente estables ante manipulaciones con pipeta estándar y centrifugación.

30

Una gota puede ser formada haciendo fluir una fase oleosa a través de una muestra acuosa. La fase acuosa puede comprender, o consistir, en componentes de una amplificación por PCR, por ejemplo una amplificación por PCR que comprende la muestra de ADN_g, un conjunto de cebadores que flanquean la secuencia diana y reactivos para PCR, tal como cualquiera de los reactivos para PCR descritos en la presente más adelante en la sección “Reactivos para PCR”.

La fase oleosa puede comprender un aceite de base fluorada, el cual puede además estar estabilizado mediante la combinación con un surfactante fluorado tal como un poliéter perfluorado. En algunos casos, el aceite base puede ser uno o más de HFE 7500, FC-40, FC-43, FC-70, u otro aceite fluorado común. En algunos casos, el surfactante aniónico es Ammonium Krytox (Krytox-AM), la sal de amonio de Krytox FSH, o derivado morfolino de Krytox-FSH.

La fase oleosa puede además comprender un aditivo para ajustar las propiedades del aceite, tal como la presión de vapor, viscosidad o tensión superficial. Ejemplos no limitantes incluyen perfluoro-octanol y 1H,1H,2H,2H-perfluorodecanol. La fase oleosa puede ser también un aceite de generación de gotas, por ejemplo el Droplet Generation Oil disponible a partir de Bio-Rad.

La emulsión puede ser formulada para producir gotas altamente mono-dispersas que tienen una película de interfase de tipo líquido que puede ser convertida mediante calentamiento en micro cápsulas que tienen una película de interfase de tipo sólido; tales microcápsulas pueden comportarse como biorreactores que retienen sus contenidos a través de un proceso de reacción, tal como amplificación por PCR. La conversión en forma de microcápsula puede ocurrir mediante calentamiento. Por ejemplo, tal conversión puede ocurrir a una temperatura de más de 50, 60, 70, 80, 90, o 95°C. En algunos casos, este calentamiento ocurre utilizando un termociclador. Durante el proceso de calentamiento, un fluido o revestimiento de aceite mineral puede ser utilizado para evitar la evaporación.

En algunos casos, la gota es generada utilizando un generador de gotas disponible comercialmente, al como Bio-Rad QX100™ Droplet Generator o Bio-Rad QX200™ Droplet Generator. La ddPCR y la subsiguiente detección puede ser llevada a cabo utilizando un lector de gotas disponible comercialmente, tal como Bio-Rad QX100 o QX200™ Droplet Reader.

Cada amplificación por PCR puede ser compartimentada en un número adecuado de compartimentos. Sin embargo, en una forma de realización preferida, cada

amplificación por PCR es compartimentada en el rango de 1000 a 100.000 compartimentos (por ejemplo gotas). Por ejemplo, cada amplificación por PCR puede ser compartimentada en el rango de 10.000 a 50.000 compartimentos (por ejemplo gotas). Por ejemplo, cada amplificación por PCR puede ser compartimentada en el
5 rango de 15.000 a 25.000 compartimentos (por ejemplo gotas). Adicionalmente, cada amplificación por PCR puede ser compartimentada en aproximadamente 20.000 compartimentos (por ejemplo gotas).

Reactivos para PCR

El método abarca llevar a cabo varias amplificaciones por PCR, en donde al menos
10 algunas de estas PCRs pueden comprender una pluralidad de amplificaciones por PCR compartimentadas.

Independientemente de si dicha PCR comprende amplificaciones por PCR compartimentadas o no, entonces las amplificaciones por PCR comprenderán en general una muestra de ADNg, un conjunto de cebadores que flanquean la secuencia
15 diana y reactivos para PCR. Dichos reactivos para PCR pueden ser cualquiera de los reactivos para PCR descritos en la presente en esta sección.

Los reactivos para PCR, en general, comprenden al menos nucleótidos y una polimerasa de ácido nucleico. Los nucleótidos pueden ser moléculas desoxi-
ribonucleótido trifosfato, y preferiblemente los reactivos para PCR comprenden al
20 menos dATP, dCTP, dGTP y dTTP. En algunos casos, los reactivos para PCR comprenden también dUTP.

La polimerasa de ácido nucleico puede ser cualquier enzima capaz de catalizar la polimerización de nucleótidos dependiente de molde, es decir replicación. La polimerasa de ácido nucleico deberá tolerar las temperaturas utilizadas para la
25 amplificación por PCR, y deberá tener actividad catalítica a la temperatura de elongación. Varias polimerasas de ácido nucleico, termoestables, son conocidas por la persona experta.

En algunas formas de realización de la invención, la polimerasa de ácido nucleico tiene actividad 5'-3' nucleasa y puede por lo tanto ser utilizada en la reacción de
30 amplificación con una sonda TaqMan®.

La polimerasa de ácido nucleico puede ser ADN polimerasa I de *Escherichia coli*. La polimerasa de ácido nucleico puede ser también ADN polimerasa TAq, la cual tiene una actividad de exonucleasa 5'-3' reemplazadora de hebra dependiente de síntesis

de ADN. Otras polimerasas que tienen actividad de nucleasa 5'-3' incluyen, pero no se limitan a, ADN polimerasa rTth. La ADN polimerasa Taq, por ejemplo obtenida a partir de New England Biolabs, puede incluir ADN polimerasa Taq Crimon LongAmp®, ADN Polimerasa Crimson Taq, Hemo KlenTaq™, o LongAmp® Taq.

- 5 En algunos casos, la polimerasa de ácido nucleico puede ser por ejemplo, ADN polimerasa de E. coli, fragmento Klenow de ADN polimerasa I de E. coli, ADN polimerasa T7, ADN polimerasa T4, polimerasa Taq, ADN polimerasa Pfu, ADN polimerasa Vent, bacteriófago 29, REDTaq™, ADN polimerasa Genomic, o Sequenase. Las ADN polimerasas se describen, por ejemplo en la publicación de
- 10 solicitud de patente US 2012/0258501.

Adicionalmente, los reactivos para PCR pueden comprender sales, buffers y medios de detección. Los buffers pueden ser cualquier buffer útil, por ejemplo TRIS. Las sal puede ser cualquier sal útil, por ejemplo cloruro de potasio, cloruro de magnesio o acetato de magnesio o sulfato de magnesio.

- 15 Los reactivos para PCR pueden comprender agentes bloqueantes no-específicos, tales como BSA, gelatina de cuero bovino, beta-lactoglobulina, caseína, leche deshidratada, ADN de esperma de salmón u otros agentes bloqueantes comunes.

- Los reactivos para PCR pueden comprender también bio-conservantes (por ejemplo NaN₃), mejoradores de PCR (por ejemplo betaína, trehalosa, etc.) e inhibidores (por
- 20 ejemplo inhibidores ARNasa). Otros aditivos pueden incluir sulfóxido de dimetilo (DMSO), glicerol, betaína (mono)-hidrato, trehalosa, 7-desaza-2'-desoxiguanosina trifosfato (7-desaza-2'-dGTP), albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés), formamida (metanamida), cloruro de tetrametilamonio (TMAC, por sus siglas en inglés), otros derivados de tetraalquilamonio [por ejemplo cloruro de tetraetilamonio
- 25 (TEA-Cl)]; cloruro de tetrapropilamonio (TPrA-Cl) o detergente no iónico, por ejemplo Triton X-100, Tween 20, Nonidet P-40 (NP-40) o PREXCEL-Q.

- Adicionalmente, los reactivos para PCR pueden también comprender uno o más medios de detección de producto(s) de amplificación por PCR que comprenden la(s) mutación(es) en el(las) NOI(s). Dichos medios pueden ser cualquier medio detectable,
- 30 y pueden ser agregados como compuestos individuales o ser asociados con, o aún covalentemente ligados a, uno de los cebadores. Los medios detectables incluyen, pero no se limitan a, colorantes, compuestos radioactivos, compuestos bioluminiscentes y fluorescentes. En una forma de realización preferida, el medio para detección es uno o más sondas. Así, se prefiere que el reactivo para PCR comprenda

una o más sondas para detección. De este modo, se prefiere que el reactivo para PCR comprenda una o más sondas para detección, por ejemplo cualesquiera de las sondas descritas más adelante en la presente en la sección “Detección de producto(s) de amplificación por PCR”.

5

Cebadores que flanquean la secuencia diana

Los métodos de la invención involucran el uso de uno o más conjuntos de cebadores que flanquean la secuencia diana. Un “conjunto de cebadores” discreto que flanquea una secuencia diana incluye un cebador que comprende una secuencia idéntica al extremo 5’ de la secuencia diana (también referida como “cebador directo”) y un
10 cebador que comprende una secuencia complementaria al extremo 3’ de la secuencia diana (también referida como “cebador inverso”). El conjunto de cebadores es capaz de amplificar la secuencia diana cuando se agrega a una PCR junto con un ácido nucleico que comprende la secuencia diana y reactivos para PCR bajo condiciones
15 que permiten la amplificación de dicha secuencia diana. El mismo conjunto de cebadores puede ser utilizado para todas las amplificaciones por PCR de los métodos de acuerdo con la invención aunque también es posible que se utilicen diferentes conjuntos de cebadores para las amplificaciones por PCR de las diferentes etapas de la invención.

20 En adición a la secuencia idéntica al extremo 5’ de la secuencia diana, el cebador directo puede comprender secuencias adicionales. De modo similar, en adición a la secuencia complementaria al extremo 3’ de la secuencia diana, el cebador inverso puede comprender secuencias adicionales. Por ejemplo, los cebadores pueden contener en el extremo 5’ una secuencia de ácido nucleico adicional, que no hibridiza
25 con un ácido nucleico diana, pero que facilita manipular el cebador o el producto de amplificación por PCR, por ejemplo la detección de dicho producto.

La longitud del cebador directo y del cebador inverso pueden depender de la secuencia de la secuencia diana. Por ejemplo, la longitud de los cebadores puede ser ajustada para lograr una temperatura de fusión deseable, T_m , de los cebadores. Así,
30 la longitud del cebador directo y del cebador inverso pueden, individualmente, tener una longitud en el rango de 10 a 100 nucleótidos, por ejemplo en el rango de 10 a 50 nucleótidos, tal como en el rango de 15 a 20 nucleótidos, tal como en el rango de 15 a 25 nucleótidos, tal como en el rango de 15 a 30 nucleótidos, tal como en el rango de 15 a 40 nucleótidos, tal como en el rango de 15 a 45 nucleótidos, tal como en el rango

de 15 a 50 nucleótidos. La T_m del cebador directo y del cebador inverso es ajustada típicamente en el rango de 40 a 70°C.

La concentración de cebadores dentro de la fase acuosa de las amplificaciones por PCR puede por ejemplo, estar en el rango de 0,05 a 2,0 μM , tal como en el rango de 0,1 a 1,0 μM , tal como en el rango de 0,2 a 1,0 μM , tal como en el rango de 0,3 a 1,0 μM , tal como en el rango de 0,4 a 1,0 μM o en el rango de 0,5 a 1,0 μM .

El cebador directo y el cebador inverso en general, comprenden –o aún consisten en– oligonucleótidos. Sin embargo, en algunos casos, los cebadores pueden comprender análogos de nucleótidos. Numerosos análogos de nucleótidos son conocidos para la persona experta e incluyen derivados, en donde un azúcar es modificado, como en derivados de 2'-O-metil, 2'-desoxi-2'-fluoro, y 2',3'-didesoxinucleósido, análogos de ácido nucleico basados en otros esqueletos de azúcar, tal como treosa, ácido nucleico bloqueado (LNA por sus siglas en inglés), derivados de LNA, ácidos péptidonucleico (PNA por sus siglas en inglés), ácido glicolnucleico (GNA por sus siglas en inglés), ácido treosanucleico (TNA por sus siglas en inglés), azúcares bicíclicos, o hexosa, azúcares de glicerol y glicol, análogos de ácido nucleico basados en esqueletos no iónicos, o ácidos nucleico y sus análogos en topologías no-lineales, tales como dendrímeros, estructuras en peine, y nanoestructuras.

Los cebadores pueden estar también ligados a diversas etiquetas (por ejemplo etiquetas fluorescentes, etiqueta funcionalizadas o etiquetas de unión), las que pueden opcionalmente estar unidas a sus extremos, a azúcares, o a nucleobases.

Los cebadores pueden ser preparados mediante una variedad de métodos, incluyendo –pero no limitado a– clonar las secuencias apropiadas y dirigir la síntesis química utilizando métodos bien conocidos en el arte [Narang et al., *Methods Enzymol.* 68:90 (1979); Brown et al., *Methods Enzymol.* 68:109 (1979)]. Los cebadores pueden también ser obtenidos a partir de proveedores comerciales.

El cebador directo y el cebador inverso pueden tener una temperatura de fusión idéntica o una temperatura de fusión similar, por ejemplo una diferencia de temperatura a de fusión de $\pm 5^\circ\text{C}$. Las longitudes de los cebadores pueden ser extendidas o acortadas en el(los) extremo(s) 5' y/o 3' para producir un conjunto de cebadores con las temperaturas de fusión deseadas. En concordancia, uno de los cebadores de un par de cebadores puede ser más largo que el otro cebador.

- Los cebadores pueden ser diseñados en base a la temperatura de fusión. Una ecuación para determinar la temperatura de fusión de cebadores más pequeños que 25 pb es conocida como la Regla Wallace [$T_d = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$]. En ésta, T_d es la temperatura a una concentración particular de sal a la cual 50% de un oligonucleótido y su complemento perfecto de unión a filtro están en una conformación de dúplex. Típicamente, T_d es determinada en NaCl 0,9 M. Sin embargo, otras consideraciones son también relevantes cuando se diseña un cebador, por ejemplo, su estructura predicha secundaria. Están disponibles diversos programas y servicios on-line para el diseño de cebadores.
- En una forma de realización, el conjunto de cebadores puede ser diseñado de un modo, en donde los cebadores específicamente son capaces de la amplificación de la secuencia diana que comprende la mutación en el NOI, pero no son capaces de amplificar la secuencia diana que comprende el NOI de referencia. Esto puede, por ejemplo, lograrse mediante el diseño del cebador directo de modo que comprenda una secuencia idéntica a el(los) NOI(s) que comprende(n) la(s) mutación(es), y/o esto puede hacerse diseñando el cebador inverso de modo que comprenda una o más secuencias complementarias al NOI que comprende la(s) mutación(es).
- En otras formas de realización, el conjunto de cebadores puede ser diseñado de maneras, en donde los cebadores específicamente son capaces de la amplificación de la secuencia diana que comprende el NOI de referencia, pero no es capaz de amplificar la secuencia diana que comprende la(s) mutación(es) en el(los) NOI(s). Esto puede, por ejemplo, lograrse diseñando el cebador directo tal que comprenda una secuencia idéntica al NOI de referencia, y/o diseñando el cebador inverso que comprende una secuencia complementaria al NOI de referencia.
- Sin embargo, en formas de realización preferidas de la invención, los conjuntos de cebadores son capaces de amplificar ambas la secuencia diana que comprende la(s) mutación(es), y la secuencia diana que comprende el NOI de referencia.
- Es de destacar que los métodos de la invención comprenden amplificaciones por PCR con más de un conjunto de cebadores, por ejemplo 2 conjuntos de cebadores, tal como 3 conjuntos de cebadores, por ejemplo en el rango de 2 a 10 conjuntos de cebadores. Así, cada amplificación por PCR puede comprender varios conjuntos de cebadores que flanquean diferentes secuencias diana. Esto permite la detección de más de una mutación diferente durante una amplificación por PCR.

Detección de producto(s) de PCR

Los métodos de la invención comprenden al menos dos etapas de detección de producto(s) de amplificación que comprende(n) secuencia(s) diana que comprenden(n) mutación(es) en NOI(s) de interés. El(los) producto(s) de amplificación por PCR puede(n) ser detectado(s) mediante cualquier medio útil.

5 Como se describe anteriormente, dicha(s) mutación(es) pueden ser sustituciones, deleciones y/o inserciones, involucrando desde solamente uno o unos pocos nucleótidos hasta un gran número de nucleótidos. Así, la detección puede estar adaptada a la mutación particular especificada mediante el NOI.

10 En algunas formas de realización, el conjunto de cebadores es diseñado de un modo, en donde los cebadores son específicamente capaces de amplificar la secuencia diana que comprende la(s) mutación(es) en el(los) NOI(s), pero no son capaces de la amplificación de la secuencia diana que comprende el NOI de referencia. En otras formas de realización, el conjunto de cebadores puede ser diseñado de un modo, en donde éstos específicamente son capaces de amplificar la secuencia diana que
15 comprende el NOI de referencia, aunque no de la secuencia diana que comprende la(s) mutación(es) en el(los) NOI(s). En tales formas de realización, la detección puede simplemente estar basada en la detección de la presencia o ausencia de un producto de amplificación por PCR. Esto puede, en particular, ser el caso en formas de realización de la invención, en donde la mutación es una mutación de un gran
20 número de NOIs.

En formas de realización preferidas, los productos de amplificación por PCR son detectados con el auxilio de sonda(s) para detección. Esto puede ser, en particular el caso cuando la(s) mutación(es) es la mutación de un número más pequeño de NOI(s), por ejemplo una o más mutaciones puntuales.

25 La sonda para detección puede ser un oligonucleótido que comprende una secuencia que es idéntica al NOI que comprende la mutación. En adición, dicha sonda comprende también usualmente secuencias idénticas a las regiones de la secuencia diana que flanquea el NOI. De modo similar, la sonda para detección puede ser un oligonucleótido que comprende una secuencia que es complementaria al NOI que
30 comprende la mutación, y en adición dicha sonda puede también comprender secuencias complementarias a las regiones de la secuencia diana que flanquean el NOI. Dichas regiones que flanquean el NOI pueden ser la(s) secuencia(s) inmediatamente 5' y/o 3' de el(los) NOI(s), respectivamente. Tales sondas preferiblemente hibridarán a los productos de amplificación por PCR que comprenden

la mutación en el NOI, pero no a los productos de amplificación por PCR que comprenden el NOI de referencia. En la presente, tales sondas para detección son también referidas como “sondas para detección de mutantes”. La sonda para detección de mutantes típicamente comprende nucleótidos en un rango de 10 a 30.

5 En particular, la sonda para detección de mutantes puede comprender una secuencia consecutiva en el rango de 10 a 30 nucleótidos idénticos, o complementarios, a la secuencia diana que comprende la mutación en el NOI.

La sonda para detección también puede ser un oligonucleótido que comprende una secuencia, que es idéntica a l NOI de referencia. Además, dicha sonda normalmente
10 también comprende secuencias idénticas a las regiones de la secuencia diana que flanquean el NOI. De manera similar, la sonda para detección puede ser un oligonucleótido que comprende una secuencia que es complementaria al NOI de referencia, y dicha sonda puede además comprender también secuencias complementarias a las regiones de la secuencia diana que flanquean el NOI. Dichas
15 sondas se hibridarán preferiblemente a los productos de amplificación por PCR que comprenden el NOI de referencia, pero no a estos productos de amplificación que comprenden la mutación en el NOI. Dichas sondas para detección también son referidas como “sondas para detección de referencia” en la presente. La sonda para detección de referencia típicamente comprende en el rango de 10 a 30 nucleótidos.
20 en particular la sonda para detección de referencia puede comprender una secuencia consecutiva en el rango de 10 a 30 nucleótidos idénticos o complementarios a la secuencia diana que comprende el NOI de referencia.

En algunas formas de realización, los reactivos para PCR comprenden un conjunto de sondas que consisten en una sonda para detección de mutantes y una sonda para
25 detección de referencia. El “conjunto de sondas” es preferiblemente capaz de competir por el(los) sitio(s) de unión a el(los) NOI(s) cuando es agregado a una amplificación por PCR junto con un ácido nucleico que comprende la secuencia diana, reactivos para PCR y el conjunto de cebadores bajo condiciones que permiten la amplificación de dicha secuencia diana. Como se destacó anteriormente, las sondas
30 para detección son típicamente oligonucleótidos. En particular, pueden ser tramos cortos de nucleótidos de ADN de hebra simple. Las sondas para detección pueden estar asociadas con, o aún ligadas covalentemente a, medios detectables –incluyendo, pero no limitados a, compuestos reporteros, colorantes, radioactivos, compuestos bioluminiscentes, compuestos fluorescentes, y pares de fluoróforo/secuestrantes.

En algunas formas de realización el nucleótido más 5' de la sonda para detección no es G. De este modo, la sonda para detección de mutación puede comprender un oligonucleótido, en donde el nucleótido más 5' no es G. De modo similar, la sonda para detección de referencia puede comprender un oligonucleótido, en donde el nucleótido más 5' no es G.

Los métodos de la invención pueden comprender utilizar ambas, una sonda para detección de mutantes y una sonda para detección de referencia. En tales casos, preferiblemente, las sondas están marcadas diferencialmente, por ejemplo de modo que una de las sondas está asociada con, o covalentemente ligada a, medios detectables, mientras que la otra no. Es posible también que ambas sondas estén asociadas con, o covalentemente ligadas a, medios detectables, en donde dichos medios detectables son diferentes.

En una forma de realización, la sonda para detección de referencia está marcada con un fluoróforo en el extremo 5' y con un secuestrante en el extremo 3'. Dichos fluoróforo y secuestrante pueden, por ejemplo, ser HEX y Black-Hole Quencher, respectivamente. En una forma de realización, la sonda para detección de mutantes está marcada con un fluoróforo en el extremo 5' y con un secuestrante en el extremo 3'. Dicho fluoróforo y secuestrante pueden por ejemplo, ser FAM y Black-Hole Quencher, respectivamente.

Las reacciones por PCR pueden comprender una cantidad similar de una sonda para detección de mutantes y una sonda para detección de tipo salvaje. Sin embargo en algunas formas de realización puede preferirse emplear un exceso de sonda para detección de mutantes. Este puede ser en particular el caso para detectar producto(s) de PCR después de la amplificación por PCR de un super-conjunto. En tales casos, las reacciones pueden comprender al menos 2 veces, más preferiblemente al menos 4 veces de exceso de sonda para detección de mutantes comparado con la sonda para detección de referencia.

En algunas formas de realización, la sonda para detección es una sonda TaqMan® (Heid et. al, 1996), la cual toma la ventaja de la actividad de exonucleasa 5' de una polimerasa de ácido nucleico. Esto es porque los reactivos para PCR comprenden preferiblemente una polimerasa de ácido nucleico con actividad de exonucleasa 5' (por ejemplo polimerasa Taq). Típicamente, la sonda TaqMan® puede ser una sonda para detección de mutantes, como se describe anteriormente, o una sonda para detección de referencia, como se describe anteriormente, ligada covalentemente a un par

fluoróforo/secuestrante. De este modo, la sonda puede contener un fluoróforo, usualmente en o cerca de la base 5'. Adicionalmente, las sondas TaqMan® pueden contener un secuestrante, el cual puede estar en o cerca de la base 3', y capaz de secuestrar la fluorescencia de dicho fluoróforo [ver Tyagi et al., Nature Biotechnology 5 16:49-53 (1998)]. Cuando es irradiado, el fluoróforo transfiere energía al secuestrante cercano antes de fluorescer [Förster or fluorescence resonance energy transfer (FRET)]. De este modo, una proximidad cercana al fluoróforo y secuestrante puede evitar emisión de cualquier fluorescencia, mientras la sonda está intacta. Sin embargo, cuando la sonda TaqMan® hibridiza con una región interna de la secuencia 10 diana y la polimerasa replica un molde en la cual está unida una sonda TaqMan®, su actividad exonucleasa 5' puede escindir la sonda. Esta serie de eventos cancela la funcionalidad de neutralización, es decir no hay FRET, y el fluoróforo comienza a emitir fluorescencia, la cual puede ser medida mediante cualquier medio útil.

De modo notable, como se enfatizó anteriormente, está también comprendido dentro 15 de la invención que los métodos puedan ser utilizados para identificar más de una mutación diferente. Esto puede lograrse utilizando una pluralidad de conjuntos de cebadores como se describió anteriormente. Sin embargo, esto puede lograrse utilizando diversas sondas para detección diferentes. Así, en una forma de realización, los métodos pueden ser utilizados para identificar más de una mutación 20 diferente dentro de NOIs en la secuencia diana. En tales formas de realización, los reactivos para PCR pueden comprender una sonda para detección de referencia y varias sondas para detección de mutaciones, en donde cada sonda para detección de mutaciones comprende un oligonucleótido que tiene una secuencia idéntica a, o complementaria a, una de las mutaciones. Preferiblemente, la sonda para detección 25 de referencia y las sondas para detección de mutaciones están ligadas a diferentes medios de detección. Todas las sondas para detección de mutantes pueden estar ligadas a los mismos medios de detección, o a medios de detección similares o a medios de detección diferentes.

