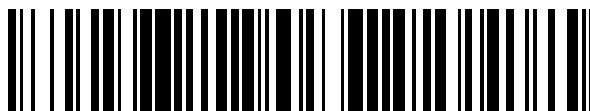


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 695**

51 Int. Cl.:

A01H 1/04 (2006.01)

A01C 1/00 (2006.01)

A01H 5/10 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07016960 .2**

96 Fecha de presentación: **26.08.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1869961**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.12.2007**

54 Título: **Muestreador automatizado de semillas y procedimiento de muestreo, ensayo y aumento de semillas**

30 Prioridad:
26.08.2004 US 604604 P
15.06.2005 US 691100 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.05.2012

73 Titular/es:
MONSANTO TECHNOLOGY, LLC
800 NORTH LINDBERGH BOULEVARD
ST. LOUIS, MO 63167, US

72 Inventor/es:
Deppermann, Kevin;
Zhang, Qiang;
Hinchey, Terri B.;
Petersen, Michael W.;
Eathington, Sam;
Butruille, David;
Forbes, Heather M.;
Tamulonis, John y
Schnicker, Bruce

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

ES 2 380 695 T3

DESCRIPCIÓN

Muestreador automatizado de semillas y procedimiento de muestreo, ensayo y aumento de semillas

Antecedentes de la invención

La invención se refiere a procedimientos, para tomar muestras de materiales biológicos tales como semillas.

- 5 En el desarrollo y mejora de las plantas, se han llevado a cabo mejoras genéticas en las plantas, bien mediante cultivo o manipulación genética, y cuando se consigue una mejora deseable, se desarrolla una cantidad comercial plantando y recolectar semillas a lo largo de varias generaciones. No todas las semillas expresan los rasgos deseados, y de este modo estas semillas deben ser eliminadas de la población. Para acelerar el procedimiento de aumentar el volumen de la población, las muestras estadísticas se toman y ensayan para eliminar semillas de la población que no expresan adecuadamente el rasgo deseado. Sin embargo, este muestreo estadístico permite necesariamente que algunas semillas sin el rasgo deseable permanezcan en la población, y asimismo puede excluir accidentalmente algunas semillas con el rasgo deseable de la población deseada.

- 10 El documento de POST VON REBECKA ET AL.: "A high-throughput DNA extraction methods for barely seed" EUPHYCA, vol 130, nº 2, 1 de Enero 2003, páginas 255-260, divulga un protocolo rápido de extracción de ADN para analizar muestras tomadas de semillas. Describe la perforación manual de orificios a través de las semillas para retirar muestras de las semillas.

- 15 Los documentos de MCCARTHY PAUL ET AL.: "Rapid identification of transformed wheat using a half-seed PCR assay" BITECHNIQUES; vol 32, nº 3 marzo 2002, páginas 560-654, y CHUNGWONGSE J ET AL.: "Pre-germination genotyping screening using PCR amplification of half-seeds" THEORETICAL AND APPLIED GENETICS, vol. 86, nº 6, 1 de enero de 1993, páginas 694-698, divulgan un procedimiento selección basado en PCR para evaluar semillas cortadas por la mitad.

Sumario de la invención

- 25 La presente invención se refiere a procedimientos para muestrear de manera no destructiva material de semillas. Los procedimientos se adaptan particularmente a la automatización, lo cual permite un mayor muestreo respecto de la práctica anterior. Con el muestreo no destructivo automatizado permitido por al menos algunas de las realizaciones de la invención, es posible ensayar cada semilla de la población, y eliminar las semillas que no expresan el rasgo deseado. Esto acelera en gran medida el proceso de aumento de volumen de una población de semillas dada, y puede dar como resultado una población final mejorada.

- 30 Las realizaciones de la invención facilitan el ensayo de la mayoría sino todas las semillas de una población antes de plantar, de manera a no desperdiciar el tiempo y los recursos en la cultivo de plantas sin los rasgos deseados.

- 35 Según el procedimiento de la invención, las semillas se alimentan individualmente a una estación de muestreo; y se mantienen en la estación de muestreo mientras se toma una muestra de la semilla. Cada muestra es transportada a al menos un compartimento individual en una bandeja de muestras, y cada semilla se transporta a un compartimento en una bandeja de muestras con una relación conocida con el o los compartimentos de la bandeja de muestras al cual se transportó la muestra correspondiente. La muestra se puede ensayar, y las velocidades se pueden reducir basándose en los resultados de