En algunos casos, la sonda para detección es una baliza molecular (MB por sus siglas 30 en inglés), es decir una sonda que comprende secuencias complementarias capaces de auto-hibridación (también referidas como "tallo"), dando por resultado una estructura de "bucle en horquilla". El bucle de la MB puede contener secuencias complementarias a, o idénticas a, (el)los NOI(s), ya sea NOI(s) mutante(s) o de referencia. Más aún, la MB típicamente comprende un fluoróforo y un secuestrante 35 posicionado en cada extremo de la MB, de modo que ellos están próximos uno al otro,

cuando la sonda se hibridiza sobre sí misma. La MB puede ser una sonda para detección de mutantes como se describió anteriormente o una sonda para detección de referencia como se describió anteriormente, ligada covalentemente a un par fluoróforo/secuestrante, y a secuencia(s) tallo que proveen las regiones complementarias de la MB. Detalles adicionales con relación a los métodos estándar de preparación y uso de MBs están bien establecidos en la literatura y las MBs están disponibles a partir de un número de proveedores comerciales de reactivos.

En algunos casos, es utilizado un cebador/sonda; en algunos casos el cebador/sonda es una sonda Scorpions™, la cual puede proveer un mecanismo de detección tallo-bucle en base a FRET similar a MB, excepto que la sonda tiene también un segmento adherido que sirve como cebador directo o inverso (ver Whitcombe et al. Nature Biotechnol. 1999, August 17(8): 804-7; U.S. Pat. No. 6.326.145). Una sonda Scorpions™ puede mantener una configuración tallo-bucle en el estado hibridado, con el fluoróforo secuestrado. Una sonda Scorpions™ puede tener una estructura en multicomponente más larga, por ejemplo un fluoróforo 5', por consiguiente una sección tallo-bucle específica de diana, luego un secuestrante, luego un bloqueador [por ejemplo hexaetilenglicol (HEG)], y finalmente una secuencia de cebador 3'. Tal bloqueador puede evitar la extensión inversa del producto sobre la sonda.

En algunos casos, un cebador/sonda es una sonda Sunrise™, la cual comprende un cebador adosado a una sonda de horquilla que es extendida durante la amplificación. Este arreglo puede separar un secuestrante interno de un fluoróforo 5' terminal (Nazarenko et al., Nucl. Acids Res. 1997, 25: 2516-2521).

La sonda para detección puede tener cualquier extensión útil, por ejemplo en el rango de 10 a 60 nucleótidos de longitud. La sonda oligonucleotídica puede también estar en el rango de 10 a 30 nucleótidos de longitud. La secuencia y longitud precisas de una sonda oligonucleotídica puede depender en parte de la naturaleza del polinucleótido diana al cual se une. El sitio de unión y la longitud pueden ser variado para lograr la hibridación apropiada y las propiedades para una situación particular. Por ejemplo, la sonda para detección puede ser diseñada para tener una temperatura de fusión en el mismo rango que el cebador directo y/o el cebador inverso, por ejemplo, dentro de $\pm 10^{\circ}\text{C}$, tal como dentro de $\pm 5^{\circ}\text{C}$.

El nucleótido 3' terminal de la(s) sonda(s) para detección puede ser bloqueado o convertido en incapaz de extenderse mediante una polimerasa de ácido nucleico. Tal bloqueo puede ser convenientemente llevado a cabo mediante la adhesión de medios

detectables, ya sea a través de un fluoróforo o un secuestrante a la base 3' terminal de la sonda oligonucleotídica mediante una fracción molecular ligante.

Hay una gran cantidad de orientación práctica en la literatura que describe pares útiles de fluoróforos/secuestrantes, incluyendo métodos para seleccionar pares de fluoróforo/secuestrante, como se ejemplifica en la presente a continuación:

- Clegg, Meth. Enzymol., 211: 353-388 (1992); Wo et al., Anal. Biochem., 218: 1-13 (1994); Pesce et al., editores, Fluorescence Spectroscopy (Marcel Dekker, Nueva York, 1971); White et al., Fluorescence Analysis: A Practical Approach (Marcel Dekker, Nueva York, 1970); y lo similar;
 - La literatura también incluye referencias que proveen listas exhaustivas de moléculas fluorescentes y cromogénicas y sus propiedades ópticas relevantes para elegir pares reportero-secuestrante, por ejemplo Berlman, Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules, 2da Edición (Academic Press, Nueva York, 1971); Griffiths, Colour and Constitution of Organic Molecules (Academic Press, Nueva York, 1976); Bishop, editor, Indicators (Pergamon Press, Oxford, 1972); Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (Molecular Probes, Eugene, 1992) Pringsheim, Fluorescence and Phosphorescence (Interscience Publishers, Nueva York, 1949); y lo similar.
 - Adicionalmente, existe una extensa guía en la literatura para derivatizar moléculas reporteras y secuestrantes para la unión covalente por medio de grupos reactivos comunes que pueden ser agregados a un oligonucleótido, como se ejemplifica en las siguientes referencias: Haugland (citado anteriormente); Ullman et al., U.S. Pat. No. 3.996.345; Khanna et al., U.S. Pat. No. 4.351.760; y lo similar.
- Los fluoróforos y secuestrantes pueden, por ejemplo, ser seleccionados de colorantes fluoresceína y rodamina. Estos colorantes, combinados con metodologías de unión apropiadas para la unión a oligonucleótidos se describen en muchas referencias, por ejemplo Khanna et al. (citada anteriormente); Marshall, Histochemical J., 7:299-303 (1975); Menchen et al., U.S. Pat. No. 5.188.934; Menchen et al., Solicitud de Patente Europea 87310256.0; y Bergot et al., Solicitud PCT Internacional PCT/US90/05565. Los últimos cuatro documentos se incorporan a la presente como referencia.

Un par fluoróforo/neutralizador puede utilizar un fluoróforo, tal como EDANS o fluoresceína, por ejemplo en el extremo 5' y un secuestrante tal como Dabcyl, por ejemplo en el extremo 3'.

La detección de producto(s) de amplificación por PCR puede involucrar una etapa de comparación de la señal obtenida en la amplificación por PCR que comprende una muestra de ADN_g dada con la señal obtenida en una amplificación por PCR control. La señal puede referirse típicamente a los medios detectables asociados con una sonda para detección de mutantes y/o una sonda para detección del tipo salvaje. Así, si dichas sondas están asociadas con un fluoróforo, la señal puede ser fluorescencia. La amplificación por PCR control puede ser una amplificación por PCR llevada a cabo bajo las mismas condiciones pero careciendo de una muestra de una muestra de ADN_g –es decir dicha amplificación por PCR control puede carecer de un molde de ADN_g, o puede contener solamente un ADN control que comprende solamente la secuencia diana de referencia, por ejemplo ADN_g de tipo salvaje. En algunas formas de realización, cualquier señal que es más fuerte que la señal a partir de la amplificación por PCR control puede ser considerada una señal positiva, es decir una señal que indica la presencia de una secuencia diana que comprende una o más mutaciones en el NOI.

En una forma de realización cualquier señal que está por encima de un umbral dado puede ser considerada una señal positiva. El umbral puede ser determinado mediante cualquier modalidad útil, típicamente mediante el uso de un programa adecuado, por ejemplo el Software QX200TM Droplet Reader y QuantasoftTM disponible a partir de Biorad.

En formas de realización de la invención, donde pueden emplearse sondas para detección de mutación de referencia y de mutaciones, puede ser determinada la abundancia fraccional entre la señal obtenida a partir de la sonda para detección de mutación y la sonda para detección de referencia, y ser utilizada para evaluar la presencia de un producto de PCR. La abundancia fraccional puede ser determinada como: [Señal de ("sonda para detección de mutantes")] dividido por [Señales de ("sonda para detección de referencia" + "sonda para detección de mutantes")].

Se puede asumir, por ejemplo, que una muestra puede contener ADN diana que comprende la mutación en el NOI, siempre que en una comparación con una amplificación por PCR control est{e caracterizada por:

- 1) Una aumentada abundancia fraccional, y/o;
- 2) Aumentada concentración de gotas de mutantes, y/o;
- 3) Aumentado número de eventos mutantes en una escala de 50% o superior por encima del promedio.

Las gotas de mutantes pueden ser gotas que dan una señal positiva a partir de la sonda para detección de mutantes. En la presente, "evento mutante" iguala al número de gotas de mutante.

5 **División de un subconjunto en subconjuntos secundarios**

Una vez que un subconjunto que comprende un organismo, o partes reproductivas del mismo, que porta la mutación en el NOI ha sido identificado, entonces los métodos de la invención comprenden una etapa de división de dicho subconjunto en una pluralidad de subconjuntos secundarios.

10

Como se describe anteriormente, parte del subconjunto puede haber sido utilizado para preparar una muestra de ADN_g. Así, solamente la parte remanente del subconjunto está disponible para división en subconjuntos secundarios. También está comprendido dentro de la invención que el subconjunto sea dividido en varias fracciones, y que solamente una fracción sea utilizada para preparar el subconjunto secundario.

15

Cada subconjunto secundario puede comprender solamente un organismo o parte(s) reproductiva(s) del mismo. Alternativamente, cada subconjunto secundario puede comprender una pluralidad de organismos o partes reproductivas de los mismos. Por ejemplo, cada subconjunto secundario puede comprender una pluralidad de organismos, o partes reproductivas de los mismos, que representan una pluralidad de genotipos.

20

Normalmente, el subconjunto, o una fracción del mismo, está dividido en una pluralidad de subconjuntos secundarios, preferiblemente en al menos 5 subconjuntos secundarios, más preferiblemente en al menos 10 subconjuntos secundarios, incluso más preferiblemente en al menos 30 subconjuntos secundarios, aún más preferiblemente en al menos 50 subconjuntos secundarios, incluso más preferiblemente en al menos 70 subconjuntos secundarios, aún más preferiblemente en al menos 90 subconjuntos secundarios. En principio, no hay límite superior para el número de subconjuntos secundarios. No obstante, el conjunto está típicamente dividido en a lo sumo 50.000, tal como, a lo sumo 25.000, por ejemplo a lo sumo 10.000 subconjuntos secundarios.

30

35

Cada subconjunto secundario puede comprender uno o una pluralidad de organismos, o partes reproductivas de los mismos, que representan una pluralidad de genotipos. Preferiblemente, cada subconjunto secundario comprende en el rango de 1 a 100, preferiblemente en el rango de 1 a 50, incluso más preferiblemente en el rango de 1 a 20 organismos, o partes reproductivas de los mismos, con diferentes genotipos.

Los subconjuntos secundarios pueden ser ordenados de cualquier modo deseable. En algunas formas de realización, un subconjunto secundario comprende solamente un número limitado de organismos o partes reproductivas de los mismos.

En otras formas de realización, el subconjunto secundario comprende una pluralidad de organismos del mismo genotipo. Esto puede asegurarse sometiendo al subconjunto secundario a una etapa de reproducción. También es posible que la etapa de reproducción sea llevada a cabo simultáneamente con la etapa de división del subconjunto en subconjuntos secundarios, de una manera que permita a la progenie de un único organismo, o parte reproductiva del mismo, terminar en el mismo subconjunto secundario.

Los métodos de la invención comprenden la preparación de una o más muestras de ADN_g a partir del subconjunto secundario. En formas de realización de la invención, donde el subconjunto secundario solamente comprende uno o unos pocos organismos de cada genotipo, o partes reproductivas de los mismos, entonces la muestra de ADN_g es típicamente preparada a partir de una muestra de cada organismo, o parte reproductiva de los mismos, por ej., como se describe en la presente anteriormente en la sección "Preparación de muestras de ADN".

En formas de realización donde el subconjunto secundario comprende una pluralidad de organismos de genotipos individuales, o partes reproductivas de los mismos, de cada genotipo, entonces la muestra de ADN_g puede ser preparada a partir de una fracción del subconjunto secundario.

Un ejemplo de un método para dividir el subconjunto en subconjuntos secundarios se provee en la Figura 1C, donde las primeras etapas de dicha Figura ilustran la división del subconjunto, y la obtención de una muestra de ADN_g.

En formas de realización de la invención, donde la especie es un organismo unicelular, entonces los subconjuntos secundarios pueden, por ejemplo, ser preparados como sigue:

- 5 – Luego de la identificación de un subconjunto que comprende la mutación en el NOI, se puede dejar que cada organismo unicelular de dicho subconjunto se multiplique de un modo separado, de modo que cada organismo unicelular origine un cultivo clonal. Esto puede realizarse cultivando colonias de cada clon sobre un medio sólido o cultivando cada clon en espacios separados con medio líquido, por ej., en microtubos o en pocillos de placas para microtítulo. El subconjunto secundario
10 puede formarse mediante combinación de organismos unicelulares a partir de una pluralidad de clones;
- Los organismos unicelulares pueden ser divididos en subconjuntos secundarios inmediatamente luego de la identificación del subconjunto de interés, y se puede dejar que cada subconjunto secundario se reproduzca.

15

En una forma de realización, los subconjuntos secundarios son preparados mediante las siguientes etapas:

- i) Proveer un subconjunto que comprende la(s) mutación(es) en el(los) NOI(s);
- ii) Propagar algunos, o todos los organismos, de dicho subconjunto de una manera
20 clonal para obtener cultivos clonales;
- iii) Combinar una fracción de organismos a partir de una pluralidad de dichos cultivos clonales para obtener subconjuntos secundarios.

25 Como se describe anteriormente, las muestras de ADN_g pueden prepararse a partir de una parte del organismo de un subconjunto, mientras que el resto de los organismos de un subconjunto puede almacenarse. Cuando los organismos son unicelulares, entonces dichos organismos pueden ser congelados para almacenamiento. En dichas formas de realización, la etapa i) anterior puede comprender una etapa de reviviscencia de los organismos mediante incubación en medio de cultivo a una
30 temperatura adecuada para el crecimiento de dicho organismo. Preferiblemente, dicha etapa de reviviscencia comprende solamente reproducción mínima.

La etapa ii) mencionada anteriormente puede, por ejemplo, ser llevada a cabo mediante plaqueo de los organismos sobre un medio sólido a un título lo

suficientemente bajo para separar espacialmente los organismos entre sí sobre dicho medio.

5 La etapa iii) mencionada anteriormente puede comprender combinar una fracción en el rango de 10 a 1000, preferiblemente en el rango de 10 a 500, más preferiblemente en el rango de 10 a 100, por ej., en el rango de 30 a 70 cultivos clonales individuales. Puede preferirse obtener dos copias de cada subconjunto secundario. Esto puede realizarse combinando dichas fracciones como se mencionó anteriormente, y luego dividiendo cada subconjunto secundario en al menos 2 partes. Alternativamente, dos
10 copias de cada subconjunto secundario pueden prepararse desde el comienzo combinando fracciones de los mismos cultivos clonales en dos contenedores diferentes. Típicamente, una parte del subconjunto es utilizada para preparar una muestra de ADNg, mientras que la otra es almacenada (por ej., congelada en presencia de un crioprotector). Antes de preparar una muestra de ADNg y/o antes del
15 almacenamiento, los subconjuntos secundarios pueden ser sometidos a una etapa de reproducción, por ej., a incubación en medio de cultivo a una temperatura útil para el crecimiento del organismo.

En formas de realización de la invención, donde la especie es una planta, el
20 subconjunto secundario puede prepararse mediante obtención de una muestra de cada semilla dentro de un subconjunto, y combinando las muestras de un número predeterminado de semillas. En dichas formas de realización, es importante ordenar los subconjuntos secundarios, de modo que las semillas de un subconjunto secundario y las muestras de dicho subconjunto secundario puedan ser identificadas. Así, en una
25 forma de realización de la invención, los métodos comprenden las etapas de:

- Proveer un subconjunto que comprende una pluralidad de semillas de una planta, por ej., granos de cereal, en donde dicho subconjunto comprende la mutación del NOI.
- Dividir las semillas de dicho subconjunto en subconjuntos secundarios, cada uno
30 comprendiendo al menos una semilla, por ej., en el rango de 1 a 100 semillas.
- Obtener una muestra de cada semilla de los subconjuntos secundarios de un modo que queden lo suficientemente intactas como para desarrollarse en una planta, y combinar todas las muestras de todas las semillas de cada subconjunto secundario.
- Preparar una muestra de ADNg a partir de dichas muestras combinadas.

35

Las etapas delineadas anteriormente son ilustradas en la parte superior de la Figura 2D, utilizando granos de cereal como ejemplo. Así, el método puede comprender las etapas ilustradas en la Figura 2D. También, las etapas ilustradas en la Figura 2D pueden ser llevadas a cabo utilizando cualquier planta de flor, de manera concordante, no limitado a cereales. Adicionalmente, las etapas ilustradas en la Figura 2D pueden ser llevadas a cabo utilizando cualquier número de plantas mutadas (los números provistos en la Figura 2D representan meramente un ejemplo).

Un ejemplo de un método para dividir un subconjunto en subconjuntos secundarios se describe a continuación en la presente en el WS4.

Identificación de subconjuntos secundarios

Los métodos de la invención comprenden las etapas de dividir un subconjunto de organismos, o partes reproductivas de los mismos, que comprenden una o más mutaciones en el(los) NOI(s), en subconjuntos secundarios –seguido de una etapa de identificación de un subconjunto secundario que comprende un organismo, o partes reproductivas del mismo, que comprende la(s) mutación(es) especificada(s) por el(los) NOI(s).

La identificación de dicho subconjunto secundario puede comprender las etapas de:

- a) Preparar muestras de ADN_g, cada una comprendiendo ADN_g de cada genotipo dentro de un subconjunto secundario, lo que –por ejemplo– puede ser llevado a cabo como se describe en la presente anteriormente en la sección "Preparación de muestras de ADN";
- b) Llevar a cabo una pluralidad de amplificaciones por PCR para amplificar la secuencia diana;
- c) Detectar el(los) producto(s) de amplificación por PCR que comprende(n) la(s) mutación(es) en el(los) NOI(s), identificando de esta forma dicho(s) subconjunto(s) secundario(s), lo que –por ejemplo– puede realizarse como se describe en la presente a continuación en la sección "Detección de producto(s) de amplificación por PCR".

La amplificación por PCR descrita en la presente anteriormente puede ser cualquier amplificación por PCR de la secuencia diana. Así, dicha amplificación por PCR puede ser una amplificación por PCR convencional, o puede ser una amplificación por PCR

que comprende una pluralidad de amplificaciones por PCR compartimentadas, como se describe en la presente anteriormente.

5 Cada una de dichas amplificaciones por PCR, en general, comprende la muestra de ADN_g de un subconjunto secundario, un conjunto de cebadores que flanquean la secuencia diana y reactivos para PCR. Los cebadores pueden ser cualquiera de los cebadores descritos en la presente anteriormente en la sección "Cebadores que flanquean la secuencia diana". Los reactivos para PCR pueden ser cualquiera de los reactivos para PCR descritos en la presente anteriormente en la sección "Reactivos para PCR". En particular, los reactivos para PCR comprenden nucleótidos y una polimerasa de ácido nucleico. Preferiblemente, los reactivos para PCR también comprenden una o más sondas para detección, por ej., una sonda para detección de mutaciones y/o una sonda para detección de referencia, como se describe en la presente anteriormente en la sección "Detección de producto(s) de PCR".

15 El subconjunto secundario puede, por ejemplo, ser directamente identificado siempre que el(los) producto(s) de amplificación por PCR que comprende(n) la mutación en el(los) NOI(s) puedan ser directamente detectados luego, o durante, el proceso de amplificación por PCR. Esto, por ejemplo, puede realizarse si la amplificación por PCR comprende medios para detección, lo que origina una señal detectable siempre que el(los) producto(s) de amplificación por PCR comprenda(n) la secuencia diana que comprende la(s) mutación(es) en el(los) NOI(s). Dichos medios para detección están descritos en más detalle anteriormente en la sección "Detección de producto(s) de amplificación por PCR", y pueden incluir, por ejemplo, sondas para detección de mutación.

25 Un ejemplo de un método para identificar un subconjunto secundario que comprende dicha(s) mutación(es) está ilustrado en la parte inferior de la Figura 1C, mostrando las siguientes etapas:

- 30
- Proveer un subconjunto secundario;
 - Preparar una muestra a partir de una parte de dicho subconjunto secundario;
 - Preparar una muestra de ADN_g a partir de dicha muestra;
 - Preparar amplificaciones por PCR con todas las muestras individuales de ADN_g de todos los subconjuntos secundarios, por ejemplo en pocillos individuales de una placa, por ej., en placas para microtítulo;
- 35

- Detectar la presencia de la secuencia diana que comprende la mutación en el(los) NOI(s).

5 Un ejemplo más específico de un método para la identificación de un subconjunto secundario se muestra en la Figura 2D. En este ejemplo, la especie en cuestión es una planta de cereal. Los números específicos provistos en la Figura 2D son ejemplos solamente, y la persona experta entenderá que el método puede ser llevado a cabo utilizando otro número de granos.

10 Es destacable que la identificación de un subconjunto secundario que comprende la(s) mutación(es) específica(s) de NOI(s) puede ser llevada a cabo como se indica en WS4 en la presente a continuación.

Identificación de organismo

15 Una vez que se ha identificado un subconjunto secundario que comprende un organismo, o una parte reproductiva del mismo, el método comprende la identificación de un organismo que comprende la(s) mutación(es) del/de los NOI(s).

20 Esto puede llevarse a cabo de varias maneras, dependiendo de la especie y de los subconjuntos secundarios.

25 En formas de realización de la invención, donde el subconjunto secundario solamente comprende un organismo, o partes reproductivas del mismo, entonces el organismo, o parte(s) reproductiva(s) del mismo, es identificado tan pronto como se identifica el subconjunto secundario relevante.

30 En formas de realización de la invención, donde el subconjunto secundario comprende más de un organismo, o parte(s) reproductiva(s) de los mismos, entonces los métodos típicamente comprenden una etapa de identificar el(los) organismo(s). Previo a ello, de manera simultánea con ello, o posteriormente a la identificación de los organismos, o partes reproductivas de los mismos, el subconjunto secundario que comprende la(s) mutación(es) del/de los NOI(s) puede ser sometido a una etapa de reproducción.

35 En formas de realización de la invención, donde la especie es un organismo unicelular, dicha etapa de reproducción puede ser una expansión clonal de los organismos, por

ej., mediante clonación de cada uno de los organismos del subconjunto secundario de una manera espacialmente separada. Así, el método puede comprender las etapas de:

- i) Proveer un subconjunto secundario que comprende la mutación en el NOI;
 - 5 ii) Reproducir algunos o todos los organismos de dicho subconjunto de una manera clonal;
 - iii) Determinar cuáles clones comprenden organismos que comprenden la mutación en el NOI.
- 10 La etapa ii) mencionada anteriormente, puede ser llevada a cabo, por ejemplo, mediante plaqueo de los organismos sobre un medio sólido a un título lo suficientemente bajo para separar espacialmente cada organismo sobre dicho medio sólido.
- 15 La etapa iii) anterior puede involucrar preparar una muestra de ADN_g a partir de una fracción de cada clon y llevar a cabo una amplificación por PCR, por ej., una amplificación por PCR esencialmente como se describe en la presente anteriormente en la sección "Identificación de un subconjunto secundario".
- 20 En formas de realización de la invención, donde la especie es una planta, y el subconjunto secundario comprende semillas de dicha planta, los métodos pueden comprender las etapas de:
- A. Identificar un subconjunto secundario que comprende un organismo, o partes reproductivas del mismo, que comprende la(s) mutación(es) en el(los) NOI(s);
 - 25 B. Cultivar todas las semillas dentro de dicho subconjunto secundario para permitir la germinación, y opcionalmente, el crecimiento de plantas a partir de dicha semilla;
 - C. Obtener una muestra a partir de cada semilla germinada;
 - D. Ensayar dicha muestra en busca de la presencia de dicha(s) mutación(es) en el(los) NOI(s), donde dicho ensayo puede ser llevado a cabo mediante cualquier método,
 - 30 por ej., preparando una muestra de ADN_g a partir de dicha muestra y llevando a cabo una amplificación por PCR como se describe en la presente anteriormente,
- identificando de esta forma una planta que porta la(s) mutación(es) en el(los) NOI(s).

En la etapa B. anterior, pueden, por ejemplo, hacerse germinar dichas semillas y dejar que desarrollen en plántulas que comprenden raíces, tallos y hojas. En tales formas de realización, la muestra obtenida en la etapa C. puede, por ejemplo, ser una hoja, una raíz o partes de las mismas de dicha plántula, tales como secciones de las primeras hojas. Luego de que se ha obtenido la muestra, puede hacerse crecer la semilla germinada, o la plántula, hasta madurez. También está comprendido dentro de la invención hacer crecer las plantas hasta la madurez, en cuyo caso la muestra obtenida en la etapa C., por ejemplo, puede ser una hoja, una flor, una raíz, una semilla, un tallo o partes de los mismos.

10

Posteriormente a la identificación de un único organismo, o partes reproductivas del mismo, que comprende una o más mutaciones en el(los) NOI(s), dicho organismo, o partes reproductivas del mismo, serán –en general– sometidos a una o más etapas de reproducción a fin de obtener una pluralidad de organismos que comprenden la mutación.

15

En formas de realización de la invención, donde el organismo identificado es heterocigota con respecto a la mutación en cuestión, el método puede entonces comprender etapas de mejoramiento de dicho organismo hasta homocigosis con respecto a dicha mutación.

20

Luego de la identificación de un organismo que comprende la(s) mutación(es) en el(los) NOI(s), los métodos de la invención pueden comprender una etapa de mejoramiento adicional de dicho organismo de modo de preservar la(s) mutación(es) en el(los) NOI(s). Dicho mejoramiento puede ser llevado a cabo con el objeto de combinar el rasgo conferido por la(s) mutación(es) en el(los) NOI(s) con rasgos de otros organismos de la misma especie.

25

Los métodos también pueden comprender etapas adicionales de verificación de la presencia de la(s) mutación(es) en el(los) NOI(s). Por ejemplo, la secuencia diana –o un gen que comprende la secuencia diana– puede ser secuenciado en su totalidad.

30

Super-conjuntos

En una forma de realización de la invención, los métodos comprenden una etapa de identificación de un conjunto de subconjuntos, referidos en la presente como super-

35

conjuntos, que comprenden la(s) mutación(es) en el(los) NOI(s). De esa manera, se puede relevar un número muy grande de organismos potenciales, o partes reproductivas de los mismos, en busca de la presencia de la(s) mutación(es) en el(los) NOI(s). Dicha etapa se lleva a cabo preferiblemente luego de dividir el conjunto en subconjuntos, y preparar muestras de ADNg a partir de los subconjuntos, por ej., luego de la etapa c) de los métodos de la invención.

Así, los métodos pueden comprender las siguientes etapas llevadas a cabo luego de la etapa c):

- 10 – Preparar una fracción de cada muestra de ADNg a partir de cada subconjunto;
- Combinar una pluralidad de fracciones de subconjuntos en super-conjuntos, obteniendo de esta manera muestras de ADNg de super-conjuntos que comprenden ADNg de una pluralidad de subconjuntos;
- Llevar a cabo una pluralidad de amplificaciones por PCR cada una comprendiendo una muestra de ADNg de un super-conjunto, donde cada amplificación por PCR comprende una pluralidad de amplificaciones por PCR compartimentadas, cada una comprendiendo parte de dicha muestra de ADNg, un conjunto de cebadores que flanquean la secuencia diana y reactivos para PCR, amplificando de esta manera la secuencia diana, donde dicha PCR, por ejemplo, puede ser llevada a cabo como se describe en la presente a continuación en la sección "Amplificación por PCR en super-conjuntos";
- 20 – Detectar producto(s) de amplificación por PCR que comprende(n) secuencia(s) diana que comprende(n) la(s) mutación(es) en el(los) NOI(s), identificando de esta manera super-conjunto(s) que comprende(n) dicha(s) mutación(es), donde dicha etapa de detección puede ser llevada a cabo, por ejemplo, como se describe en la presente anteriormente en la sección "Detección de productos de PCR".

En algunas formas de realización puede preferirse enriquecer las muestras de ADNg de super-conjuntos. Esto puede ayudar en la detección específica de secuencia(s) diana que comprende(n) la(s) mutación(es) en el(los) NOI(s). La etapa de enriquecimiento puede comprender las etapas de:

- Proveer muestras de ADNg de super-conjuntos que comprenden ADNg de una pluralidad de subconjuntos como se describe anteriormente;
- Llevar a cabo amplificaciones por PCR comprendiendo cada una, una muestra de ADNg de un super-conjunto, donde cada amplificación por PCR comprende un

conjunto de cebadores que flanquean la secuencia diana, una sonda bloqueante y reactivos para PCR.

5 La amplificación por PCR llevada a cabo durante la etapa de enriquecimiento es típicamente una amplificación por PCR convencional y puede ser llevada a cabo, por ejemplo, como se describe en la presente a continuación en la sección “PCR”. Frecuentemente, esta PCR comprende un número de ciclos relativamente bajo, por ej., en el rango de 10 a 30, tal como en el rango de 15 a 25 ciclos de PCR.

10 La sonda bloqueante es típicamente una sonda diseñada para inhibir la amplificación de la secuencia diana que comprende el NOI de referencia. Así, la sonda bloqueante puede ser, por ejemplo, un oligonucleótido, el cual:

- no puede ser extendido en el extremo 3' por una ADN polimerasa;
 - preferencialmente, se une a la secuencia diana que comprende el NOI de
- 15 referencia o su secuencia complementaria a lo largo de la secuencia diana que comprende la mutación predeterminada del NOI.

La sonda bloqueante típicamente comprende en el rango de 10 a 30 nucleótidos. En particular, la sonda bloqueante puede comprender una secuencia consecutiva en el

20 rango de 10 a 30 nucleótidos idénticos, o complementarios, a la secuencia diana que comprende el NOI de referencia. Además, la sonda bloqueante típicamente está unida a un agente bloqueante, el cual inhibe la extensión de la sonda por parte de la ADN polimerasa.

25 Dicho agente bloqueante puede ser, por ejemplo, un resto molecular unido covalentemente al nucleótido más 3' de la sonda bloqueante. De hecho, la mayoría de las modificaciones 3' bloquearán la extensión. Por ejemplo, dicho agente bloqueante puede ser seleccionado a partir del grupo que consiste en espaciador 2',3'-didesoxiC, 3'ddC y 3' dT invertida. El agente bloqueante puede ser también una modificación del

30 grupo hidroxilo del extremo 3' por ej., con un grupo amino (por ej., un 3' amino) o un alquilo, por ej., un espaciador 3' C3. El agente bloqueante también puede ser una fosforilación del nucleótido 3'.

Una vez que se identifica un super-conjunto que comprende una o más mutaciones en

35 el(los) NOI(s), entonces pueden llevarse a cabo la etapa d) y las subsiguientes etapas.

No obstante, la etapa d) puede restringirse a preparar amplificaciones por PCR con muestras de ADNg de los subconjuntos contenidos en el super-conjunto.

5 La identificación de un super-conjunto también puede llevarse a cabo directamente luego de preparar los subconjuntos en la etapa b). En este caso, los métodos pueden comprender las siguientes etapas luego de la etapa b):

- Si los subconjuntos comprenden solamente unos pocos, por ej., solamente un organismo, o una parte reproductiva del mismo, de cada genotipo, entonces dichos subconjuntos pueden ser sometidos a una etapa de reproducción;
- 10 – Preparar una fracción de cada subconjunto, la cual representa cada genotipo dentro del subconjunto, donde la parte remanente del subconjunto también representa cada genotipo dentro del subconjunto;
- Combinar una pluralidad de fracciones en super-conjuntos, obteniendo de esta manera super-conjuntos que comprenden organismos, o partes reproductivas de
15 los mismos, a partir de una pluralidad de subconjuntos, donde los organismos, o partes reproductivas de los mismos, están solamente presentes en un super-conjunto;
- Preparar muestras de ADNg, cada una comprendiendo ADNg de cada genotipo dentro de un super-conjunto, lo cual –por ejemplo– puede llevarse a cabo como se describe en la presente anteriormente en la sección "Preparación de muestras de
20 ADN";
- Llevar a cabo una pluralidad de amplificaciones por PCR, cada una comprendiendo una muestra de ADNg de un super-conjunto, donde cada amplificación por PCR comprende una pluralidad de amplificaciones por PCR compartimentadas cada una comprendiendo parte de dicha muestra de ADNg, un conjunto de cebadores que
25 flanquean la secuencia diana y reactivos para PCR, amplificando de esta manera la secuencia diana –donde dicha PCR, por ejemplo, puede llevarse a cabo como se describe en la presente a continuación en la sección "Amplificación por PCR en super-conjuntos".
- 30 – Detectar el(los) producto(s) de amplificación por PCR que comprende(n) la(s) secuencia(s) diana que comprende(n) la(s) mutación(es) en el(los) NOI(s), identificando de esta manera super-conjunto(s) que comprende(n) dicha(s) mutación(es).

En dichas formas de realización, no es importante que las muestras de ADNg de los super-conjuntos estén preparadas de una manera que mantenga el potencial para la reproducción de los organismos de cada genotipo dentro de dicho super-conjunto. Esto es típicamente logrado porque cada super-conjunto contiene ADN de una cantidad de subconjuntos, y cada subconjunto comprende organismos (o partes reproductivas de los mismos) que representan cada genotipo dentro del subconjunto.

Una vez que se identifica un super-conjunto que comprende la(s) mutación(es) en el(los) NOI(s), entonces pueden llevarse a cabo la etapa c) y las etapas subsiguientes. No obstante, la etapa c) puede restringirse a preparar muestras de ADNg de los subconjuntos contenidos en el super-conjunto.

Puede prepararse cualquier número deseable de super-conjuntos, por ej., en el rango de 5 a 100, tal como en el rango de 5 a 50, por ej., en el rango de 5 a 20.

Un ejemplo de un método para identificar un super-conjunto está ilustrado en la Figura 1D. Otro ejemplo, donde la especie es un cereal está ilustrado en la Figura 2E. Se entiende que los números provistos en la Figura 2E son sólo ejemplos y que el método puede llevarse a cabo con otro número de granos, etc.

Un ejemplo no limitante para preparar e identificar un super-conjunto también está descrito en la presente a continuación en WS5.

Amplificación por PCR en super-conjuntos

Los métodos de la invención comprenden una etapa de llevar a cabo una pluralidad de amplificaciones por PCR, comprendiendo cada una una muestra de ADNg a partir de un super-conjunto, por ejemplo preparado como se describe en las secciones más arriba, en donde cada amplificación por PCR comprende una pluralidad de amplificaciones por PCR compartimentadas que comprende cada una una parte de dicha muestra de ADNg, un conjunto de cebadores que flanquean la secuencia diana y reactivos para PCR, amplificando de este modo la secuencia diana.

En general, dicha PCR puede ser llevada a cabo como se describe más arriba en la presente en la sección “Amplificación por PCR que comprende una pluralidad de

amplificaciones por PCR compartimentadas” –preferiblemente, sin embargo, con las excepciones como se describen a continuación:

- 5 – Las amplificaciones por PCR compartimentadas pueden estar contenidas en gotas, como se describe más arriba. Para amplificaciones por PCR en los super-
10 conjuntos, es de importancia una alta sensibilidad, mientras que las amplificaciones por PCR en subconjuntos requieren menor sensibilidad. Mientras que típicamente se requiere una gran cantidad de reactivos para las amplificaciones por PCR con alta sensibilidad, las amplificaciones por PCR con más baja sensibilidad requieren una menor cantidad de reactivos. Así, se prefiere que las amplificaciones por PCR
15 en los super-conjuntos tengan una sensibilidad para detectar uno o varios NOI(s) mutante(s) dentro de al menos 200.000, más preferiblemente dentro de al menos 250.000 NOIs de referencia.
- 20 – Para amplificaciones por PCR en un super-conjunto, puede preferirse que cada gota tenga un volumen muy pequeño, por ej. un volumen en el tamaño de picolitros (pl). de manera acorde, se prefiere que las gotas en promedio tengan un volumen en el rango de 0,1 a 10 pl.
- 25 – Cada amplificación por PCR puede ser compartimentada en cualquier número adecuado de compartimentos. Sin embargo, en una forma de realización preferida, cada amplificación por PCR es compartimentada en un rango de 200.000 a 100.000.000 de compartimentos (por ej. gotas). Por ejemplo, cada amplificación por PCR puede ser compartimentada en el rango de 500.000 a 50.000.000 de compartimentos (por ej. gotas), por ejemplo, cada amplificación por PCR puede ser compartimentada en el rango de 1.000.000 a 10.000.000 de compartimentos (por ej. gotas). Puede preferirse que cada amplificación por PCR sea compartimentada
30 en al menos 1.000.000, preferiblemente al menos 3.000.000, aún más preferiblemente al menos 5.000.000, tal como al menos 7.000.000 de compartimentos (por ej. gotas).
- 35 – En algunos casos, las gotas son generadas utilizando un generador de gotas disponible comercialmente, tal como un RainDrop Digital PCR System de Raindance Technologies, un sistema que también puede ser utilizado para detectar producto(s) de amplificación por PCR.

Una vez que las reacciones de PCR compartimentadas han sido preparadas, la amplificación puede ser llevada a cabo como se describe en la presente más abajo en la sección “PCR”.

La detección de la presencia de la secuencia diana que comprende el(los) NOI(s) mutante(s) puede ser llevada a cabo como se describe más arriba en la presente en la sección “Detección de producto(s) de PCR”.

5

En una forma de realización puede preferirse que la detección sea llevada a cabo utilizando una sonda para detección de referencia y una sonda para detección de mutantes esencialmente como se describe en la sección “Detección de producto(s) de PCR”, en donde se emplea un exceso de sonda para detección de mutantes.

10

Preferiblemente, las reacciones de PCR comprenden al menos un exceso de 2 veces, más preferiblemente al menos un exceso de 4 veces de la sonda para detección de mutantes comparado con la sonda para detección de referencia. También es posible que no se utilice ninguna sonda de detección de referencia y solamente se utilice sonda para detección de mutantes.

15

PCR

Los métodos descritos en la presente comprenden múltiples etapas de ejecución de amplificaciones por PCR, incluyendo amplificaciones por PCR compartimentadas, por ej. amplificaciones por PCR como se describe en la sección “Amplificaciones por PCR que comprenden una pluralidad de amplificaciones por PCR compartimentadas”, o en la sección “Amplificación por PCR en super-conjuntos”.

20

En la presente, en general, una amplificación por PCR comprende las etapas de:

25

1) Preparar una amplificación por PCR que comprende la muestra de ADN_g, un conjunto de cebadores que flanquean la secuencia diana y reactivos para PCR;

2) Llevar a cabo una amplificación por PCR, lo cual típicamente comprende las etapas de:

30

- Incubar la amplificación por PCR a una temperatura de desnaturalización, por ej. en el rango de 85 a 100°C, por ejemplo, en el rango de 90 a 98°C durante un tiempo suficiente para desnaturalizar ADN de doble hebra, por ej. durante en el rango de 15 a 30 min, tal como en el rango de 30 seg a 5 min;
- Llevar a cabo una pluralidad de ciclos, por ejemplo, en el rango de 10 a 60 ciclos, tal como en el rango de 20 a 40 ciclos, que comprende las siguientes etapas:

- Incubación a una temperatura de hibridación para permitir la hibridación entre cebadores y ADN diana, por ej. en el rango de 15 seg a 2 min, tal como en el rango de 30 seg a 1 min. Típicamente, la temperatura de hibridación será similar a, o menor que, la temperatura de fusión de los cebadores, por ej. una temperatura en el rango de 45 a 75°C. La incubación a la temperatura de hibridación puede también permitir la elongación de los cebadores;
- Opcionalmente, la incubación a una temperatura de elongación a la cual la polimerasa de ácido nucleico tiene actividad, por ej. a una temperatura en el rango de 55 a 75°C, durante en el rango de 15 seg a 2 min, por ej. en el rango de 30 seg a 1 min.;
- Incubación a una temperatura de desnaturalización, por ej. a una temperatura en el rango de 85 a 100°C, o en el rango de 90 a 98°C en el rango de 15 seg a 2 min, por ejemplo en el rango de 30 seg a 1 min.;
- Incubación a una temperatura de elongación de una ADN polimerasa, por ej. en el rango de 55 a 98°C, tal como en el rango de 15 seg a 20 min, tal como en el rango de 1 a 15 min..

Antes de la etapa de amplificación, por ej. antes de la etapa 2) de la lista previa, la PCR puede ser particionada en una pluralidad de compartimentos espacialmente separados con el objeto de obtener amplificaciones por PCR compartimentadas. Esto puede ser logrado, por ejemplo generando gotas, por ej. mediante adición de un aceite generador de gotas, y preparando gotas en un generador de gotas.

Planta de cebada que porta una mutación en el gen GS1-3

En una forma de realización, la invención se relaciona con una planta de cebada que porta una mutación en el gen que codifica la glutamina sintasa 1, específicamente la isoforma 3 (GS1-3). Dicho gen puede también ser designado como gen HvGS1-3, cuya secuencia de codificación de proteína está provista en la presente como SEQ ID NO:1, mientras que la secuencia de aminoácidos de las enzimas codificadas por HvGS1-3 está provista como SEQ ID NO:2.

Preferiblemente, dicha mutación es una mutación en la cual dicho gen confiere una secuencia que codifica una enzima HvGS1-3 mutada con actividad reducida. La actividad de la HvGS1-3 es una o más de las siguientes:

- i. Catalizar la condenación de amonio;

- ii. Catalizar la condensación de amoníaco y glutamato en forma de glutamina;
- iii. Catalizar la síntesis de glutamil-hidroxamato a partir de glutamato, hidroxilamina y ATP.

5 En particular, la actividad de la HvGS1-3 puede ser como se describe en iii. Aquí, la actividad puede, por ejemplo, ser determinada como se describe en el Ejemplo 19 en la presente más abajo en la sección “Ensayo *in vitro* de actividad de HvGS1-3 recombinante”.

10 Se prefiere que la proteína HvGS1-3 mutada tenga una actividad que sea menor que la actividad de la proteína de tipo salvaje. Sin embargo, la enzima debe preferiblemente retener al menos alguna actividad. En particular, dicha proteína HvGS1-3 mutada puede tener una k_{cat} (min^{-1}), que está en el rango de 1 a 20%, tal como en el rango de 2 a 10% de la k_{cat} (min^{-1}) de la proteína HvGS1-3 de tipo salvaje,
15 cuando se determina como se describe en el relato del Ejemplo 19.

Se cree que la enzima HvGS1-3 de tipo salvaje es un decámero que consiste en dos anillos compuestos de 5 subunidades. En una forma de realización, la proteína HvGS1-3 contiene una mutación en un residuo aminoácido que recubre la interfase
20 entre los dos anillos. En particular, la mutación puede ser una mutación en un residuo aminoácido seleccionado del grupo que consiste en los residuos aminoácidos 141, 235, 285, 287 y 290 de SEQ ID NO:2.

Así, la planta de cebada puede comprender una mutación en el gen que codifica
25 HvGS1-3, en donde dicho gen codifica una proteína HvGS1-3 mutada que porta una mutación de uno de los residuos aminoácidos anteriormente mencionados.

En particular, la proteína HvGS1-3 mutada puede ser una proteína con una mutación en el residuo aminoácido N° 287 de la SEQ ID NO:2, por ej. una mutación de Gly a cualquier otro residuo aminoácido, tal como cualquier otro residuo aminoácido natural.
30 La mutación puede también ser una mutación del residuo aminoácido 287 de SEQ ID NO:2, es decir de Gly a un residuo aminoácido polar o cargado, por ej. a un residuo aminoácido seleccionado del conjunto que consiste en Arg, Lys, Asp, Glu, Gln, Asn, His, Ser, Thr, Tyr, Cys, Met y Trp –o por ejemplo, a un residuo aminoácido
35 seleccionado del grupo que consiste en Arg, Lys, Asp, Glu, Tyr, Phe, Met y Trp. La

mutación también puede ser una mutación del residuo aminoácido 287 de SEQ ID NO:2 de Gly a un residuo cargado, por ej. a un residuo aminoácido seleccionado del conjunto que consiste en Arg, Lys, Asp y Glu. En particular, la mutación puede también ser una mutación de residuo aminoácido 287 de SEQ ID NO:2 de Gly a Asp.

5

La mutación en el gen HvGS1-3 así puede ser cualquier mutación que da por resultado un gen HvGS1-3 que codifica una o más de las anteriormente mencionadas mutaciones. En una forma de realización, la mutación del gen puede ser una mutación de uno o más de los nucleótidos 859, 860 y 861 para obtener un codón que codifica uno de los residuos aminoácidos anteriormente mencionados. En un ejemplo, la mutación es una mutación del gen del nucleótido 860 desde G a A.

10

En una forma de realización, la proteína HvGS1-3 mutada puede ser una proteína que porta una mutación en el residuo aminoácido 235 de la SEQ ID NO:2, por ejemplo una mutación de Asp a cualquier otro residuo aminoácido. La mutación también puede ser una mutación del residuo aminoácido 235 de SEQ ID NO:2 de Asp a un residuo cargado positivamente, por ej. a un residuo aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Arg y Lys. La mutación en el gen HvGS1-3 puede así ser cualquier mutación que da por resultado un gen HvGS1-3 que codifica cualquiera de las proteínas HvGS1-3 mutadas anteriormente mencionadas.

15

20

En una forma de realización, la proteína HvGS1-3 mutada puede ser una proteína que porta una mutación en el residuo aminoácido 285 de la SEQ ID NO:2 –por ejemplo una mutación de la Gly a cualquier otro aminoácido, tal como cualquier otro aminoácido natural. La mutación también puede ser una mutación del aminoácido 285 de SEQ ID NO:2 de la Gly a un aminoácido polar o cargado, por ej. a un residuo aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Arg, Lys, Asp, Glu, Gln, Asn, His, Ser, Thr, Tyr, Cys, Met y Trp. La mutación en el gen HvGS1-3 puede así ser cualquier mutación que da por resultado un gen HvGS1-3 que codifica las proteínas HvGS1-3 mutadas anteriormente mencionadas.

25

30

En una forma de realización la proteína HvGS1-3 mutada puede ser una proteína que porta una mutación en el residuo aminoácido 290 de la SEQ ID NO:2, por ejemplo una mutación de la Arg a cualquier otro residuo aminoácido. La mutación también puede ser una mutación del residuo aminoácido 290 de la SEQ ID NO:2 de la Arg a un

35

residuo aminoácido cargado negativamente, por ej. a un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asp y Glu. La mutación en el gen HvGS1-3 puede así ser cualquier mutación que da por resultado un gen HvGS1-3 que codifica las proteínas HvGS1-3 mutadas anteriormente mencionadas.

5

En una forma de realización, la proteína HvGS1-3 mutada puede ser una proteína que porta una mutación en el residuo aminoácido 141 de la SEQ ID NO:2, por ejemplo una mutación del Trp a cualquier otro residuo aminoácido. La mutación también puede ser una mutación del residuo aminoácido 141 de la SEQ ID NO:2 del Trp a cualquier otro aminoácido natural, excepto Tyr o Trp. La mutación en el gen HvGS1-3 puede así ser cualquier mutación que da por resultado un gen HvGS1-3 que codifica cualquiera de las proteínas HvGS1-3 mutadas anteriormente mencionadas.

10

La solicitud también se refiere a las siguientes formas de realización:

15

1. Una planta de cebada con una mutación en el gen que codifica HvGS1-3, en donde dicho gen mutado codifica una proteína HvGS1-3 mutada con actividad enzimática reducida.

20

2. La planta de cebada de acuerdo con la forma de realización 1, en donde la proteína HvGS1-3 mutada tiene un valor k_{cat} con respecto a la síntesis de glutamil-hidroxamato a partir de glutamato, hidroxilamina y ATP en el rango de 1 a 20% del k_{cat} de HvGS1-3 de tipo salvaje.

25

3. La planta de cebada de acuerdo con una cualquiera de las formas de realización 1 a 2, en donde una forma HvGS1-3 porta una mutación en el residuo aminoácido 287 de SEQ ID NO:2.

30

4. Malta preparada a partir de una planta de cebada de acuerdo con una cualquiera de las formas de realización 1 a 3.

35

5. Una bebida preparada a partir de una planta de cebada de acuerdo con una cualquiera de las formas de realización 1 a 3.

6. Un método para producir una bebida, comprendiendo dicho método las etapas de:

- i. Proveer granos de una planta de cebada de acuerdo con una cualquiera de las formas de realización 1 a 3;
 - ii. Opcionalmente, maltear al menos parte de dichos granos, obteniendo de este modo malta;
 - 5 iii. Preparar un extracto de dicha cebada y/o dicha malta de cebada;
 - iv. Procesar dicho extracto en forma de una bebida.
7. El método de acuerdo con la forma de realización 6, en donde la bebida es cerveza.

10

Planta de trigo que porta una mutación en el gen GASR7

En una forma de realización, la invención se relaciona con una planta de trigo que porta una mutación en el gen que codifica GASR7 en el genoma A. Dicho gen puede también ser referido como TaGASR7-A1 y la secuencia está disponible en GenBank bajo el número NCBI: KJ000052 y la secuencia codificante está provista en la presente como SEQ ID NO:25. La secuencia de aminoácidos de GASR7 está provista como SEQ ID NO:8.

20 Preferiblemente, dicha mutación es una mutación que en dicho gen confiere una secuencia que codifica una enzima GASR7 mutada con actividad reducida. Más preferiblemente, la mutación es una mutación que conduce a una pérdida total de la función GASR7. La pérdida total de la función GASR7 puede por ejemplo ser la ausencia del polipéptido GASR7. La pérdida de la función GASR7 puede también

25 conducir a una longitud aumentada del grano.

En particular, se prefiere que la mutación sea una mutación que conduce al gen GASR7 que codifica una forma truncada de GASR7, en donde dicha forma truncada de GASR7 comprende a lo sumo 91 aminoácidos, tal como a lo sumo los 91

30 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO:8. Por ejemplo, la planta de trigo puede comprender una mutación en el gen GASR7 que conduce a un codón de terminación (codón stop) prematuro, por ejemplo una mutación que da por resultado la formación de un codón stop en un codón que codifica un Trp. En una forma de realización, la planta de trigo puede comprender una mutación en el gen GASR7 que conduce a un

codón stop prematuro en el codón 91 (nucleótidos 271-273) de SEQ ID NO:25 o en cualquier codón posicionado más hacia 5'.

5 En una forma de realización, la planta de trigo puede comprender una mutación en el gen GASR7 que conduce a un codón stop prematuro en la posición que codifica el residuo aminoácido N° 91 de la SEQ ID NO:8.

La solicitud también se refiere a las siguientes formas de realización:

10 8. Una planta de trigo que porta una mutación en el gen que codifica GASR7.

9. La planta de trigo de acuerdo con la forma de realización 8, en donde la planta de trigo porta una mutación en el gen que codifica GASR7 que conduce a un codón stop prematuro.

15

Productos de plantas y métodos de producción de los mismos

En una forma de realización, la invención se refiere a productos de plantas de una planta de cebada que porta una mutación en el gen HvGS1-3, por ej. cualquiera de las plantas de cebada descritas más arriba en la presente en la sección “Planta de
20 cebada que porta una mutación en el gen GS1-3”. El producto de planta puede ser la planta *per se* o partes de la misma. Por ejemplo, el producto de planta puede ser granos de cebada.

En una forma de realización, el producto de planta es una composición de malta. La
25 composición de malta puede comprender o consistir en plantas de cebada malteada o partes de las mismas –por ejemplo de granos de cebada malteados, es decir granos de cebada a partir de una planta de cebada que portan una mutación en el gen HvGS1-3, por ej. cualquiera de las plantas de cebada descritas más arriba en la presente en la sección “Planta de cebada que porta una mutación en el gen GS1-3”.

30

Los granos de cebada malteados son granos de cebada que han sido sometidos a una etapa de germinación, seguido por una etapa de secado. La composición de malta puede comprender o consistir en malta procesada, por ejemplo, puede ser “malta molida” o “harina”. Así, dicha composición de malta puede ser preparada mediante un
35 método que comprende las etapas de:

- Poner en remojo granos de cereal, por ej. granos de cebada;
- Hacer germinar granos de cereal;
- Secar dichos granos de cereal germinados, por ej. mediante secado en horno a elevadas temperaturas.

5

La invención también se relaciona con mosto preparado a partir de una planta de cebada que porta una mutación en el gen HvGS1-3, por ej. una cualquiera de las plantas de cebada descritas más arriba en la presente en la sección “Planta de cebada que porta una mutación en el gen GS1-3”. El mosto es un extracto de cebada acuoso que por ejemplo puede ser preparado macerando malta, granos de cebada no malteados y/o auxiliares. “Auxiliares” se entiende que comprende cualquier fuente de hidratos de carbono distintos de malta, tal como, pero no limitado a, cereales (por ej. cebada, trigo, maíz o arroz) –tanto como granos enteros o como productos procesados como sémola, jarabes o almidón. Todos los mencionados auxiliares pueden ser principalmente utilizados como fuentes adicionales de extracto (los jarabes son típicamente dosificados después del macerado). Antes del macerado, la malta es típicamente molida. Los auxiliares, que también están en forma de piezas grandes, por ej. granos enteros, son también típicamente molidos.

Los granos de cebada no malteados carecen, o contienen solamente una cantidad limitada, de enzimas beneficiosas para la producción de mosto, tales como enzimas capaces de degradar paredes celulares o despolimerizar almidón en forma de azúcares. Así, en formas de realización de la invención en donde se utiliza cebada no malteada para macerado, se prefiere que se agreguen al macerado una o más enzimas externas para la preparación de cerveza. Aún en formas de realización de la invención, en donde se utiliza malta de cereales para la producción de mosto, pueden agregarse enzimas externas durante el macerado. Las enzimas adecuadas pueden ser lipasas, enzimas que degradan almidón (por ej. amilasas), glucanasas [preferiblemente (1-4)- y/o (1-3, 1-4)-β-glucanasa], y/o xilanasas (tales como arabinoxilanasas), y/o proteasas, o mezclas de enzimas que comprenden una o más de las enzimas anteriormente mencionadas, por ej. Cereflo, Ultraflo u Ondea Pro (Novozymes).

El macerado es típicamente llevado a cabo incubando dicha malta y/o granos de cebada molidos, y opcionalmente auxiliares, con agua a elevadas temperaturas predeterminadas. Típicamente, el macerado es llevado a cabo a temperaturas en el

rango de 40 a 80°C. La temperatura de incubación es, en general, o bien mantenida constante (macerado isotérmico) o bien incrementada gradualmente. Esto puede, por ejemplo, ser llevado a la práctica de manera secuencial. Si la temperatura de gelatinización está por encima de la normalmente observada para sacarificación normal de la malta, entonces el almidón puede ser gelatinizado y licuado antes de la adición al macerado. En cualquier caso, las sustancias solubles en malta/cebada/auxiliares son liberadas dentro de dicha fracción líquida. Una filtración subsiguiente brinda la separación del mosto y partículas sólidas residuales, también denominadas estas últimas como “grano agotado”. El mosto así obtenido puede también ser denominado “primer mosto”. Puede agregarse líquido adicional, tal como agua, a los granos agotados durante un proceso denominado “rociado” (*sparging*). Después del *sparging* y filtración, puede obtenerse un “segundo mosto”. Pueden prepararse mostos adicionales repitiendo el procedimiento. Ejemplos no limitativos de procedimientos adecuados para preparación de mosto son descritos por Briggs et al. (*supra*) y Hough et al. (*supra*).

Después de macerado y/o *sparging*, el mosto puede ser sometido a una etapa de ebullición –opcionalmente en presencia de compuestos adicionales, por ej. lúpulo para obtener mosto hervido.

El mosto de acuerdo con la invención puede ser un primer mosto, segundo mosto, mostos adicionales o combinaciones de los mencionados, así como versiones hervidas de cualquiera de los mencionados.

En una forma de realización preferida de la invención, el producto de planta es una bebida preparada a partir de una planta de cebada que porta una mutación en el gen que codifica HvGS1-3, por ej. una bebida en base a cebada, tal como bebidas alcohólicas en base a cebada y bebidas no alcohólicas en base a cebada. Las bebidas alcohólicas en base a cebada pueden, por ejemplo, ser una cerveza o un alcohol destilado.

Dicha cerveza puede ser cualquier clase de cerveza, por ejemplo lager o ale. Así, la cerveza puede ser seleccionada del grupo que consiste en Altbier, Amber ale, Barley wine, Berliner weisse, Bière de Garde, Bitter, Blonde Ale, Bock, Brown ale, California Common, Cream Ale, Dortmunder Export, Doppelbock, Dunkel, Dunkelweizen,

Eisbock, Fruit lambic, Golden Ale, Gose, Gueuze, Hefeweizen, Helles, India pale ale, Kölsch, Lambic, Light ale, Maibock, Malt liquor, Mild, Märzenbier, Old ale, Oud bruin, Pale ale, Pilsener, Porter, Red ale, Roggenbier, Saison, Scotch ale, Steam beer, Stout, Schwarzbier, lager, Witbier, Weissbier y Weizenbock.

5

Dicho alcohol destilado puede ser cualquier clase de alcohol destilado. En particular, el alcohol destilado puede estar basado en una planta de cebada que porta una mutación en el gen HvGS1-3, por ej. cereal malteado, tal como una malta de cebada. Los ejemplos no limitativos de tal alcohol destilado incluye whiskey y vodka.

10

La bebida puede ser una bebida no alcohólica, tal como una bebida no alcohólica basada en cebada, por ej. cerveza no alcohólica o bebidas de malta no alcohólicas, tales como maltina.

15

Las bebidas pueden, por ejemplo, ser preparadas mediante cualquiera de los métodos descriptos en la presente a continuación.

Método para producir una bebida

20

En una forma de realización, la invención se refiere a métodos para producir una bebida. Tales métodos pueden comprender las etapas de:

25

- Proveer una planta de cebada que porta una mutación en el gen HvGS1-3, por ej. cualquiera de las mutaciones descriptas más arriba en la presente en la sección "Planta de cebada que porta una mutación en el gen GS1-3";
- Preparar un extracto acuoso de dicha planta o partes de la misma;
- Opcionalmente procesar adicionalmente dicho extracto acuoso en forma de una bebida.

Así, la invención provee en una forma de realización métodos para producir una bebida, comprendiendo dicho método las etapas de:

30

- a) Proveer granos de una planta de cebada que porta una mutación en el gen que codifica HvGS1-3, por ej. cualquiera de las mutaciones descriptas más arriba en la presente en la sección "Planta de cebada que porta una mutación en el gen GS1-3";

- b) Opcionalmente preparar una composición de malta de al menos parte de dichos granos, obteniendo de este modo una composición de malta;
- c) Preparar un extracto acuoso de dicha cebada y/o composición de malta;
- d) Procesar dicho extracto en forma de una bebida.

5

La Etapa b) puede ser llevada a cabo como se describe más arriba en la presente en la sección "Productos de plantas y métodos de producción de los mismos". Y la Etapa c) puede, por ejemplo, ser una etapa de preparación de mosto, es decir el extracto acuoso puede ser mosto. Dicho mosto puede ser cualquiera de los mostos descriptos más arriba en la presente en la sección "Productos de plantas y métodos de producción de los mismos"; también puede ser preparado como se describe en esa sección.

10

La Etapa d) puede comprender la etapa de fermentación de dicho extracto acuoso, por ej. fermentación de dicho mosto con levadura. La Etapa d) puede comprender las etapas de:

15

d-i) Calentar el extracto (por ej. en presencia de ingrediente(s) adicional(es), tales como lúpulo);

d-ii) Fermentar el extracto calentado, o el mosto calentado, en presencia de levadura;

20

d-iii) Opcionalmente agregar un o más ingrediente(s) adicionales,

produciendo de este modo una cerveza.

Dichos ingredientes adicionales pueden ser, por ejemplo, CO₂ o compuestos de aroma.

25

Los métodos para producir cerveza son bien conocidos en el arte, y así los métodos para producir una bebida pueden ser cualquier método convencional para producir cerveza que involucra el uso de una planta de cebada de la invención como material de partida. Por ejemplo, pueden hallarse descripciones detalladas de ejemplos de métodos adecuados para malteado y producción de cerveza, incluyendo publicaciones por Briggs et al. (1981) y Hough et al. (1982). Están disponibles numerosos y regularmente actualizados métodos para análisis de cebada, malta y productos de

30

cerveza, por ejemplo, pero no limitados a, American Association of Cereal Chemists (1995), American Society of Brewing Chemists (1992), European Brewery Convention (1998), y Institute of Brewing (1997). Se reconoce que se emplean muchos

procedimientos específicos para una dada fábrica de cerveza, relacionándose las variaciones más significativas con las preferencias del consumidor local. Cualquiera de tales métodos de producir cerveza puede ser utilizado con la presente invención.

5 La solicitud también se refiere a las siguientes formas de realización:

10. Una levadura que porta una mutación en el gen FDC1 que da por resultado una pérdida total de función de la actividad *fdc1*, en donde la mutación da por resultado la formación de un codón stop en un codón que codifica Trp.

10 11. La levadura de acuerdo con la forma de realización 10, en donde la levadura es *S. cerevisiae* y dicha *S. cerevisiae* porta una mutación que da por resultado la formación de un codón stop en el codón que codifica Trp159 de ScFDC1 de *S. cerevisiae*.

15 12. Un método para preparar una bebida, comprendiendo dicho método las etapas de:

- i. Proveer mosto;
- ii. Fermentar dicho mosto con una levadura de acuerdo con una de las formas de realización 10 a 11;
- iii. Opcionalmente, procesar adicionalmente el mosto fermentado en forma de una

20 bebida.

Listado de Secuencias

SEQ ID NO:1	NCBI: AFX60877.1 (HvGS1-3)
SEQ ID NO:2	Número de acceso GenBank NCBI: JX878491.1 – CDS - HvGS1-3
SEQ ID NO:3-6	Cebadores y sondas que distinguen entre el alelo mutante y el alelo de tipo salvaje de HvGS1-3 en la posición nucleotídica 860
SEQ ID NO:7	Secuencia de aminoácidos de <i>fdc1</i> de <i>S. cerevisiae</i> (GenBank número NCBI: NM_001180847)
SEQ ID NO:8	Secuencia de aminoácidos de GASR7-A1 de <i>T. aestivum</i> (GenBank número NCBI: KJ000052).

SEQ ID NO:9-12	Cebadores y sondas que distinguen entre el alelo mutante y el alelo de tipo salvaje de TaGASR7 en la posición nucleotídica 273
SEQ ID NO:13-16	Cebadores y sondas que distinguen entre el alelo mutante y el alelo de tipo salvaje de ScFDC1 en la posición nucleotídica 476
SEQ ID NO:17	ADNc que codifica BADH1 de <i>Hordeum vulgare</i> (HvBADH1)
SEQ ID NO:18	ADNc que codifica BADH1 mutante de <i>Hordeum vulgare</i> (HvBADH1)
SEQ ID NO:19	Secuencia de aminoácidos de BADH1 de <i>Hordeum vulgare</i> (HvBADH1)
SEQ ID NO:20-24	Cebadores y sondas que distinguen entre el alelo mutante y el alelo de tipo salvaje de TaGASR7 en la posición nucleotídica 273
SEQ ID NO:25	NCBI: KJ000052 – (TaGASR7 –A1)
SEQ ID NO:26	NCBI: NM_001180847 (ScFDC1)

A menos que se indique de otra manera, todos los números de acceso a GenBank se brindan en relación con la versión al 1° de julio de 2016 de la base de datos de GenBank.

5

EJEMPLOS

La invención está ilustrada mediante descripciones y ejemplos de WS, los cuales no deberían ser considerados como limitantes de la invención. A menos que se indique de otro modo, las técnicas bioquímicas básicas y de biología molecular fueron utilizadas para trabajar con los ácidos nucleicos, proteínas (incluyendo enzimas) y organismos.

Todas las corrientes de trabajo descriptas (WS) a continuación incluyen, por ej., números específicos de granos utilizados, concentración específica y condiciones

específicas para PCR, etc. La persona experta será capaz de adaptar los ejemplos específicos provistos, para utilizar un número diferente de granos, concentraciones diferentes, diferentes condiciones para PCR, etc.

5 **WS1: Preparación de granos de cereal mutagenizados aleatoriamente**

Etapa 1.1: Procedimiento de mutagénesis

Para inducir mutaciones, los granos recolectados de plantas de cebada fueron incubados en una solución del mutágeno NaN_3 , de acuerdo con los detalles provistos por Kleinhofs et al. (1978) y aquellos en US 7.838.053 de K. Breddam et al. Este procedimiento induce mutaciones puntuales en el ADN_g de los granos de cebada, confiriendo típicamente a codones distribuidos aleatoriamente sustituciones de aminoácidos o señales de terminación (“stop”) traduccionales del ADN que codifica la proteína, es decir, conduciendo a cambios en la proteína y truncaciones en las proteínas codificadas por el ADN mutagenizado. No obstante, los métodos de la invención también son útiles para producir plantas de cereal con mutaciones puntuales en el ADN_g de regiones no codificantes de proteína, por ej., promotores, terminadores e intrones.

Se sembraron un total de 500 g de granos mutagenizados, todos de la generación M0, en una parcela de 7,5 m² en el campo. Los granos de la generación M1 fueron, en algunos casos, multiplicados en parcelas de campo –finalmente, rindiendo plantas mutantes de la generación M2 o M3 (ver Figura 2A). Se esperaba que las mutaciones en los granos de la generación M3 ocurrieran a una frecuencia correspondiente a 0,9–2,3 por cada 10.000 granos (ver Kleinhofs et al., *supra*).

WS2: Preparación de una biblioteca ordenada de granos derivados de las plantas de cereal mutadas

30 **Etapa 2.1:** Cosecha de plantas de cereal, trillado de espigas

Cada “parcela de campo” de 7,5 m² (FP#01, FP#02, etc.; ver. Figura 2B) en el campo fue dividida en un número de sub-parcelas de campo (FSP#01, FSP#02, etc.; Figura 2B, acción marcada con 1), cada una de 0,45 m² en tamaño y conteniendo ~300 plantas individuales. Todos las espigas en una sub-parcela fueron cosechadas

manualmente utilizando una segadera, y subsiguientemente recolectados en una única bolsa. Los contenidos de las bolsas individuales fueron trillados separadamente, rindiendo bolsas marcadas como "Total de grano", cada una comprendiendo ~6000 granos (GT#01, GT#02, etc.; Figura 2B, acción marcada con 2).

5

A los efectos de claridad de la descripción, y no a modo de limitación, los siguientes temas relevantes de la Etapa 2 están detallados en los Ejemplos a continuación:

- Ejemplo 1: Crecimiento de plantas de cebada en "Parcelas de campo";
- Ejemplo 2: Cosecha de granos en "Parcelas de campo" individuales.

10

WS3: Determinación de si una muestra de la biblioteca contiene granos mutados

Etapa 3.1: División de conjuntos de grano de "Total de grano" individual en dos fracciones

15

Los granos trillados en las bolsas de "Total de grano" individuales fueron divididos en dos fracciones, de las cuales las muestras "Total de sub-grano" consistían en ~1500 granos (marcados SGT#01, SGT#02, etc.; ver Figura 2C; acción 1), cuyo procesamiento, es detallado en la Etapa 3.2 a Etapa 3.4 a continuación. El procesamiento de los granos en las fracciones "Total sub-grano" busca, en líneas generales, determinar cuál(es) de dicha(s) fracción(es) de grano contiene(n) la(s) mutación(es) de interés. A los fines de claridad, pero no de relevancia en cuanto a las acciones de la Etapa 3, el remanente de una fracción "Total de grano", consistente en ~4500 granos, fue procesado como se detalla en la descripción relacionada con la Etapa 4.

20

25

A los efectos de claridad de la descripción, y no a modo de limitación, el siguiente tema relevante de la Etapa 3.1 está detallado en los Ejemplos a continuación:

- Ejemplo 3: Descripción de los granos en "Total sub-grano".

30

Etapa 3.2: Preparación de muestras de harina a partir de granos de "Total sub-grano"

Cada muestra de total sub-grano conteniendo 1500 granos –es decir, muestras rotuladas SGT#01, SGT#02, etc.– fue molida en un molino estándar de laboratorio (ver Figura 2B, acción 2), con limpieza minuciosa entre aplicaciones, rindiendo las

correspondientes muestras de harina –rotuladas SFT#01, SFT#02, etc. (ver Figura 2C).

5 A los efectos de claridad de la descripción, y no a modo de limitación, el siguiente tema relevante de la Etapa 3.2 está detallado en los Ejemplos a continuación:

- Ejemplo 4: Preparación de harina de granos derivados de una muestra de "Total sub-grano".

Etapa 3.3: Preparación de ADNg a partir de alícuotas de harina

10 Se distribuyeron en contenedores separados alícuotas de muestras individuales "Total sub-harina", cada una de 25 g y se rotularon como "Alícuota de muestra sub-harina" (ASFT#01, ASFT#02, etc.), (ver Figura 2C, acción 3).

15 El ADNg fue luego extraído de cada alícuota de harina (ver Figura 2C, acción 4), y cada ADNg extraído fue ubicado en un pocillo de una placa para microtítulo con las muestras rotuladas DNAg(GT#01), DNAg(GT#02), etc., indicando el origen específico "Total de grano" de una muestra. Alternativamente, la extracción puede ser llevada a cabo en pocillos de una placa para microtítulo.

20 A los efectos de claridad de la descripción, y no a modo de limitación, los siguientes temas relacionados con la Etapa 3.3 están detallados en los Ejemplos a continuación:

- Ejemplo 5: Preparación de alícuotas de harina de 25 g (ASFTs);
- Ejemplo 6: Preparación de ADNg de ASFTs.

Etapa 3.4: Análisis de muestras que contienen ADNg de GTs

25 Luego, las alícuotas de ADNg derivado de las muestras individuales de "Total de grano" fueron transferidas a una nueva placa para microtítulo de 96 pocillos (ver Figura 2C, acción 5), ocasionalmente incluyendo dos muestras de control negativo. Un análisis posterior de ddPCR, por ej., como se detalla en el Ejemplo 7, puede ayudar a
30 identificar muestras que contienen ADNg de plantas mutantes.

A los efectos de claridad de la descripción, y no a modo de limitación, el siguiente tema relacionado con la Etapa 3.4 está detallado en los Ejemplos a continuación:

- Ejemplo 7: experimentos basados en ddPCR con ADNg derivado de ASFTs.

WS4: Hallazgo de grano(s) individual(es) caracterizado(s) por una mutación de interés

5 **Etapla 4.1:** Especificaciones de un "Conjunto de biblioteca de granos" (GLP, por sus siglas en inglés)

10 Dado que un análisis, por ej., como se detalla en la Etapa 3.4 anteriormente, brindó una señal que indica la presencia de ADN_g mutado en una o más de las 96 muestras analizadas –es decir, aquellas rotuladas gDNA(GT#01), gDNA(GT#02), etc. en la Figura 2C– se consideró altamente probable que los 4500 granos de la fracción "Total de grano", marcada como "Conjunto de biblioteca de granos" (GLP#01, GLP#02, etc.; Figura 2D, acción 2), comprendían uno o más granos con la mutación de interés idéntica. En la presente solicitud, el procesamiento de dichos GLPs se relacionaría con los esfuerzos más recientes para hallar un grano específico, mutado, que albergue la misma mutación que aquella de una molécula molde (*template*) detectada en una alícuota procesada derivada de una muestra de "Total de grano" (Figuras 2B, 2C y 2D), y la cual además ocasionó una señal de mutante en el correspondiente análisis de ddPCR (como se ilustra en la Figura 2C, acción 5).

20 A los efectos de claridad de la descripción, y no a modo de limitación, el siguiente tema relevante de la Etapa 4.1 está detallado en la sección de Ejemplos de la presente descripción:

- Ejemplo 8: Recolección de granos para un "Conjunto de biblioteca de granos".

25 **Etapla 4.2:** Reducción de un "Conjunto de biblioteca de granos" a una "Fracción de conjunto de biblioteca de granos"

30 Con una muestra de GLP intacta conteniendo ~4500 granos derivados de un GT específico (y dado que el análisis basado en ddPCR del ADN_g, como se ilustra en la Figura 2C, acción 5, había indicado que dicho ADN_g contenía una mutación en el ADN_g) fue normalmente suficiente hacer un relevamiento de menos de 12 granos individuales en busca de una mutación génica específica idéntica a aquella revelada por el análisis de la Etapa 3.4. Por esta razón, se preparó una muestra de ~1200 granos de un GLP de interés (Figura 2D, acción 2), brindando una "Fracción de conjunto de biblioteca de granos", abreviada como FGLP. Finalmente, se aislaron un

total de 96 muestras, consistiendo cada una en 12 granos de una FGLP específica – cada una constituyendo un subconjunto secundario.

5 A los efectos de claridad de la descripción, y no a modo de limitación, el siguiente tema de la Etapa 4.2 está detallado en los siguientes Ejemplos de la presente descripción:

- Ejemplo 9: Obtención de una "Fracción de conjunto de biblioteca de granos" a partir de un "Conjunto de biblioteca de granos".

10 **Etapa 4.3:** Separación de granos y correspondientes muestras de harina

Cada uno de los 12 granos en una muestra preparada como se describe anteriormente en la Etapa 4.2, fueron heridos mediante perforación de un delgado orificio dentro del endosperma. Mientras que los granos heridos, aunque viables, fueron transferidos dentro de un pocillo de una placa para microtítulo con pocillos profundos (Figura 2D, acción 3), la harina liberada mediante la perforación de los mismos granos fue agrupada y transferida a una segunda placa para microtítulo (Figura 2D, acción 4). Este procedimiento fue llevado a cabo para las 95 muestras remanentes (manteniendo un sistema de numeración idéntico en las dos placas), brindando una placa para microtítulo con muestras de granos (rotulada "Conjuntos de granos perforados a partir de fracción de conjunto de biblioteca" abreviado PDGLP; ver Figura 2D), y una placa para microtítulo con muestras de harina de endosperma (rotulada "Conjuntos de harina de granos perforados" abreviado PFGLP; Figura 2D).

25 A los efectos de claridad de la descripción, y no a modo de limitación, los siguientes temas relacionados con la presente Etapa 4.3 están detallados en los Ejemplos a continuación:

- Ejemplo 10: Perforación de los granos de cebada;
- Ejemplo 11: Preparación de "Conjuntos de harina de granos perforados".

30 **Etapa 4.4:** Preparación de ADNg derivado a partir de harina de endosperma de plantas mutantes

Se sometió separadamente a la harina en cada pocillo de la placa para microtítulo, preparada como se describe anteriormente en la Etapa 4.3, a extracción de ADNg (Figura 2D, acción 5). Dicha extracción utilizó un procedimiento semi-automatizado,

basado en las recomendaciones provistas por el kit NucleoSpin 96 Plant II (Machery-Nagel), brindando "Conjuntos de ADNg" en los cuales un pocillo individual de una placa para microtítulo contiene ADNg derivado de harina de 12 granos de cebada.

5 A los efectos de claridad de la descripción, y no a modo de limitación, los siguientes temas relacionados con la Etapa 4.4 están detallados en los Ejemplos de la presente descripción:

- Ejemplo 12 : Purificación de ADNg a partir de harina de granos perforados ("Conjuntos de ADNg").

10

Etapa 4.5: Análisis de ADNg a partir de endospermas mutantes

Se llevaron a cabo análisis estándar de ddPCR con las muestras de ADNg, preparadas como se describe en la Etapa 4.4 anteriormente, de acuerdo con las recomendaciones provistas por Bio-Rad para la utilización de la lectora de gotas y el
15 aparato generador de gotas QX200, utilizando conjuntos de cebadores para evaluar las mutaciones de interés específicas. Siempre que el análisis de ADNg derivado a partir de un pocillo individual brindaba señales indicando la presencia de ADN mutado en esa muestra (ver Figura 2D, acción 6), había una alta probabilidad de que uno o varios de los granos a partir de los cuales se originaba el ADNg contuviera la mutación
20 de interés.

A los efectos de claridad de la descripción, y no a modo de limitación, el siguiente tema relacionado con la Etapa 4.5 está detallado en los Ejemplos de la presente descripción:

- 25 – Ejemplo 13: Análisis de ADNg basado en ddPCR de harina de granos perforados.

Etapa 4.6: Identificación del grano mutante de interés

Mientras las muestras de la placa para microtítulo rotulada PFGLP contenía harina (ver Etapa 4.3), los pocillos correspondientes en las placas rotuladas PDGLP
30 contenían 12 granos correspondientes, vivos. Concordantemente, la siguiente etapa fue aislar la muestra que consistía en los 12 granos de interés (Figura 2D, acción 7), y subsiguientemente, hacerlos germinar (Figura 2D, acción 8).

A los efectos de claridad de la descripción, y no a modo de limitación, el siguiente tema de la Etapa 4.6 está detallado en la sección de Ejemplos de la presente descripción:

- Ejemplo 14: Germinación de potenciales plantas mutantes.

5

Etapa 4.7: Verificación de rasgos

Una cantidad de métodos están disponibles para el investigador experto para determinar si una potencial mutante posee las características esperadas, es decir, los rasgos de interés. En el presente caso, el ADNg fue extraído a partir de las plántulas germinadas, identificado y propagado como se describe en la Etapa 4.6 anteriormente, y se confirma mediante análisis combinados utilizando ddPCR y secuenciación de ADN cuál de las 12 mutantes potenciales alberga realmente la mutación de interés (ver Figura 2D, acción 9).

15 A los efectos de claridad de la descripción, y no a modo de limitación, los siguientes temas relacionados con la Etapa 4.7 están detallados en la sección de Ejemplos de la presente descripción:

- Ejemplo 15: Detalles de análisis, incluyendo ddPCR y secuenciación de ADN.

20 WS5: Generación y utilización de “Super conjuntos” de ADNg

Etapa 5.1: Identificación de ultra elevada eficiencia de granos de cebada mutados

La presente invención también divulga el uso combinado de dos plataformas analíticas de PCR digital diferentes, lo que mejora los métodos de identificación de mutaciones de baja prevalencia. En la presente, la plataforma RainDrop, comercializada por RainDance Technologies, fue utilizada para encontrar mutaciones en ADN en muestras complejas de ADNgs derivados a partir de plantas mutantes, mientras que aquella de Bio-Rad proporcionó modos para identificar aquellos extractos de granos derivados de mutantes de cebada individuales.

30

A los efectos de claridad de la descripción, y no a modo de limitación, los siguientes temas relacionados con la Etapa 4.7 están detallados en la sección de Ejemplos de la presente descripción:

- Ejemplo 16: Preparación de "Super conjuntos" de ADNg;

- Ejemplo 17: ddPCR con ADNg derivado a partir de "Super conjuntos".

En resumen, simplemente para proporcionar un breve panorama, las WSs y los correspondientes ejemplos están organizados del siguiente modo:

5

WS2:

- Ejemplo 1: Crecimiento de plantas de cebada en "Parcelas de campo";
- Ejemplo 2: Cosecha de granos en "Parcelas de campo" individuales.

WS3:

- 10 – Ejemplo 3: Descripción de granos en "Total de sub-grano ";
- Ejemplo 4: Preparación de harina de granos derivados a partir de una muestra de "Total de sub-harina ";
- Ejemplo 5: Preparación de alícuotas de harina de 25 g (ASFTs);
- Ejemplo 6: Preparación de ADNg de ASFTs;
- 15 – Ejemplo 7: Experimentos basados en ddPCR con ADNg derivado de ASFTs.

WS4:

- Ejemplo 8: Recolección de granos para un "Conjunto de biblioteca de granos";
- Ejemplo 9: Obtención de una "Fracción de un conjunto de biblioteca de granos" a partir de un "Conjunto de biblioteca de granos";
- 20 – Ejemplo 10: Perforación de granos de cebada;
- Ejemplo 11: Preparación de "Conjuntos de harina de granos perforados ";
- Ejemplo 12: Purificación de ADNg de harina de granos perforados ("Conjuntos de ADNg");
- Ejemplo 13: Análisis de ADNg basado en ddPCR de harina de granos perforados;
- 25 – Ejemplo 14: Germinación de potenciales plantas mutantes;
- Ejemplo 15: Detalles de plantas mutantes identificadas a través de relevamientos basados en ddPCR.

WS5:

- Ejemplo 16: Preparación de "Super conjuntos" de ADNg;
- 30 – Ejemplo 17: ddPCR con ADNg derivado de "Super conjuntos".

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Crecimiento de plantas de cebada en "Parcelas de campo".

Se mutagenizaron granos de cebada con NaN_3 como se describe en WS1 en la presente anteriormente. Los granos de cebada mutagenizados fueron propagados en parcelas de campo de 7,5 m². En cada parcela, se sembraron 250 g de granos y se

5

Ejemplo 2: Cosecha de granos de "Parcelas de campo" individuales.

Al momento de la cosecha, las parcelas de campo fueron divididas en 15-17 sub-parcelas cada una conteniendo aproximadamente 300 plantas. Las plantas fueron cosechadas mediante segadora y trilladas y embolsadas –cada sub-parcela individualmente. De esta forma, los granos en una bolsa de "Total de grano" estaban

10

Ejemplo 3: Descripción de los granos en "Total de sub-grano".

Todos los granos de una muestra "Total de grano" fueron divididos en 4 fracciones aleatorizadas de igual tamaño, utilizando un divisor de muestra de granos (*grain riffle sample divider*). Cada fracción representa el 25% de la cantidad de grano total de una muestra "Total de grano". Una de estas fracciones constituye un "Total de sub-grano".

15

Ejemplo 4: Preparación de harina de granos derivados a partir de una muestra de "Total de sub-harina".

Todos los granos de una muestra "Total de sub-grano" fueron ubicados dentro de un molino de granos (Retsch, Grindomix GM200). Los granos fueron molidos durante 30 seg. a 10.000 RPM. La harina resultante ("Total de sub-harina"; ~75 g) fue ubicada dentro de una bolsa de papel y almacenada a 23°C.

20

25

Ejemplo 5: Preparación de alícuotas de harina de 25 g (ASFTs).

A partir de una muestra "Total de sub-harina", se pesó y se separó una alícuota de 25 g de harina. La alícuota de harina de 25 g (ASTF) fue transferida dentro de una bolsa de papel y almacenada a 23°C.

30

Ejemplo 6: Preparación de ADN_g purificado de ASFTs.

Se transfirió una alícuota de harina de 25 g (ASTF) a una botella de vidrio de 250 ml y se resuspendió en 30 ml de H₂O, seguido de adición de 70 ml de buffer de bromuro de

5 cetiltrimetilamonio (CTAB) al 2% calentado a 65°C, conteniendo NaCl 1,4 M, Na₂EDTA 20 mM, Tris-HCl 100 mM, ajustado a pH 8,0 con NaOH 1 M. Luego la solución fue puesta en autoclave, y subsiguientemente, suplementada con 250 µl de RNasa A 10 mg/ml y 250 µl de proteinasa K, fue incubada con mezclado regular para degradar ARN y proteínas. Se transfirió una alícuota de 50 ml a un tubo Falcon de 50 ml, seguido de remoción de precipitados insolubles mediante centrifugación a 4000 rpm durante 10 min, donde luego se transfirieron 24 ml del sobrenadante resultante a un nuevo tubo de 50 ml.

10 Luego de dos extracciones consecutivas con cloroformo (la primera con 15 ml, la segunda con 12,5 ml), se transfirieron 15 ml de la fase acuosa que contiene ácidos nucleicos, incluyendo ADNg, a un tubo de 50 ml conteniendo 30 ml de un buffer CTAB al 0,5% preparado con NaCl 0,04 M, Tris-HCl 50 mM, ajustado a pH 8,0 con NaOH 1 M. El tubo fue invertido 6-8×, y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente antes de la centrifugación a 4000 rpm durante 10 min. Mientras la fase acuosa fue descartada, el precipitado conteniendo el ADNg fue lentamente disuelto en 10 ml de NaCl 1,2 M durante la noche a 8°C. Luego, la extracción fue realizada con 10 ml de cloroformo antes de centrifugación a 4000 rpm durante 15 min. De la fase acuosa, se combinaron 9,5 ml con 5,5 ml de isopropanol y la muestra resultante se invirtió cuidadosamente 6-8×, y luego se incubó a temperatura ambiente durante 20 min, seguido de precipitación de ADNg mediante centrifugación a 4000 rpm durante 10 min.

25 El precipitado conteniendo ADNg fue lavado con 5 ml de etanol 70% antes de la centrifugación a 4000 rpm durante 10 min –descartando el sobrenadante resultante, mientras que el precipitado de ADNg fue secado ~40 min a temperatura ambiente. Luego de la adición de 5 ml de H₂O e incubación durante 30 min a 65°C para resuspender el ADNg, se transfirieron 500 µl del ADNg derivado a partir de "Total de sub-harina" a un pocillo profundo específico de 2 ml de una placa para microtítulo correspondiente. Dicha placa con muestras de diferentes muestras de ADNg derivadas de "Alícuotas de SFTs individuales" fue rotulada "ADNg purificado" y fue, o bien utilizada para almacenamiento a largo plazo, o bien para análisis experimentales.

Ejemplo 7: Experimentos basados en ddPCR con ADNg derivado a partir de ASFTs. Se llevó a cabo la ddPCR utilizando un sistema Droplet Digital PCR QX200 (Bio-Rad), de acuerdo con las instrucciones provistas por el fabricante. Los cebadores

específicos de secuencia y las sondas para tipo salvaje y alelos mutantes se adquirieron a Bio-Rad.

5 A los fines analíticos, 5 µl de ADN_g purificado de ASFTs separadas, ver Figura 2C, o de ADN_g de levadura (preparado como se describe en Yeast WS3) fueron agregados a una mezcla para PCR de 17 µl conteniendo 11 µl Supermix para ddPCR 2× para sondas (N° dUTP; Bio-Rad), cebador para PCR específico de diana 900 nM, 250 nM de sondas para detección de mutantes y de referencia marcadas con 6-carboxi-fluoresceína –FAM y hexaclorofluoresceína– sondas HEX, respectivamente. La sonda para detección de mutantes se une específicamente a la secuencia diana que comprende la mutación, mientras que la sonda para detección de referencia se une específicamente a la secuencia de tipo salvaje. La mezcla de reacción fue cargada en el generador de gotas AutoDG Droplet Generator (Bio-Rad), y la generación de gotas fue llevada a cabo de acuerdo con el manual del fabricante. La emulsión de gotas fue ciclada térmicamente utilizando condiciones estándar para PCR: desnaturalización a 15 95°C durante 10 min, 40 ciclos de PCR a 94°C durante 30 seg. y 55°C durante 1 min, y una extensión final a 98°C durante 10 min antes del almacenamiento de la placa para microtítulo a 8°C. La amplificación por PCR en gotas fue confirmada utilizando la lectora de gotas QX200 Droplet Reader (Bio-Rad). El umbral analítico fue 20 determinado mediante comparación de los resultados del tipo salvaje y la ddPCR sin molde. Todos los datos fueron evaluados por encima del umbral.

Los datos fueron analizados utilizando el programa QuantaSoft, versión v1.7 (Bio-Rad).

25

Ejemplo 8: Recolección de granos para un "Conjunto de biblioteca de granos".

Todos los granos de una muestra "Total de grano" fueron divididos en 4 fracciones aleatorizadas de igual tamaño, utilizando un divisor de muestra de granos (*grain riffle sample divider*). Cada fracción representa el 25% de la cantidad total de grano de una muestra "Total de grano". Un "Conjunto de biblioteca de granos" contenía los granos 30 agrupados de 3 de las fracciones.

Ejemplo 9: Obtención de una "Fracción de un conjunto de biblioteca de granos" a partir de un "Conjunto de biblioteca de granos".

La "Fracción de un conjunto de biblioteca de granos" fue establecida mediante remoción secuencial de 96 muestras de 12 granos cada una a partir de un "Conjunto de biblioteca de granos", en donde cada muestra de 12 granos constituye un subconjunto secundario.

5

Ejemplo 10: Perforación de granos de cebada

Se separaron los granos de la "Fracción de biblioteca de granos" en 96 alícuotas, cada una consistiendo en 12 granos. Cada alícuota de 12 granos fue ubicada sobre un trozo de papel para pesada, y luego consecutivamente fue fijada con un par de fórceps mientras que una máquina de grabado (Marathon-3, Saeyang Microtech) equipada con una mecha de 1,6 mm era utilizada para perforar un orificio pequeño, de 2-3 mm de profundidad en el endosperma. El movimiento rotatorio movía a la harina desde el endosperma hacia la parte superior del grano y los alrededores del papel para pesada. Las muestras de 12 granos perforados fueron ubicadas en pocillos separados de 2 ml de una placa para microtítulo, brindando subconjuntos secundarios de granos de cebada perforados también rotulados como "Conjuntos de granos de cebada perforados a partir de una fracción de conjunto de biblioteca". (Figura 2D, acción 3). Los granos perforados fueron almacenados a 20°C hasta su análisis posterior.

20 **Ejemplo 11:** Preparación de "Conjuntos de harina a partir de granos perforados".

Las 96 muestras de harina, cada una con harina derivada a partir de 12 granos de cebada perforados (como se detalla en el Ejemplo 10), fueron transferidas a pocillos separados de una placa para microtítulo de 1,5 ml ("Conjuntos de harina a partir de granos perforados"; ver Figura 2D, acción 4), manteniendo un sistema de numeración de muestra en correspondencia con aquel de los granos perforados.

25

Ejemplo 12: Purificación de ADNg a partir de harina de granos perforados ("Conjuntos de ADNg").

Los conjuntos de harina de granos de cebada perforados, preparados como se detalla en el Ejemplo 11, fueron sometidos a extracción de ADNg utilizando un procedimiento de extracción de ADN semi-automatizado como se detalla en las instrucciones del kit NucleoSpin 96 Plant II (Macherey-Nagel). Concordantemente, cada pocillo de la placa para microtítulo contenía ADNg a partir de harina de 12 granos (Figura 2D, acción 5).

30

Ejemplo 13: Análisis de ADNg basado en ddPCR de la harina a partir de granos perforados.

Mientras que los ensayos de WS3, ver Figura 2C y Ejemplos 3-7, fueron diseñados para identificar cuál(es) muestra(s) individual(es) de las 96 alícuotas de ADNg, que en total representan el ADNg de ~6000 granos mutados, contenían una mutación nucleotídica de interés, los esfuerzos subsiguientes específicos de WS4, ver Figura 2D, fueron diseñados para destacar granos mutantes específicos.

Como se ilustra en la Figura 2D, acción 6, un esfuerzo primario fue determinar cuál muestra de ADNg a partir de 12 granos distintos brindaría un resultado de ensayo positivo en un análisis de ddPCR. Por lo tanto, utilizando condiciones de reacción y parámetros de análisis idénticos, como se provee en el Ejemplo 7, fue posible distinguir cuál pocillo en una placa para microtítulo contenía el ADNg de interés. Se definió a las muestras comprendiendo un grano mutante heterocigota como teniendo una abundancia fraccional de 5% ($\pm 2,5\%$), aquellas con 10% ($\pm 2,5\%$) comprendiendo un grano mutante homocigota.

En base a los esfuerzos analíticos descritos anteriormente, fue posible identificar y seleccionar potenciales conjuntos de harina, y concordantemente, los correspondientes conjuntos de grano con una mutación nucleotídica de interés. Los mutantes homocigotas y heterocigotas fueron transferidos al suelo en grandes macetas y transferidos al invernadero para su propagación. Todas las plántulas negativas fueron descartadas.

Ejemplo 14: Germinación de potenciales plantas mutantes.

Siempre que el análisis de ADNg a partir de la harina de 12 granos de cebada brindaba una señal de mutante (ver Figura 2D, acción 6), se hacían germinar los granos correspondientes de los "Conjuntos de granos perforados a partir de una fracción de conjunto de bibliotecas" (Figura 2D, acciones 7 y 8).

Ejemplo 15: Detalles de plantas mutantes identificadas a través de los relevamientos basados en ddPCR.

El contenido de un "Conjunto de granos perforados a partir de una fracción de conjunto de bibliotecas", que consistía en 12 granos perforados, fue ubicado en una placa de Petri de 9 mm (preparada con 2 láminas de papel para filtro (8,5 mm;

Whatman) al cual se agregaron 2 ml de H₂O). Luego de la fase de germinación durante 96 h en la oscuridad a 16°C, los granos fueron ubicados dentro de suelo y se hicieron crecer más bajo condiciones controladas durante 7 días. Luego, se eliminaron secciones de tejido de 2×5 mm de las primeras hojas y fueron ubicadas en tubos de 0,2 ml. Se pipetearon 50 µl de solución para extracción (Sigma) sobre cada hoja y se incubaron a 95°C durante 10 min. Las muestras fueron enfriadas hasta temperatura ambiente y mezcladas con 50 µl de solución para dilución (Sigma). Las muestras de ADN_g se finalizaron combinando 10 µl de la mezcla para extracción-dilución con 30 µl de H₂O.

A los fines analíticos, 5 µl de ADN_g purificado fueron agregados a una mezcla para PCR de 17 µl conteniendo 11 µl de Supermix ddPCR 2× para sondas (N° dUTP; Bio-Rad), cebador para PCR específico de diana 900 nM, 250 nM de sondas específicas para mutantes (6-carboxi-fluoresceína – FAM) y específicas para el tipo salvaje (hexaclorofluoresceína – HEX). La mezcla de reacción fue cargada en el generador de gotas AutoDG Droplet Generator (Bio-Rad), y la generación de gotas fue llevada a cabo de acuerdo con el manual del fabricante. La emulsión de gotas fue ciclada térmicamente utilizando condiciones estándar para PCR: desnaturalización a 95°C durante 10 min, 40 ciclos de PCR a 94°C durante 30 seg. y 55°C durante 1 min, y una extensión final a 98°C durante 10 min antes del almacenamiento de la placa para microtítulo a 8°C. La amplificación por PCR en gotas fue confirmada utilizando la lectora de gotas QX200 Droplet Reader (Bio-Rad). El umbral de ensayo fue determinado mediante comparación de los resultados del tipo salvaje y la ddPCR sin molde. Todos los datos fueron evaluados por encima del umbral. Los datos fueron analizados utilizando el programa QuantaSoft (versión v1.7, Bio-Rad). Una plántula individual fue considerada un mutante heterocigota, siempre que el 50% del número total de eventos positivos de ddPCR derivara de la sonda mutante (FAM). Una plántula individual fue considerada un mutante homocigota, cuando el 100% del número total de eventos positivos de ddPCR derivaran de la sonda mutante (FAM). Las plantas mutantes individuales se hicieron crecer hasta madurez (ver Figura 1D, acción 9).

Ejemplo 16: Preparación de "Super-conjunto" de ADN_g.

De manera simple, se agruparon en un "Super-conjunto" una alícuota (por ej., 50 µl) de cada extracto de ADN_g de todos los 94 "Subconjuntos" de una placa de biblioteca.

En algunas formas de realización, los super-conjuntos de ADNg son adicionalmente enriquecidos antes de llevar a cabo el análisis de ddPCR.

5 Así, por ej., 2 µl de ADNg de un super-conjunto pueden ser amplificados en una reacción PCR estándar que comprende por ej., 10 µl de Buffer de Reacción Q5 5X (New England Biolabs), dNTPs 200 µM, ADN Polimerasa Q5 de Alta Fidelidad 0,02U/µl, 100 nM de cebador directo para PCR específico de diana, 100 nM de cebador inverso para PCR específico de diana, 100 nM de una sonda bloqueante y
10 agua. La mezcla para PCR puede luego ser ciclada térmicamente utilizando condiciones estándar para PCR durante approx. 20 ciclos de PCR. Esto conduce a la generación de un super-conjunto enriquecido de ADNg.

15 **Ejemplo 17:** Análisis por ddPCR de ADNg derivado a partir de "Super-conjuntos".

Para reducir el uso de agentes químicos en paralelo con la obtención de tasas de rendimiento mejoradas en los esfuerzos de relevamiento con granos de cebada mutados, se desarrolló un uso combinado de dos tecnologías, de las cuales una fue provista por RainDance Technologies (superior en preparación de gotas) y la otra de
20 Bio-Rad (destacada en el número de muestras a ser procesadas simultáneamente). En términos generales, la tecnología RainDance fue utilizada para identificar muestras específicas, aunque complejas, que contienen moldes de ADNg de numerosos granos mutantes (en la presente a continuación detallados en la sección "Procedimiento A"), mientras que los análisis subsiguientes basados en Bio-Rad ayudaron a identificar
25 granos únicos caracterizados por la mutación de interés (en la presente a continuación detallados en "Procedimiento B").

Procedimiento A: ddPCR basada en RainDance con 16 "Super-conjuntos" de ADNg.

Primero, las gotas para los "Super-conjuntos" individuales (por ej., para 4 a 8 super-
30 conjuntos) fueron generadas utilizando el instrumento fuente RainDrop Source. El ADNg utilizado para la ddPCR basada en RainDance puede ser el extracto de ADNg combinado o puede ser el super-conjunto enriquecido de ADNg preparado como se describe en el Ejemplo 16. Por ej., una alícuota de 20 µl de ADNg de un "Super-conjunto" o una alícuota de 10 µl del super-conjunto enriquecido de ADNg, se
35 combinaron con 25 µl de Supermix for Probes (Bio-Rad); Estabilizador para Gotas

(Droplet Stabilizer) (RainDance); 900 nM del cebador directo específico de diana; 900 nM del cebador inverso específico de diana; 120-250 nM de la sonda para detección de tipo salvaje (VIC); 250-440 nM de la sonda para detección de mutante (FAM), y H₂O para ajustar a un volumen de reacción total de 50 µl. Se agregaron un total de 4-8 mezclas de reacción individuales, que representan 4-8 "Super-conjuntos" individuales de ADNgs, al chip fuente de 8 canales (RainDance), y se procesaron en el Instrumento Fuente (RainDance). El procedimiento completo descrito en la presente anteriormente puede ser repetido para "Super-conjuntos" adicionales, llevando el número total de muestras para análisis subsiguiente de 8 a 16.

Dos tiras de 8 pocillos conteniendo las gotas generadas a partir de las mezclas de reacción, descrito en la presente anteriormente, se sellaron y los contenidos fueron amplificados como se detalla en el Ejemplo 9 en la presente. De allí en adelante, las mezclas amplificadas fueron transferidas al Instrumento Sensor (RainDance), y analizadas utilizando el programa de análisis de datos RainDrop Analyst.

Aquellos "Super-conjuntos" que revelaron señales superiores relacionadas con la mutación de interés –en comparación con la señal promedio de eventos mutantes a lo largo de todos los 16 "Super-conjuntos"– fueron definidos como conteniendo ADNg derivado de potenciales mutantes.

Procedimiento B: Análisis ddPCR basado en Bio-Rad de "Super-conjuntos".

El análisis ddPCR fue llevado a cabo sobre alícuotas de cada una de las 96 muestras de ADNg que constituían un "Super-conjunto" de interés, como se detalla en el Procedimiento A en la presente anteriormente, y había indicado la presencia de un molde mutante. El análisis fue llevado a cabo como se describe en la presente anteriormente para WS3 y WS4.

Particularmente, el análisis de datos apuntaba a seleccionar el conjunto de granos que comprende la mutación predeterminada de interés. Los conjuntos de datos sobre el umbral fueron definidos individualmente con respecto a los gráficos de todos los puntos de datos para una placa completa. Las categorías de análisis –incluyendo, pero no limitado a, gráficos de concentración de diana, abundancia fraccional y eventos de mutación identificada– fueron individualmente evaluados con respecto a la selección candidata.

La abundancia fraccional puede determinarse como: [Señal de ("sonda para detección de mutante")] dividido por [Señales de ("sonda para detección de referencia" + "sonda para detección de mutante ")].

5

Se asumió que las muestras contenían ADN mutante siempre que se observaban las siguientes propiedades:

- Una abundancia fraccional incrementada;
- Un nivel incrementado de gotas mutantes, o;
- 10 – Un número incrementado de eventos mutantes a una escala de 50%, o superior, por encima del promedio.

Ejemplo 18: Relevamiento basado en ddPCR para mutantes de cebada con mutaciones específicas en el gen para glutamina sintasa GS1-3.

- 15 Una planta de cebada que porta una mutación específica fue identificada utilizando los métodos descritos en las Corrientes de Trabajo (WS) y en los Ejemplos anteriormente en la presente. Como se describe, los métodos pueden ser utilizados para la identificación de cualquier mutante. La identificación de una mutación específica, G→A, conduce a la sustitución de una Gly por un residuo ácido Asp en la
- 20 posición 287 de la secuencia para la glutamina sintasa 1 isoforma 3 de cebada (HvGS1-3).

Glutamina sintasa

- 25 La Glutamina sintasa 1 (GS1) es una enzima clave involucrada en la asimilación del nitrógeno en plantas superiores catalizando la condensación de amonio o amoníaco y glutamato en glutamina. En suelos ricos en nitrógeno, la super-disponibilidad de nitrógeno puede conducir a la acumulación incrementada de nitrógeno durante el llenado del grano en cebada, impactando así negativamente en la calidad de la malta. Las mutaciones por inactivación (*Knock-out*) en GS1 pueden conducir a severas
- 30 deficiencias en el crecimiento, resaltando la importancia de la enzima para la adaptación global de la planta (Tomoyuki Yamaya y Miyako Kusano, 2014). Se conocen tres isoformas de GS1 en cebada (HvGS1-1, HvGS1-2, HvGS1-3). De las tres isoformas en cebada, la HvGS1-3 es principalmente activa en el grano en desarrollo y es regulada positivamente bajo condiciones de elevado amonio. Una

estrategia de mutación fue diseñada con el objeto de mantener el desarrollo óptimo de la planta, aunque con reducida capacidad de acumulación de nitrógeno en grano. La estrategia de mutación hizo foco en sustituciones de aminoácidos que reducen la actividad enzimática de GS1-3. Una sustitución de aminoácidos adecuada fue identificada en la posición 287 en la secuencia de la proteína (Protein Seq ID, NCBI: AFX60877.1 –provista en la presente como SEQ ID NO:2). Cambiar el codón GGC (nucleótido 859, 860, 861; número CDS del GenBank NCBI: JX878491.1 –provisto en la presente como SEQ ID NO:1) a GAC, conduce a un intercambio de aminoácido de glicina a ácido aspártico en la posición 287 en la secuencia de la proteína (Protein Seq ID, NCBI: AFX60877.1). Este cambio de aminoácido introducirá un aminoácido cargado negativamente dentro de la secuencia de la proteína. La GS1-3 es un decámero que consiste en dos anillos compuestos de 5 subunidades, con el residuo aminoácido 287 ubicado en la interfase entre los dos anillos y lejos del sitio activo. Así, se establece que la introducción de un aminoácido cargado negativamente no impactaría la capacidad global para catalizar su reacción, sino que podría reducir la actividad enzimática a través de cambios estructurales en el ensamblado del decámero.

Ensayo de ddPCR

Se diseñó un ensayo único de ddPCR, específicamente para distinguir entre el alelo mutante y el alelo del tipo salvaje de HvGS1-3 en la posición nucleotídica 860 en la secuencia codificante del tipo salvaje (número del GenBank NCBI: JX878491.1). La sonda para detección de mutante era complementaria a la secuencia codificante, conteniendo una base A en la posición nucleotídica 860. La sonda para detección de referencia era complementaria a la secuencia codificante, conteniendo una base G en la posición nucleotídica 860. Dos cebadores flanqueantes fueron diseñados para amplificar la secuencia genómica circundante al nucleótido 860 en la secuencia codificante.

Se diseñaron específicamente los siguientes cebadores y sondas para el locus HvGS1-3:

- Cebador directo específico de diana (SEQ ID NO:3):
5'- GTGATCAAGAGGGCGATCAA - 3';
- Cebador inverso específico de diana (SEQ ID NO:4):
5'- CAAGTCTCAACTCGCCGTAT - 3';

- Sonda para detección específica de mutante (SEQ ID NO:5):
5'- AAGACAACGAGCGC - 3' – marcada con 6-carboxifluoresceína (FAM);
- Sonda para detección específica de referencia (SEQ ID NO:6):
5'- AAGGCAACGAGCGC- 3' – marcada con hexaclorofluoresceína (HEX).

5

Se preparó un conjunto de granos de cebada mutagenizados aleatoriamente como se describe en WS1 en la presente anteriormente, seguido de preparación de una biblioteca ordenada.

10 **Determinación de si una muestra de biblioteca contiene granos mutados (WS3)**

La siguiente etapa, en general, fue determinar si la biblioteca contenía granos mutados, esencialmente como se describe para WS3 y en el Ejemplo 7 en la presente anteriormente con las siguientes especificaciones:

- El relevamiento fue llevado a cabo con un total de 376 GLPs (es decir, 376 subconjuntos), representando aproximadamente 120.000 plantas de cebada mutada. Se llevó a cabo la ddPCR esencialmente como se describe en el Ejemplo 7;
- Una muestra de 5- μ l de ADN_g derivada de ADN_g (GT#377-GT#470) se agregó a cada pocillo conteniendo 17 μ l de la mezcla de reacción para PCR y se mezcló minuciosamente mediante pipeteo hacia arriba y hacia abajo.

La placa para microtítulo para PCR fue cargada dentro de la lectora de gotas QX200 Droplet Reader (Bio-Rad) para el análisis de gotas. Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el programa QuantaSoft (versión v1.7, Bio-Rad). El umbral fue determinado utilizando el gráfico 2-D, configurado a 2700 y a 1500 para amplificación para la amplitud del Canal 1 y el Canal 2, respectivamente. La comparación de los valores individuales para la abundancia fraccional mostró que el ADN_g (GT#380) proveyó señales superiores a cualquier otra muestra con respecto a la detección de mutante. La abundancia fraccional de ADN_g (GT#380) fue 0,089% en comparación con 0,0077%, éste último representando la abundancia fraccional promedio de todas las 94 muestras de ADN_g evaluadas.

Hallazgo de grano(s) individual(es) caracterizado(s) por una mutación de interés (WS4)

Los granos de cebada individuales que portan una mutación genética fueron identificados esencialmente como se describe en la presente anteriormente en WS4, incluyendo las siguientes especificaciones ordenadas consecutivamente:

1. En base al análisis del ADNg derivado de GT#377-GT#470 con un ensayo de ddPCR específico de HvGS1-3, se consideró altamente probable que los 4500 granos de GLP#380 [correspondientes a la muestra positiva de ADNg (GT#380)], comprendiera uno o más granos con la mutación génica de interés.
2. La FGLP#380 se estableció mediante remoción secuencial de 96×12 muestras de grano de GLP#380. Cada alícuota de 12 granos fue ubicada sobre un trozo de papel para pesada, y luego consecutivamente fijada con un par de fórceps, al tiempo que se utilizó una máquina para grabado (Marathon-3, Saeyang Microtech) equipada con una mecha de 1,6 mm para perforar un pequeño orificio, de 2-3 mm de profundidad en el endosperma. El movimiento rotatorio movía la harina desde el endosperma hacia la parte superior del grano y el papel de pesada circundante. Las muestras perforadas de 12 granos fueron ubicadas en pocillos de 2 ml separados de una placa para microtítulo, brindando el subconjunto secundario de granos de cebada perforados PDGLP#380. Las 96 muestras de harina, cada una con harina derivada de 12 granos de cebada perforados, fueron transferidas a pocillos separados de una placa para microtítulo de 1,5 ml (PFGLP#380) manteniendo un sistema de numeración de muestra en correspondencia con aquel de los granos perforados.
3. Luego, el PFGLP#380 fue sometido a extracción de ADNg utilizando un procedimiento de extracción de ADN semi-automatizado como se detalla en las instrucciones del kit NucleoSpin 96 Plant II (Macherey-Nagel). Concordantemente, cada pocillo de la placa para microtítulo contenía ADNg de harina de 12 granos.
4. El ADNg derivado del PFGLP#380 fue analizado como se describe anteriormente. Los datos fueron analizados utilizando el programa QuantaSoft (versión v1.7, Bio-Rad). El umbral fue determinado utilizando el gráfico 2-D y configurado a 2700 para la amplitud del Canal 1 y a 1500 para la amplitud del Canal 2. La comparación de los valores individuales para la abundancia fraccional mostró que ninguna de las muestras de PFGLP#380 contenía un grano mutante. Dado que fue considerado altamente probable que GLP#380 contenía un grano mutante, se decidió preparar y analizar muestras adicionales estableciendo una segunda FGLP (FGLP#380-2).

- Esto resultó en la preparación de PDGLP#380-2 y PFGLP#380-2. El ADN_g de PFGLP#380-2 fue analizado como se describe anteriormente. Los datos fueron analizados utilizando el programa QuantaSoft (versión v1.7, Bio-Rad). El umbral fue determinado utilizando el gráfico 2-D y configurado a 2700 para la amplitud del Canal 1 y a 1500 para la amplitud del Canal 2. Se identificaron tres pocillos individuales en la placa para microtítulo (C02, F04, F05) que mostraron una abundancia fraccional de 4,02%, 4,11% y 5,55%, todos indicando la presencia de tres mutantes individuales heterocigotas en 3 pocillos independientes de PDGLP#380-2.
5. Se hicieron germinar todos los 12 granos de los pocillos C02 y F04 de PDGLP#380-2. Se cosechó el material de hoja de todas las 24 plántulas y se sometieron a extracción de ADN utilizando REDEExtract (Sigma Aldrich). El ADN_g derivado de las muestras de hoja fue analizado como se describe anteriormente. Los datos fueron analizados utilizando el programa QuantaSoft (versión v1.7, Bio-Rad). El umbral fue determinado utilizando el gráfico 2-D y configurado a 2700 para la amplitud del Canal 1 y a 1500 para la amplitud del Canal 2. Una plántula derivada del pocillo C02 de PDGLP#380-2 mostró una abundancia fraccional de 41%, confirmando la presencia de una mutante heterocigota. Una plántula derivada del pocillo F04 de PDGLP#380-2 mostró una abundancia fraccional de 39,6%, confirmando la presencia de una mutante heterocigota.
6. Se llevó a cabo una verificación adicional de rasgos utilizando secuenciación directa en ambas mutantes identificadas y una muestra de referencia. El ADN fue extraído a partir de material de hoja utilizando el procedimiento de extracción de ADN REDEExtract (Sigma Aldrich). Para el análisis de secuenciación se preparó una reacción para PCR de 50 µl que contenía 1 µl de ADN_g purificado, 20 µl de REDEExtract (Sigma Aldrich), 500 nM de un cebador directo específico de diana, 500 nM de un cebador inverso específico de diana y agua. Las muestras fueron cicladas térmicamente utilizando las siguientes condiciones de PCR: desnaturalización a 94°C durante 2 min, 38 ciclos de PCR a 94°C durante 45 seg., 58°C durante 45 seg. y 72°C durante 45 seg., y una extensión final a 72°C durante 5 min antes de almacenamiento de la placa para PCR a 8°C. Los productos individuales de PCR fueron purificados utilizando el gel NucleoSpin Gel y el kit de limpieza para PCR. Todas las muestras fueron secuenciadas utilizando un cebador directo específico de diana y un cebador inverso específico de diana.

7. Ambas plántulas que fueron identificadas positivas para la mutación en el análisis de ddPCR fueron heterocigotas con respecto al genotipo en la ubicación genómica predeterminada. La muestra de referencia mostró un genotipo de tipo salvaje homocigota en la misma ubicación.

5

Ejemplo 19: Análisis de formas recombinantes de glutamina sintasa de cebada.

La síntesis de tres variantes recombinantes de HvGS1-3 utilizó células hospedadoras de *E. coli*, seguido de enriquecimiento de la enzima a un elevado grado de pureza mediante purificación por afinidad. Las siguientes variantes fueron expresadas en *E.coli*:

10

- Q: referencia de tipo salvaje – SEQ ID NO:1;
- 3864: SEQ ID NO:1 con un intercambio de aminoácido G287D, es decir, correspondiente a la proteína mutante expresada por una planta de cebada mutante (identificada como se describe en el Ejemplo 18).
- LR: SEQ ID NO:1 con un intercambio de aminoácido D300N, es decir, una variante de enzima en la cual se espera que el cambio tenga poco impacto sobre la actividad enzimática.

15

Las actividades de las tres variantes de HvGS1-3 fueron determinadas siguiendo la síntesis de glutamil-hidroxamato a partir de glutamato, hidroxilamina y ATP en presencia de la enzima. La cinética enzimática fue determinada para las tres variantes de

20

HvGS1-3 a diferentes concentraciones de glutamato e hidroxilamina, mostrándose los resultados en la Tabla 1 y en la Tabla 2, respectivamente.

25

Mientras que las k_{cat} y k_{cat}/K_M para HvGS1-3 Q y LR fueron similares, la HvGS1-3 3864 consistentemente reveló valores que fueron uno o dos órdenes de magnitud más bajos en comparación con las otras dos variantes. Los datos cinéticos indicaron que la mutación identificada en HvGS1-3 3864, Gly 287 a Asp, tuvo un impacto severo en la unión y la utilización de cualquier sustrato en esta variante. Los valores cinéticos sobre unión a, y utilización de, ATP no pudieron ser determinados debido al alto grado de variabilidad en absorbancia del nucleótido a concentraciones elevadas de sustrato.

30

Tabla 1. Cinética enzimática de las variantes HvGS1-3 en presencia de distintas concentraciones de glutamato. Respecto de Q, LR y 3864, los números entre paréntesis se refieren a la cantidad total de proteína, en μg , de la reacción.

	Q (0,1)	LR (0,1)	3864 (0,5)
K_M (mM)	8,68	13,93	63,41
$v_{\max}$ (mM $\text{min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$)	0,66	0,58	0,20
k_{cat} (min^{-1})	6,6	5,8	0,4
k_{cat}/K_M (mM min^{-1})	0,76	0,42	0,01

5 **Tabla 2.** Cinética enzimática de las variantes HvGS1-3 en presencia de distintas concentraciones del sustrato hidroxilamina. Respecto de Q, LR y 3864, los números entre paréntesis se refieren a la cantidad total de proteína, en μg , de la reacción.

	Q (0,1)	LR (0,1)	3864 (0,5)
K_M (mM)	2,79	2,58	3,68
$v_{\max}$ (mM $\text{min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$)	0,64	0,53	0,11
k_{cat} (min^{-1})	6,4	5,3	0,22
k_{cat}/K_M (mM min^{-1})	2,29	2,05	0,06

10 A fin de determinar si la oligomerización del complejo GS1-3 era afectada en cualquiera de las dos variantes en comparación con Q, se corrió primero una alícuota de HvGS1-3 purificado en una columna de exclusión por tamaño. Todas las tres variantes tuvieron un pico mayor al mismo volumen de elución.

15 A continuación se describe un relato detallado en 6 etapas, de los experimentos que fueron utilizados a fin de obtener los resultados descriptos en este ejemplo.

Etapla 1: Diseño de la secuencia génica de HvGS1-3 para la expresión génica heteróloga.

20 La secuencia codificante de la isoforma de glutamina sintasa de cebada GS1-3 (HvGS1-3), depositada en el GenBank con el número de acceso JX878491.1, fue utilizada como base para la síntesis de 3 secuencias génicas correspondientes (GenScript, China), que representan ya sea HvGS1-3 (Q) de tipo salvaje y dos formas que contienen mutaciones (3864 o LR). El gen de GS1-3 de tipo salvaje y las

secuencias proteicas se proveen en la presente como SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2, respectivamente. Las secuencias de ADN que codifican proteína de todas las tres variantes fueron insertadas dentro del plásmido para expresión en *E. coli* pET-28a(+) adquirido de MerckMillipore (Alemania), seguido de transformación de células de *E. coli* de la cepa BL21(DE3), utilizando métodos estándar.

Etapas 2: Expresión heteróloga de HvGS1-3

Se utilizaron las células de *E. coli* BL21(DE3) transformadas con HvGS1-3 Q o sus variantes en pET-28a(+). Las bacterias fueron cultivadas en medio LB conteniendo 30 µg/ml de kanamicina bajo condiciones estándar. La expresión génica fue inducida con adición de β-D-1-tiogalactopiranosido de isopropilo (IPTG, Sigma-Aldrich) 250 µM. La expresión fue llevada a cabo a 37°C durante 4 h a 120 rpm. Las células fueron cosechadas mediante centrifugación a 4000 ×g durante 15 min a 8°C. Mientras que el sobrenadante fue descartado, los pellets de células fueron resuspendidos en 10 ml de buffer A (Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, NaCl 500 mM, MgCl₂ 1 mM). Las células resuspendidas fueron congeladas a -20°C hasta uso posterior.

Etapas 3: Lisis celular de células de *E. coli* BL21(DE3) luego de la expresión del gen recombinante

Las células transformadas, congeladas de *E. coli* BL21(DE3) fueron primero descongeladas, y luego tratadas utilizando un sonicador celular Vibra (Sonics & Materials Inc., EE.UU.) a 30% de amplitud durante 90 seg., con pulsos de 5 seg. y pausas de 5 seg., sobre hielo húmedo. Luego de la sonicación, se digirió el ADN durante 10 min utilizando DNasa I 5 µg/ml (Sigma-Aldrich). Las células lisadas fueron removidas mediante centrifugación durante 10 min a 13.000 ×g y 4°C. Se hizo pasar el sobrenadante a través de un filtro de 0,45 µm de una jeringa hacia un nuevo tubo.

Etapas 4: Enriquecimiento de HvGS1-3 mediante cromatografía de afinidad por metal inmovilizado.

Una cromatografía de afinidad por metal inmovilizado (IMAC, por sus siglas en inglés), de 1 ml cargada con una solución de níquel, fue lavada con cinco volúmenes de columna de agua doblemente destilada y equilibrada con el mismo volumen de buffer A (cuya composición se detalló anteriormente). La fracción soluble, filtrada, fue inyectada manualmente dentro de una columna equilibrada utilizando una jeringa, con

material no unido recolectado y mantenido a 4°C. El material de columna lábilmente unido fue separado por lavado utilizando buffer A, conteniendo imidazol 50 mM (Sigma-Aldrich), con 10 volúmenes de columna (CV). La HvGS1-3 fue eluida y recolectada bajo condiciones similares, utilizando buffer A, conteniendo imidazol 400 mM, con 10 CV. Las soluciones de proteína eluida fueron diafiltradas 4× en una unidad de filtro centrífugo hecho con celulosa regenerada, que tiene un corte molecular nominal de 10.000 (Millipore, Irlanda), contra buffer A [mediante centrifugación a 3000×g (SL-16R) a 8°C durante 20 min, para remover el imidazol en exceso].

Etapas 5: Ensayo de actividad *in vitro* de HvGS1-3 recombinante

Se utilizó una adaptación del ensayo de actividad descrito por Wellner y Meister (1966) para determinar los cambios en la actividad de las dos variantes HvGS1-3 (en comparación con aquella de HvGS1-3 Q). Una reacción de 50 µl contenía Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, MgCl₂ 50 mM, ATP 20 mM, diferentes concentraciones de γ-glutamato hidroxilamina (cuando variaba L-glutamato; de otro modo 50 mM), diferentes concentraciones de L-glutamato (cuando variaba glutamato hidroxilamina; de otro modo 50 mM). Las reacciones fueron configuradas en una microplaca de 96 pocillos de fondo plano, y de media área (Corning, EE.UU.), equilibrada a 37°C. La reacción fue iniciada mediante la adición de HvGS1-3 purificada a una concentración final de 1 o 5 µg/ml. Luego de 30 min, la reacción fue detenida mediante adición de 50 µl de Fe(III)Cl₃ 370 mM, TCA 200 mM, HCl 670 mM. Luego se midió la A_{540 nm} del fondo en una lectora de microplacas SpectraMax 340PC384 (Molecular Devices, EE.UU.), utilizando corrección de trayectoria para considerar las diferencias menores en volumen. Los datos fueron graficados utilizando GraphPad Prism (versión 4, GraphPad Software, EE.UU.).

Etapas 6: Cromatografía de exclusión por tamaño

Cantidades iguales de las tres variantes de HvGS1-3 fueron cargadas individualmente en una columna para exclusión por tamaño 10/300 que contiene Superdex 200 (GE Life Sciences, EE.UU.), y equilibrada en buffer A en una FPLC ÄKTA (GE Life Sciences). La elución de la proteína unida fue llevada a cabo a 0,5 ml/min y la elución de proteína fue seguida por medición de A₂₈₀.

Ejemplo 20: Análisis de ddPCR con ADNg derivado a partir de células de levadura mutagenizadas.

A los efectos de claridad, y no a modo de limitación, se detallan los siguientes temas en el presente ejemplo:

- **Parte 1:** Preparación de un cultivo de levadura mutagenizado aleatoriamente
- **Parte 2:** Preparación de una biblioteca ordenada
- **Parte 3:** Identificación del pocillo que contiene ADNg con una mutación predefinida
- **Parte 4:** Enriquecimiento de células de levadura caracterizadas por una mutación predeterminada

WS1: Preparación de un cultivo de levadura mutagenizado aleatoriamente

Etapas 1.1: Procedimiento de mutagénesis

Para inducir mutaciones, la cepa de levadura es sometida a tratamiento con MNNG (Metilnitronitrosoguanidina) de acuerdo con el protocolo descrito en *Methods in Molecular Biology*, Yeast Protocols, V. 313, 2006).

La MNNG es un mutágeno conocido que alquila la guanidina o la tiamina del ADNg que es seguida por la transición del par G•C a A•T al momento de la replicación del ADNg. El método descrito en esta sección apunta a identificar la mutación puntual en el gen de interés que altera el codón de aminoácido definido a un codón stop prematuro. La persona experta será capaz de adaptar el método para la identificación de otras clases de mutaciones. La mutación puntual conduce así a la proteína truncada y correspondientemente, no funcional o defectuosa. Las mutaciones puntuales deseables para crear el codón stop están definidas en base a la secuencia del gen/proteína diana. Otras mutaciones puntuales que afectan regiones regulatorias del gen de interés son identificables mediante este método también.

La mutagénesis es llevada a cabo en el cultivo de levadura por ej., con el conteo de células totales 2×10^7 . El estado mutante de las células de levadura para la mutagénesis es determinado y ajustado para asegurar la tasa de mutación deseable. Las condiciones de mutagénesis son típicamente ajustadas para dar una tasa de

sobrevida de 60-70%. La concentración de mutágeno y tiempo de exposición varían dependiendo de la cepa de levadura.

WS2: Preparación de una biblioteca ordenada

5

Etapas 2.1: Viabilidad celular

El título de células viables es determinado y todas las células de levadura mutagenizadas son inoculadas en alícuotas dentro de placas de 96 pocillos con YPD utilizando el robot Biomek FXp. Se inoculan 3000-5000 células individuales viables por pocillo.

10

WS3: Identificación del pocillo que contiene ADNg con una mutación predefinida

Etapas 3.1: Preparación de una biblioteca de células de levadura mutagenizadas

Las células de levadura mutagenizadas inoculadas en placas de 96 pocillos de la Etapa 1.1 son consideradas como una biblioteca total que contiene levadura mutada para diana. Las células de levadura son incubadas durante 3 d para permitir la saturación de crecimiento. La biblioteca es amplificada mediante re-inoculación dentro de medio mínimo para crecimiento con el robot Biomek FXp (etapa de copiado) para utilizar en el aislamiento de ADNg luego de 3 días de crecimiento. El resto de la suspensión celular de levadura en las placas de 96 pocillos es preservado con glicerol (15% de la concentración final) a -80°C para aplicación corriente abajo para aislar la levadura mutante deseada.

20

Etapas 3.2: Aislamiento de ADNg a partir de levadura

25

Para preparar el ADNg, las células de levadura son transferidas a una placa de 96 pocillos para aislamiento de ADN y son sometidas al procedimiento de aislamiento de ADN utilizando robótica (Biomek FXp, kit Agencourt DNAdvance y protocolo de Beckman Coulter). El procedimiento sigue las instrucciones del fabricante, con una etapa adicional que utiliza enzima Lyticase para digerir la pared celular de las levaduras y romper las células. El protocolo emplea la precipitación de ADNg con perlas magnéticas. El ADNg en una placa de 96 pocillos es utilizado para aplicación corriente abajo para identificar el conjunto positivo para la mutación predeterminada. La concentración de ADN es medida utilizando la lectora de placa de 96 pocillos, con

30

la concentración del ADN ajustada a 25 ng/5 µl y es utilizado directamente para la ddPCR. El ADN original concentrado en las placas de 96 pocillos es almacenado para uso posterior.

5 **Etapas 3.3:** Análisis de las muestras mediante ddPCR

El ADNg preparado en la Etapa 2.2 en formato de placa de 96 pocillos es cuantificado y la concentración es ajustada a 25 ng/5 µl. Se incluyen las muestras de ADN de control positivo y negativo. Subsiguientemente, se lleva a cabo el análisis de ddPCR en cada muestra de ADNg esencialmente como se describe en el Ejemplo 7. En ese momento, se puede aplicar un arreglo de sondas que reconocen diferentes mutaciones puntuales en varias o en todas las posiciones posibles en la secuencia génica, las cuales crean un codón stop prematuro, para mejorar las chances de identificación de la mutante. El método permite la identificación de los pocillos positivos para la mutación deseada, es decir, los pocillos que comprenden levadura que porta la mutación deseada.

WS4: Enriquecimiento de células de levadura caracterizadas por una mutación predeterminada

20 **Etapas 4.1:** Preparación de una biblioteca de levadura agrupada (*pooled*)

Se descongela una placa de 96 pocillos que comprende el pocillo positivo para la mutación y las células de levadura revividas mediante inoculación del contenido del pocillo positivo dentro de caldo YPD fresco (1:10) son incubadas durante 4-6 h con rotación a temperatura ambiente. Para asegurar la ausencia de proliferación adicional de las células de levadura, el cultivo de levaduras revivido es almacenado en un refrigerador hasta el plaqueo corriente abajo y hasta que se complete el aislamiento exitoso del cultivo mutante puro. Antes del plaqueo, las células de levadura viables son contadas y diluidas con PBS conteniendo EDTA 1 mM, y subsiguientemente son plaqueadas sobre placas cuadradas Qpix con agar YPD para obtener 2000-3000 colonias por placa. El número de placas a preparar de esta forma depende del título de células de levadura viables luego de reviviscencia del stock congelado y del progreso de la identificación de mutantes. Por ejemplo, 10-12 placas Qpix pueden ser inoculadas con hasta 50.000 células individuales que originan colonias individuales. La identificación del conjunto positivo descrito en la Parte 3, siendo la relación de tipo salvaje:mutante de hasta 1:5000 sugiere que entre las 50.000 células individuales al

menos 10 células son las mutantes diana. El crecimiento de las colonias es monitoreado para asegurar el tamaño y la distancia apropiados entre colonias, para poder tomar las colonias individuales con el robot Qpix. Una vez que las colonias están listas para ser tomadas, se crea una biblioteca de placas de 96 pocillos con células de levadura crecidas con YPD de la siguiente manera: las colonias de todas las placas Qpix son recolectadas aleatoriamente en diez placas de 96 pocillos, así cada pocillo contiene el conjunto de 50 colonias con la relación potencial mínima de tipo salvaje:mutante equivalente a 1:50. Estas placas son procesadas adicionalmente para aislar ADNg y también para preparar stock congelado y almacenado a -80°C para aplicación adicional corriente abajo, como se describe en la Etapa 3.1 (WS3).

Etapa 4.2: Aislamiento de ADNg de levadura a partir de una biblioteca agrupada (*pooled*)

Para preparar el ADNg a partir de los conjuntos de 50 colonias aisladas, se reinoculan los cultivos de levadura en una placa de 96 pocillos obtenida en la Etapa 3.1 en medio mínimo fresco para crecimiento. Una vez que el crecimiento es suficiente, los cultivos de levadura son sometidos al procedimiento de aislamiento de ADN utilizando robótica, como se describe en la Etapa 3.2 (WS3). La concentración de ADN se mide utilizando la lectora de placas de 96 pocillos, y la concentración del ADN se ajusta a 25 ng/5 µl, y se utiliza una alícuota directamente para la ddPCR. El ADNg original concentrado en el formato de placas de 96 pocillos es preservado. El ADNg en una placa de 96 pocillos es utilizado para aplicación corriente abajo para identificar el conjunto/pocillo positivo con la mutación predeterminada. Se prepara un total de 10 placas de 96 pocillos con ADNg.

Etapa 4.3: Análisis de las muestras mediante ddPCR

El ADNg preparado en la Etapa 3.2 en el formato de placa de 96 pocillos es cuantificado y la concentración es ajustada a 25 ng/5 µl. Se incluyen las muestras de ADN de control positivo y negativo. Se lleva a cabo el análisis de ddPCR subsiguiente en cada muestra de ADNg, esencialmente como se describe en el Ejemplo 7. Si se utilizan múltiples sondas en la Etapa 3.3, entonces en esta etapa solamente se aplica(n) la(s) sonda(s) que dio(dieron) identificación positiva del conjunto positivo en la Etapa 3.3. El método permite la identificación del(de los) subconjunto(s) positivo(s) con una mutación predeterminada.

Etapas 4.4: Preparación de una biblioteca de levadura de única colonia

Una placa de 96 pocillos congelada con pocillo(s) positivo(s), identificada en la Etapa 4.3, se utiliza para separar mediante plaqueo el crecimiento de colonias individuales. Un cultivo de levadura de un pocillo positivo es inoculado dentro de caldo YPD fresco y se hace crecer durante la noche. Se plaquean 1000 células sobre agar YPD (formato de placa cuadrada Qpix) para brindar colonias individuales. Las colonias crecidas son tomadas por el robot Qpix dentro de diez placas de 96 pocillos con caldo YPD como medio de crecimiento. Estas placas son procesadas adicionalmente para aislar ADN_g y también para preparar stock congelado para aplicación adicional corriente abajo, como se describe en la Etapa 3.1 (WS3).

Etapas 4.5: Aislamiento de ADN_g a partir de una biblioteca de colonias únicas

El ADN_g se prepara como se describe en la Etapa 4.2.

Etapas 4.6: Análisis de las muestras mediante ddPCR

El ADN_g preparado en la Etapa 4.5, es decir, en el formato de placa de 96 pocillos es cuantificado y la concentración es ajustada a 25 ng/5 µl. Se incluyen las muestras de ADN de control positivo y negativo. Se lleva a cabo el análisis de ddPCR subsiguiente como se describe en el Ejemplo 7. En ese momento, solamente se aplica(n) la(s) sonda(s) que dio(dieron) una identificación positiva en la Etapa 3.1. El método permite la identificación del cultivo de levadura puro con la mutación predeterminada. El método permite determinar el estado homocigota o heterocigota del aislado.

Etapas 4.7: Aislamiento de un cultivo puro de levadura mutante

Para preparar el stock de la levadura mutante, se separa mediante plaqueo una suspensión de levadura del(de los) pocillo(s) positivo(s) en el agar YPD para obtener el crecimiento de las colonias aisladas. Se toman 3 colonias manualmente y se procesan adicionalmente como réplicas biológicas.

Etapas 4.8: Secuenciación del gen diana o de una extensión de ADN_g de interés

Los aislados de mutante de levadura con la mutación identificada a partir de la Etapa 4.7 (WS4) son utilizados para aislamiento de ADN_g, seguido de PCR específica, clonación del fragmento de ADN obtenido y secuenciación de ADN para confirmar la identidad de la mutación.

Etapas 4.9: Funcionalidad de la mutación

El mutante de levadura con una mutación homocigota de interés es utilizado directamente para confirmar que la mutación tiene el efecto esperado. Si se determina un estado heterocigota, y se encuentra insuficiente para proveer el efecto esperado, entonces la mutagénesis es ya sea, repetida, o el aislado de levadura sufre esporulación seguida de segregación de la mutación para confirmar el estado homocigota y el fenotipo mutante. El aislado de levadura con la mutación de interés es utilizado directamente para el propósito aplicado, o es utilizado en el mejoramiento de levadura para controlar el fenotipo deseable.

Ejemplo 21

En *Saccharomyces cerevisiae*, la descarboxilasa de ácido ferúlico Fdc1 es esencial para la descarboxilación de ácidos carboxílicos aromáticos incluyendo ácido cinámico o cumárico. La reacción de descarboxilación convierte los sustratos en sus correspondientes derivados vinílicos, algunos de los cuales son conocidos como compuestos activos de sabor. Durante la fermentación de cerveza por ejemplo, la Fdc1 convierte ácido ferúlico del mosto de cerveza en 4-vinil-guayacol, el cual se vuelve notorio como notas de tipo clavo en la cerveza final. Mientras que estas notas son típicas para ciertas cervezas, especialmente las cervezas de trigo alemanas, son consideradas sabores no deseados fenólicos (POF por sus siglas en inglés) en otros, incluyendo cervezas lager. Aquí se describe la identificación de *S. cerevisiae* que porta una mutación sin sentido en el gen *ScFDC1* mediante métodos no-GMO. Se espera que esta levadura identificada sea una cepa de levadura POF negativa.

En la industria de la alimentación, el uso de técnicas de genética molecular para modificar organismos seleccionados no es deseable, y se basa en el uso de técnicas de mutagénesis aleatoria clásicas y relevamientos prolongados para identificar cepas de interés. El método descrito más abajo describe una técnica que insume menos tiempo para identificar cepas que portan una mutación seleccionada de interés dentro de una población de organismos mutagenizados aleatoriamente. Más específicamente, en este ejemplo se describen cepas de levaduras que portan una mutación sin sentido específica (W159*) resultante de una transición G a A en la posición +476 del gen *ScFDC1* en la cepa FS0105 de *S. cerevisiae* var. *diastaticus*. La secuencia del gen *ScFDC1* está disponible en GenBank bajo el número NCBI:

NM_001180847, la secuencia de ADNc está provista en la presente como SEQ ID NO:26 y la secuencia de aminoácidos de fdc1 es provista como SEQ ID NO:7.

5 **WS1: Preparación de una población mutagenizada aleatoriamente de células de levadura FS0105.**

Etapas 1.1: Mutagénesis por EMS en la cepa FS0105.

Para inducir mutaciones, la cepa de levadura FS0105 fue sometida a tratamiento mediante metansulfonato de etilo (EMS por sus siglas en inglés) de acuerdo con el
10 protocolo descrito en "Methods in Yeast Genetics" (CSHL Press, 2000). Brevemente, se hizo crecer la cepa FS0105 durante la noche en medio YPD hasta fase estacionaria. Las células fueron cosechadas mediante centrifugación y lavadas una vez con agua destilada estéril y una vez con buffer fosfato de sodio 0,1 M (pH 7). Las células fueron finalmente re-suspendidas en buffer fosfato 0,1 M hasta
15 aproximadamente 2×10^8 células/ml. Se agregaron 30 µl de EMS a 1 ml de células en un tubo de reacción de cierre seguro de 2 ml y las células fueron incubadas durante aproximadamente 75 minutos a 30°C y 1000 rpm en un Eppendorf Thermomixer Comfort (1,5 ml), lo cual usualmente dio por resultado una tasa de muerte de ~60-80% para la cepa FS0105. Para detener la mutagénesis, las células fueron pelletizadas
20 mediante centrifugación breve y lavadas tres veces con solución de tiosulfato de sodio 5% estéril, recientemente preparada, y una vez con agua destilada estéril. Las células fueron finalmente re-suspendidas en 1 ml de YPD e incubadas durante 1 hora a 30°C y 1000 rpm en un Eppendorf Thermomixer Comfort (1,5 ml). En esta etapa las células pudieron ser almacenadas a 4°C o fueron inmediatamente utilizadas para procesos
25 aguas abajo, por ej. determinación de tasas de muerte mediante plaqueo en medio complejo.

La literatura sugería que colocar células de levadura mutagenizadas bajo presión selectiva inmediatamente después de mutagénesis daría por resultado un número incrementado significativo de mutaciones por célula (Lada *et al.*, 2013; Den Abt *et al.*,
30 2016), lo cual podría reducir significativamente el número de células de levadura a ser relevadas con el objeto de identificar una mutación de interés. En consecuencia, se plaquearon aproximadamente 2×10^7 células vivas pero mutagenizadas por placa sobre placas de medio SD conteniendo 2 µg/ml del herbicida metsulfurón metil y se incubaron las placas durante varios días a 30°C hasta que se mostraran colonias
35 resistentes en las placas para selección. El objetivo eran aproximadamente 50.000

colonias resistentes al herbicida, en general. Para aumentar adicionalmente el número de mutaciones por célula, se separaron de las placas por lavado las células resistentes al herbicida con buffer fosfato de sodio 0,1 M estéril (pH 7), diluyéndolas a aproximadamente 2×10^8 células/ml y se repitió la mutagénesis por EMS como se describe arriba. Este ciclo de mutagénesis y selección fue repetido cuatro veces en total.

WS2: Preparación de una biblioteca aleatoria de células de levadura FS0105 mutagenizadas aleatoriamente.

Etapas 2.1: Creación de una biblioteca aleatoria total de células de levadura FS0105 mutagenizadas.

Después de la cuarta y última ronda de mutagénesis por EMS (ver Etapa 1.1), se determinó el título de células viables mediante plaqueo de respectivas diluciones en placas de medio complejo. Subsiguientemente, se esparcieron aproximadamente 1200-1500 células vivas/placa sobre placas YPD, y se incubaron placas de Petri a 30°C durante tres días. A partir de 96 placas separadas, se separaron las células por lavado con 3 ml de buffer fosfato de sodio 0,1 M cada una, para formar 96 “conjuntos de bibliotecas”. Aproximadamente 5×10^7 células de estos conjuntos de bibliotecas fueron subsiguientemente utilizados para aislamiento de ADN (ver más abajo), mientras que las células remanentes fueron decantadas por centrifugación, re-suspendidas en glicerol 40%/YP 10%, y congeladas a -80°C para establecer una “biblioteca aleatoria total” de 96 conjuntos de bibliotecas conteniendo aproximadamente 120.000-150.000 clones FS0105 mutagenizados por EMS en general.

WS3: Identificación de conjuntos de bibliotecas que contienen clones con una mutación sin sentido Scfdc1 seleccionada en la biblioteca aleatoria total FS0105

Etapas 3.1: Aislamiento de ADN genómico de levaduras a partir de la biblioteca aleatoria total FS0105.

Se aisló ADN genómico de cada conjunto de la biblioteca aleatoria total utilizando el kit PureLink® Pro 96 Genomic DNA Kit (Invitrogen) y un EveryPrep™ Universal Vacuum Manifold (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración de ADN de cada muestra fue determinada utilizando un instrumento

NanoDrop 1000 3.8.1 y las soluciones de ADN fueron ajustadas hasta una concentración final de 5 ng ADN/μl con agua estéril libre de ADNasa. Las muestras de ADN fueron almacenadas en una placa de PCR de 96 pocillos a -20°C hasta su uso.

5

Etapas 3.2: Análisis de muestras de ADNg del conjunto de bibliotecas mediante ddPCR.

Se diseñó un ensayo de ddPCR especial, específicamente para distinguir entre el alelo mutante y el alelo de tipo salvaje ScFDC1 en la posición nucleotídica +476 en la secuencia codificante de tipo salvaje de la cepa FS0105. El correspondiente codón TGG es idéntico a la secuencia de ScFDC1 de la cepa S288C de referencia de laboratorio, común, en esta posición (GenBank número NCBI: NM_001180847). La sonda para detección de mutantes era complementaria a la secuencia codificante, conteniendo una base A en la posición nucleotídica +476. La sonda para detección de referencia era complementaria a la secuencia codificante, conteniendo una base G en la posición nucleotídica +476. Se diseñaron dos cebadores flanqueantes para amplificar la secuencia genómica que rodea el nucleótido +476 en la secuencia codificante. El ensayo fue diseñado utilizando la herramienta de diseño BioRads Droplet Digital PCR Assays para detección de mutaciones. Se desarrollaron los siguientes cebadores y sondas para el locus ScFDC1 específico:

20 cebador directo específico para diana (5'- CATGTTTCAGACGGTGG - 3')(SEQ ID NO:13)
cebador inverso específico para diana (5'- CATACCTCTAGCAATTGACC - 3')(SEQ ID NO:14)
25 sonda para detección de mutantes (5'- ACGTACGGAATGTAGATTCT - 3')(SEQ ID NO:15) – etiquetada con 6-carboxifluoresceína – FAM
sonda para detección de referencia (5'- ACGTACGGAATGTGGATT - 3')(SEQ ID NO:16) – etiquetada con hexaclorofluoresceína – HEX.

30 La siguiente etapa, en general, fue para determinar si la biblioteca contenía cepas de levaduras mutadas. El relevamiento fue llevado a cabo con un total de 96 conjuntos de bibliotecas de levaduras, comprendiendo cada uno 1200-1500 colonias de levaduras mutagenizadas y representando un total de aproximadamente 120.000-150.000 cepas de levaduras mutadas. La ddPCR fue llevada a cabo esencialmente

como se describe en el Ejemplo 7. Muestras de ADN_g de 5 µl de ADN_g de 96 conjuntos de cepas de levaduras mutagenizadas fueron agregadas a cada pocillo de una placa para microtítulo conteniendo 17 µl de la mezcla de reacción de PCR y se mezcló exhaustivamente pipeteando hacia arriba y hacia abajo.

- 5 La placa para microtítulo para PCR fue cargada sobre el instrumento QX200 Droplet Reader (Bio-Rad) para análisis de las gotas. Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el software QuantaSoft (versión v1.7, Bio-Rad). El umbral fue determinado utilizando el diagrama 2-D, configurado a 2700 y 1500 para amplificación para amplitud de Canal 1 y Canal 2, respectivamente. La comparación de los valores
- 10 individuales para abundancia fraccional mostró que el ADN_g con coordenadas de placa G01 proporcionó una señal más alta que cualquier otra muestra con respecto a detección de mutación. La abundancia fraccional de conjunto G01 de ADN_g era 0,190% comparada con 0,030%, representando la última la abundancia fraccional promedio de todas las 96 muestras de ADN_g ensayadas.

15

WS4: Identificación de clones de levaduras individuales portadores de una mutación de *Scfdc1* seleccionada, mediante creación de subsiguientes subconjuntos.

- 20 **Etapas 4.1: Creación de subconjuntos centenas a partir de la biblioteca aleatoria total FS0105.**

En base al análisis de 96 muestras del conjunto biblioteca de ADN_g analizadas con un ensayo de ddPCR específico para *ScFDC1*, se consideró altamente probable que las 1200-1500 cepas de levadura en el conjunto G01 contuvieran uno o más clones

25 individuales portantes de la mutación génica de interés.

El título de células del conjunto biblioteca positivo G01 identificado en la Etapa 3.2 fue determinado mediante plaqueo de respectivas diluciones sobre placas de agar YPD. Subsiguientemente, se inocularon 48 tubos de cultivo de 15 ml que contenían 3 ml de medio YPD líquido, con aproximadamente 100 células cada uno del conjunto biblioteca

30 G01. Los tubos de cultivo fueron incubados durante tres días en una incubadora rotatoria a 30°C dando por resultado 48 subconjuntos centenas a partir de la biblioteca G01 representando aproximadamente 4800 clones individuales a partir del conjunto biblioteca G01.

Etapas 4.2: Aislamiento de ADN genómico de levaduras a partir de subconjuntos centenas de FS0105.

Se aisló ADN genómico de cada uno de los 48 subconjuntos centenas (ver etapa previa) de acuerdo con la Etapa 3.1 y la concentración final fue nuevamente ajustada a aproximadamente 5 ng ADN_g/μl.

Etapas 4.3: Análisis de las muestras de ADN_g del subconjunto centena mediante ddPCR.

ADN_g derivado de los 48 subconjuntos centena, que contenían aproximadamente 100 colonias cada uno del conjunto G01, fue analizado como se describe arriba (ver Etapa 3.2). Los datos fueron analizados utilizando el software QuantaSoft (versión v1.7, Bio-Rad). El umbral fue determinado utilizando el diagrama 2-D y configurado a 2000 para amplitud de Canal 1 y 2500 para amplitud de Canal 2. Se identificaron cuatro pocillos individuales en la placa para microtítulo (G07, C08, C09, G10) los cuales mostraron una abundancia fraccional por encima de 1%, indicando la presencia de al menos 1 colonia mutada en un conjunto específico de 100 colonias.

Etapas 4.4: Creación de subconjuntos decenas a partir de la biblioteca aleatoria total FS0105.

El subconjunto centena C09 mostró la mayor abundancia fraccional en los análisis de ddPCR (2,99%) y fue seleccionado para análisis adicional.

De manera similar a la Etapa 4.1, el título de células del subconjunto centena positivo C09 identificado en la Etapa 3.2 fue determinado mediante plaqueo de respectivas diluciones sobre placas de agar YPD. Subsiguientemente, se inocularon 24 tubos de cultivo de 15 ml que contenían 3 ml de medio YPD líquido, con aproximadamente 10 células cada uno del subconjunto centena C09. Los tubos de cultivo fueron incubados durante tres días en una incubadora rotatoria a 30°C dando por resultado 24 subconjuntos centenas a partir de la biblioteca C09 representando aproximadamente 240 clones individuales a partir del subconjunto centena G01.

Etapas 4.5: Aislamiento de ADN genómico de levaduras a partir de subconjuntos centenas FS0105.

Se aisló ADN genómico de cada uno de los 24 subconjuntos decenas (ver Etapa 4.4) de acuerdo con la Etapa 3.1 y la concentración final fue nuevamente ajustada a aproximadamente 5 ng ADNg/μl.

5 **Etapa 4.6: Análisis de las muestras de ADNg de subconjuntos decenas mediante ddPCR.**

El ADNg derivado de 24 subconjuntos decenas individuales fue analizado como se describe arriba. Los datos fueron analizados como se describe arriba (ver Etapa 3,2) utilizando el software QuantaSoft (versión v1.7, Bio-Rad). El umbral fue determinado
10 utilizando el diagrama 2-D y configurado a 1500 para amplitud de Canal 1 y 2000 para amplitud de Canal 2. Tres conjuntos individuales (A02, C03 y D03) mostraron una abundancia fraccional por encima de 10%, confirmando la presencia de al menos una colonia mutada en cada uno de los tres subconjuntos de 10 colonias.

15 **Etapa 4.7: Identificación de clones individuales a partir subconjuntos decenas de FS0105 que portaban la mutación de interés introducida.**

El subconjunto decena D03 que mostraba la mayor abundancia fraccional en el análisis ddPCR (Etapa 4.6) fue seleccionado para análisis adicional. ADNg fue aislado a partir de 16 colonias individuales de levaduras derivadas del subconjunto decena
20 D03 y sometido al mismo análisis como se describe arriba (ver Etapa 4.3 y 4.6). Los datos fueron analizados utilizando el software QantaSoft (versión v1.7, Bio-Rad). El umbral fue determinado utilizando el diagrama 2-D y configurado a 2000 para amplitud de Canal 1 y 2500 para amplitud de Canal 2. Dos conjuntos individuales (C02 y D02) mostraron una abundancia fraccional por encima de 99,9%, confirmando la presencia
25 de dos colonias de levaduras mutadas entre las 16 colonias individuales ensayadas.

Etapa 4.8: Aislamiento del cultivo puro de levaduras mutantes.

La cepa FS0105 muestra la tendencia a formar agregados celulares más grandes. Para asegurar que el futuro stock de la levadura mutante de interés fue derivado de
30 una única célula y no de un aglomerado de células, se utilizó un instrumento Singer MSM 400 Dissecting Microscope para aislar células únicas aisladas de los dos conjuntos individuales C02 y D02. De este modo, las suspensiones celulares de los conjuntos individuales fueron diluidas 1000 veces en buffer TE, que soporta la liberación de ciertos aglomerados celulares, y 10 μl de la dilución fueron colocados en

una placa de agar de medio complejo. Luego fueron aisladas células únicas de acuerdo con las recomendaciones/manual de los fabricantes.

Etapa 4.9: Confirmación de la mutación seleccionada de interés mediante análisis de secuencia de ADN.

ADN genómico a partir de aislados de células únicas de la Etapa 4.8 fue aislado utilizando protocolo de preparación de ADN genómico de levadura estándar, y la región que cubría el gen diana *ScFDC1* fue amplificada mediante técnicas de PCR estándar utilizando oligonucleótidos específicos *ScFDC1*. Los fragmentos de ADN resultantes fueron limpiados utilizando el Gel Wizard® SV Gel y sistema de Limpieza de PCR (Promega) y secuenciados (LGC Genomics) para el área alrededor del nucleótido de interés (+476 de *ScFDC1*). El análisis de las secuencias de ADN recuperadas mostró que ambos clones de células únicas que derivaron de los conjuntos individuales C02 y D03 (ver 4.7 y 4.8) contenían la mutación W159* sin sentido deseada causada por una transición G a A en el nucleótido +476 del gen *ScFDC1*.

Ejemplo 22

Se identificó una planta de trigo que portaba una mutación específica utilizando los métodos descritos en las Corrientes de Trabajo y Ejemplos más arriba en la presente. La denominación de los diversos conjuntos etc. fue realizada utilizando la denominación mostrada en la Figura 2. Mientras que la cebada es una especie diploide con 14 cromosomas, auto-polinizante, poliploidía es común en trigo. El presente Ejemplo demuestra que los métodos de la invención pueden ser utilizados aún con organismos poliploides, tal como trigo. Como se describe, los métodos pueden ser utilizados para identificación de cualquier mutante. El presente ejemplo describe la identificación de una mutación específica (guanina en adenina) conduciendo al intercambio del aminoácido triptofano en un stop traduccional en la región del codón del gen de trigo GASR7 del genoma A (TaGASR7-A1) en posición 91. La secuencia del gen GASR7-A1 está disponible en GenBank bajo el número NCBI: KJ000052, la secuencia de ADNc está provista en la presente como SEQ ID NO:25 y la secuencia de aminoácidos de GASR7 está provista como SEQ ID NO:8.

Ensayo ddPCR

Se diseñó un ensayo para ddPCR específico, el cual distingue específicamente entre el alelo mutante y el alelo de tipo salvaje de TaGASR7-A1 en la posición nucleotídica 273 en la secuencia codificante de tipo salvaje (GenBank número NCBI: KJ000052). La sonda para detección de mutantes era complementaria con la secuencia codificante que contenía una adenina en la posición nucleotídica 273. La sonda para detección de referencia era complementaria con la secuencia codificante que contenía una guanina en la posición nucleotídica 273. Se diseñaron dos cebadores flanqueantes para amplificar la secuencia genómica que rodea el nucleótido 273 en la secuencia codificante. Se desarrollaron los siguientes cebadores y sondas para el locus específico TaGASR7-A1:

5 cebador directo específico para diana (5'- CGCCTGCCCCTGCTA - 3')(SEQ ID NO:9)
10 cebador inverso específico para diana (5'- AGAAGAAGAAGAAGAAGAAAACCA-AGAA - 3')(SEQ ID NO:10)
15 sonda para detección de mutantes (5'- CAACAACTGAAAGACCA - 3')(SEQ ID NO:11)
– etiquetada con 6-carboxifluoresceína - FAM
sonda para detección de referencia (5'- CAACAACTGGAAGACCA - 3')(SEQ ID NO:12) – etiquetada con fluoróforo VIC

Se preparó un conjunto de granos de trigo mutagenizados aleatoriamente empapando los granos en EMS 0,6% durante 17 horas. A continuación los granos fueron enjuagados con agua y secados sobre papel de filtro durante 45 minutos. Los granos mutagenizados fueron plantados inmediatamente después del secado.

WS3: Determinación de si una muestra de bibliotecas contiene granos mutados

25 Entonces se determinó si la biblioteca contenía granos mutados, esencialmente como se describe en WS3 y Ejemplo 7 arriba en la presente con los siguientes detalles específicos:

El relevamiento fue llevado a cabo sobre un total de 94 GLPs (94 subconjuntos), representando aproximadamente 30.000 plantas de trigo mutadas. La ddPCR fue llevada a cabo esencialmente como se describe en el Ejemplo 7.

Se agregó una muestra de 5 µl de ADN_g derivada de ADN_g (GT#10001-GT#10094) a cada pocillo conteniendo 17 µl de la mezcla de reacción de PCR y se mezcló exhaustivamente pipeteando hacia arriba y hacia abajo.

La placa de PCR fue cargada sobre el instrumento QX200 Droplet Reader (Bio-Rad Laboratories) para análisis de las gotas. Los datos fueron analizados utilizando el software QuantaSoft (versión v1.7, Bio-Rad Laboratories). El umbral fue determinado utilizando el diagrama 2-D y configurado a 3000 para amplitud de Canal 1 y 2000 para amplitud de Canal 2. La comparación de los valores individuales en cuanto a abundancia fraccional mostró que ADN_g(GT#10072) contenía más señal derivada de la detección de mutantes que cualquier otra muestra. La abundancia fraccional de ADN_g(GT#10072) era 0,130% comparada con 0,024% lo cual representa la abundancia fraccional promedio de todas las 94 muestras de ADN_g ensayadas.

10

WS4: Hallazgo de grano(s) individual(es) caracterizado(s) por una mutación de interés

Se identificaron granos de trigo individuales que portaban la mutación, esencialmente como se describe arriba en la presente en WS4 con los siguientes detalles específicos:

15 En base al análisis de ADN_g de subconjuntos (GT#10001-GT#10094) con un ensayo de ddPCR específico para TaGASR7, se consideró altamente probable que los 4500 granos de GLP#10072 (correspondientes a muestra positiva de ADN_g(GT#10072)) comprendieran uno o más granos con la mutación idéntica de interés.

20 Se estableció FGLP#10072 removiendo secuencialmente 96 muestras de 10 granos cada una de GLP#10072. Cada alícuota de 10 granos fue colocada en un trozo de papel para pesada, y luego fijada consecutivamente con un par de fórceps mientras se usó una máquina grabadora (Marathon-3, Saeyang Microtech) equipada con una mecha de 1,6 mm para perforar un orificio pequeño, de 2-3 mm de profundidad en el endosperma. El movimiento rotatorio movió harina desde el endosperma hacia la parte superior del grano y el papel para pesada circundante. Las muestras de 10 granos perforados fueron colocadas en pocillos de 2 ml separados de una placa para microtítulo, brindando el subconjunto secundario de granos de trigo perforados PDGLP#10072. Las 96 muestras de harina, cada una con harina derivada a partir de 10 granos de trigo perforados fueron transferidas a pocillos separados de una placa para microtítulo de 1,5 ml (PFGLP#10072) manteniendo un sistema de numeración de muestras correspondiente al de los granos perforados.

30

Se sometió PFGLP#10072 a extracción de ADN_g utilizando un procedimiento de extracción de ADN semi-automatizado como se detalla en las instrucciones del kit

NucleoSpin 96 Plant II (Macherey-Nagel). De manera acorde, cada pocillo de la placa para microtítulo contenía ADNg a partir de harina de 10 granos.

ADN derivado de PFGLP#10072 fue analizado como se describe arriba. Los datos fueron analizados utilizando el software QuantaSoft (versión v1.7, Bio-Rad Laboratories). El umbral fue determinado utilizando el diagrama 2-D y configurado a 2500 para amplitud de Canal 1 y 1700 para amplitud de Canal 2. Se identificó que dos pocillos individuales en la placa para microtítulo (B10 y G05) mostraron una abundancia fraccional de 7,6% y 5,2%, todo indicando la presencia de dos mutantes individuales en 2 pocillos independientes de PDGLP#10072.

Se hizo germinar todos los 10 granos del pocillo B10 de PDGLP#10072. El material foliar de todas las 10 plántulas fue cosechado y sometido a extracción de ADN utilizando REExtract (Sigma Aldrich). El ADNg derivado de las muestras de hojas fue analizado como se describe arriba. Los datos fueron analizados utilizando el software QuantaSoft (versión v1.7, Bio-Rad Laboratories). El umbral fue determinado utilizando el diagrama 2-D y configurado a 2000 para amplitud de Canal 1 y 1600 para amplitud de Canal 2. Una plántula derivada del pocillo C03 de PDGLP#10072 mostró una abundancia fraccional de 99%, confirmando la presencia de un mutante homocigota.

La verificación de características adicionales fue llevada a cabo utilizando secuenciación directa del mutante identificado y una muestra de referencia. Se extrajo ADN a partir de material foliar utilizando el procedimiento de extracción de ADN REExtract (Sigma Aldrich). Para el análisis de secuenciación se preparó una reacción de PCR de 50 µl que contenía 1 µl de ADNg purificado, 20 µl de REExtract (Sigma Aldrich), un cebador directo específico para diana 500 nM, un cebador inverso específico para diana 500 nM y agua. Las muestras fueron cicladas térmicamente utilizando las siguientes condiciones de PCR: desnaturalización a 94°C durante 2 min, 38 ciclos de PCR a 94°C durante 45 seg, 58°C durante 45 seg y 72°C durante 45 seg, y una extensión final a 72°C durante 5 min antes de almacenamiento de la placa de PCR a 8°C. Los productos de PCR individuales fueron purificados utilizando el gel NucleoSpin Gel y kit de limpieza de PCR. Todas las muestras fueron secuenciadas utilizando un cebador directo específico para diana y un cebador inverso específico para diana.

La plántula que era positiva para la mutación en el análisis para ddPCR también mostró un genotipo mutante heterocigótico en una locación genómica predeterminada.

La muestra de referencia mostró un genotipo de tipo salvaje homocigótico en la misma locación.

Ejemplo 23

5 Se identificó una planta de cebada que porta una mutación específica mediante el uso combinado de dos tecnologías, de las cuales una fue provista por RainDance Technologies y la otra por Bio-Rad Laboratories. En términos generales, la tecnología de RainDance fue utilizada para identificar muestras específicas, pero complejas, que contienen moldes de ADNg a partir de numerosos granos mutantes, mientras que
10 análisis subsiguientes basados en Bio-Rad ayudaron a identificar granos individuales caracterizados por la mutación de interés. La denominación de los diversos conjuntos etc. fue realizada utilizando la denominación mostrada en la Figura 2.

Como se describe, los métodos pueden ser utilizados para identificación de cualquier mutante. El presente Ejemplo describe la identificación de una mutación específica
15 (guanina a adenina) que conduce al intercambio del aminoácido triptofano a un stop traduccional en la región del codón de un gen de cebada que codifica una aciltransferasa de BAHD (HvBADH1) putativa en la posición 31.

20 Ensayo para ddPCR

Se diseñó un ensayo específico para ddPCR, el cual específicamente distingue entre el alelo mutante y el alelo de tipo salvaje de HvBADH1 en la posición nucleotídica 93. La secuencia de codificación de tipo salvaje (secuencia de ADNc) está provista en la presente como SEQ ID NO:17 y la secuencia de que codifica mutantes está provista
25 en la presente como SEQ ID NO:18. La secuencia de aminoácidos de HvBADH1 está provista como SEQ ID NO:19. La sonda para detección de mutantes era complementaria con parte de la secuencia codificante que contiene una adenina en la posición nucleotídica 93 de la SEQ ID NO:17. La sonda para detección de referencia era complementaria con parte de la secuencia codificante que contiene una guanina
30 en la posición nucleotídica 93. Se diseñaron dos cebadores flanqueantes para amplificar la secuencia genómica que rodea el nucleótido 93 en la secuencia codificante. Adicionalmente, se desarrolló una sonda bloqueante, utilizando la secuencia nucleotídica de la sonda para detección de referencia suplementada con un espaciador 3', el cual evita la extensión del secuenciación de referencia, mediante

polimerasas de ADN durante la PCR. Se desarrollaron los siguientes cebadores y sondas para el locus específico de HvBADH1:

cebador directo específico para diana (5'- CCCGACCACACGC - 3')(SEQ ID NO:20)

cebador inverso específico para diana (5'- ACTCCACCAGGCCG - 3')(SEQ ID NO:21)

5 sonda para detección de mutantes (5'- CTGGCGTGAGTGGAC - 3')(SEQ ID NO:22) – etiquetada con 6-carboxifluoresceína - FAM

sonda para detección de referencia (5'- CTGGCGTGGGTGGA - 3')(SEQ ID NO:23) – etiquetada con tetraclorofluoresceína – TET

10 sonda bloqueante (5'- CTGGCGTGGGTGGA - 3')(SEQ ID NO:24) – etiquetada con un espaciador 2',3'-dideoxiC

Preparación de “Super-conjuntos” de ADNg.

15 Simplemente, 50 µl de cada extracto de ADNg de todas las 94 “Alícuotas de sub-harinas individuales totales” (ASFTs, por sus siglas en inglés) representadas en una placa de 96 pocillos, fueron combinadas en un “Super-conjunto”.

Determinación de si un “Super-conjunto” contiene granos mutados

Entonces se determinó si un “Super-conjunto”, que comprende ADN a partir de 94 ASFTs contenía granos mutados, esencialmente como se describe en el Ejemplo 17 arriba en la presente, con los siguientes detalles específicos:

20 En primer lugar, 2 µl de ADNg de un super-conjunto se agregaron a 50 µl de PCR enriquecido y bloqueado que contenía 10 µl de Q5 Reaction Buffer 5X (New England Biolabs), dNTPs 200 µM, Q5 High-Fidelity DNA Polymerase 0,02U/µl, cebador PCR directo específico para diana 100 nM, cebador inverso PCR específico para diana 100 nM, sonda bloqueante 100 nM (espaciador 2',3'-didesoxiC) y agua. La mezcla
25 PCR fue térmicamente ciclada utilizando condiciones de PCR estándar: desnaturalización a 98°C durante 2 min, 20 ciclos de PCR a 98°C durante 10 seg, 57°C durante 20 seg y 72°C durante 10 seg, y una extensión final a 72°C durante 5 min antes de almacenamiento a 8°C.

30 En segundo lugar, se generaron gotas para 4 “Super-conjuntos” individualmente enriquecidos y bloqueados, utilizando el instrumento RainDrop Source. Una alícuota de 10 µl de producto de PCR enriquecido y bloqueado a partir de cada “Super-conjunto” fue individualmente combinada con 25 µl de Supermix for Probes (Bio-Rad); Droplet Stabilizer (RainDance) 1X; cebador directo específico para diana 900 nM;

cebador inverso específico para diana 900 nM; sonda para detección de referencia (TET)

120 nM; sonda para detección de mutantes (FAM) 440 nM y H₂O para ajuste hasta un volumen total de reacción de 50 µl. Se agregaron un total de 4 mezclas de reacción individuales, representando 4 “Super-conjuntos” individuales de ADNg al chip fuente (RainDance) y se procesó con el Source Instrument (RainDance).

La tira de PCR de 8 pocillos conteniendo las gotas generadas a partir de las mezclas de reacción mediante el instrumento Source Instrument (RainDance), descrita arriba en la presente, fue sellada y ciclada térmicamente utilizando condiciones de PCR estándar: desnaturalización a 95°C durante 10 min, 40 ciclos de PCR a 95°C durante 15 seg, 55°C durante 1 min y una extensión final a 98°C durante 10 min antes de almacenamiento a 8°C. A continuación, las mezclas amplificadas fueron transferidas al instrumento Sense Instrument (RainDance) y analizadas utilizando el software de análisis de datos RainDrop Analyst.

La abundancia fraccional promedio de 4 super-conjuntos era 0,0115%. El super-conjunto SP-gDNA#05 tenía una abundancia fraccional de 0,0228%, indicando una alta probabilidad de que este super-conjunto contenga ADN de granos mutantes.

Determinación de si una muestra de bibliotecas contiene granos mutados

Entonces se determinó si la placa de 94 ASFTs correspondiente a SP-gDNA#05 contenía granos mutados, esencialmente como se describe en el Ejemplo 7 arriba en la presente con los siguientes detalles específicos:

El relevamiento fue llevado a cabo en un total de 94 SGTs (subtotales de grano), representando aproximadamente 30.000 plantas de cebada mutadas. El ADNg utilizado para esta parte del relevamiento fue el ADNg purificado de ASFT –es decir ADN que no había sido enriquecido. Para propósitos analíticos, se agregaron 5 µl de ADNg purificado derivado de ADNg(GT#377-GT#470) a 17 µl de una mezcla PCR conteniendo 11 µl ddPCR Supermix for Probes 2× (No. dUTP, Bio-Rad Laboratories), cebadores PCR específicos para diana 900 nM, sonda para detección de mutantes (6-carboxifluoresceína – FAM) 250 nM y sonda para detección de tipo salvaje sondas (tetraclorofluoresceína – TET). La mezcla de reacción fue cargada en un instrumento AutoDG Droplet Generator (Bio-Rad) y se llevó a cabo la generación de gotas de acuerdo con el manual del fabricante. La emulsión de gotas fue ciclada térmicamente utilizando condiciones de PCR estándar: desnaturalización a 95°C durante 10 min, 40

ciclos de PCR a 94°C durante 30 seg y 55°C durante 1 min y una extensión final a 98°C durante 10 min antes de almacenamiento de la placa para microtítulo a 8°C. La amplificación por PCR en gotas fue confirmada utilizando el instrumento QX200 Droplet Reader (Bio-Rad Laboratories).

5 La placa de PCR fue cargada sobre el instrumento QX200 Droplet Reader (Bio-Rad Laboratories) para análisis de las gotas. Los datos fueron analizados utilizando el software QuantaSoft (versión v1.7, Bio-Rad Laboratories). Se determinó el umbral utilizando el diagrama 2-D y configurado a 2200 para amplitud de Canal 1 y 2700 para amplitud de Canal 2. La comparación de los valores individuales en cuanto a
10 abundancia fraccional mostró que el ADN_g(GT#416) contenía más señal derivada de la detección de mutantes que cualquier otra muestra. La abundancia fraccional de ADN_g(GT#416) era 0,4% comparada con 0,073% que representa la abundancia fraccional promedio de todas las 94 muestras de ADN_g ensayadas.

15 **Hallazgo de grano(s) individual(es) caracterizado(s) por una mutación de interés**

Se identificaron granos de cebada individuales que portaban la mutación esencialmente como se describe arriba en la presente en los Ejemplos 9 a 15 con los siguientes detalles específicos:

20 En base al análisis de ADN_g (GT#416) con un ensayo HvBADH1 específico de ddPCR, se consideró altamente probable que los 4500 granos de GLP#416 (correspondientes a ADN_g(GT#416) de muestras positivas) comprendieran uno o más granos con la mutación idéntica de interés.

25 Se estableció FGLP#416 mediante la remoción secuencial de 96 muestras de 12 granos cada una de GLP#416. Cada alícuota de 12 granos fue colocada en un trozo de papel para pesada, y luego se fijó consecutivamente con un par de fórceps mientras que se usó una máquina grabadora (Marathon-3, Saeyang Microtech) equipada con una mecha de 1,6 mm para perforar un pequeño orificio de 2-3 mm, profundo, dentro del endosperma. El movimiento de rotación movió harina desde el endosperma hacia la parte superior del grano y el papel para pesada circundante. Las
30 muestras perforadas de 10 granos fueron colocadas en pocillos de 2 ml separados de una placa para microtítulo, brindando el subconjunto secundario de granos de cebada perforados PDGLP#416. Las 96 muestras de harina, cada una con harina derivada de 12 granos de cebada perforados fueron transferidas a pocillos separados de una

placa para microtítulo de 1,5 ml (PFGLP#416) manteniendo un sistema de numeración de muestras coincidente con el de los granos perforados.

Se sometió PFGLP#416 a extracción de ADNg utilizando un procedimiento semi-automático de extracción de ADN como se detalla en las instrucciones del kit NucleoSpin 96 Plant II (Macherey-Nagel). De manera acorde, cada pocillo de la placa para microtítulo contenía ADNg a partir de harina de 12 granos.

Se analizó ADN derivado de PFGLP#416 utilizando la misma mezcla de PCR y condiciones de reacción de PCR como se describe más arriba (*Determinación si una muestra de biblioteca contiene granos mutados*). Los datos fueron analizados utilizando el software QuantaSoft (versión 1.7, Bio-Rad Laboratories). El umbral fue determinado utilizando el gráfico 2-D y configurado a 3000 para amplitud del Canal 1 y 2500 para amplitud del Canal 2. Se identificaron dos pocillos individuales en la placa para microtítulo (D10 y F02) que mostraron una abundancia fraccional de 3,4% y 13,7%, indicando la presencia de dos mutantes individuales en 2 pocillos independientes de PDGLP#416.

Se hicieron germinar todos los 12 granos del pocillo F02 de PDGLP#416. Se cosechó el material foliar de las 12 plántulas y se sometió a extracción del ADN utilizando REDExtract (Sigma Aldrich). El ADNg derivado de las muestras de hojas fue analizado utilizando la misma mezcla de PCR y condiciones de reacción de PCR como se describió arriba (*Determinación de si una muestra de biblioteca contiene granos mutados*). Los datos fueron analizados utilizando el software QuantaSoft (versión v1.7, Bio-Rad Laboratories). El umbral fue determinado utilizando el gráfico 2-D y configurado a 5000 para amplitud del Canal 1 y 3200 para amplitud del Canal 2. Una plántula derivada del pocillo F02 de PDGLP#416 mostró una abundancia fraccional de 39%, confirmando la presencia de un mutante heterocigota.

REFERENCIAS

Andrew J. Goodall, Pankaj Kumar y Alyson K. Tobin (2013). Identification and expression analyses of cytosolic glutamine synthetase genes in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Cell Physiol.* 54: 492-505.

- Botticella, E., Sestili, F., Hernandez-Lopez, A., Phillips, A., & Lafiandra, D. (2011). High resolution melting analysis for the detection of EMS induced mutations in wheat Sbella genes. *BMC Plant Biology* 11: 156.
- 5
- Inoue, H., Nojima, H. y Okayama, H., (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23-28.
- Jiang, F. et al. (2016). Structures of a CRISPR-Cas9 R-loop complex primed for DNA cleavage. *Science* 351: 867-871.
- 10
- Pleasance, et al. (2010). A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. *Nature* 463: 191-196.
- 15
- Schuster-Böckler, B. y Lehner, B. (2012). Chromatin organization is a major influence on regional mutation rates in human cancer cells. *Nature* 488: 504-507.
- Yamaya, T. y Kusano, M. (2014). Evidence supporting distinct functions of three cytosolic glutamine synthetases and two NADH-glutamate synthases in rice. *J. Exp. Bot.* 65: 5519-5525.
- 20
- Wellner, V. P. y Meister, A. (1966). Binding of Adenosine Triphosphate and Adenosine Diphosphate by Glutamine Synthetase. *Biochemistry* 5: 872-879.

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 ADNg, comprendiendo cada una ADN genómico (ADNg), 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 ADNg 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 ADNg, 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 ADNg, comprendiendo cada una ADNg, 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 ADNg 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.

RESUMEN

En los enfoques de mejoramiento de plantas tradicionales, puede utilizarse mutagénesis química para introducir sustituciones nucleotídicas aleatoriamente en el genoma de una planta, es decir sin posibilidades de controlar los sitios de los cambios nucleotídicos. A causa de las complejidades genómicas, la probabilidad estadística es extremadamente baja en cuanto a hallar una sustitución nucleotídica predeterminada. La presente invención, sin embargo, demuestra cómo se desarrolla un uso novedoso, alternativo, de la reacción en cadena de polimerasa digital (dPCR), preferiblemente dPCR en gotas (ddPCR), para explotar el hallazgo de sustituciones nucleotídicas específicas en genes mutados. La plataforma completa comprende un método de relevamiento con una biblioteca de organismos mutagenizados, sistemas basados en PCR digital y una configuración para propagar y analizar organismos mutados identificados.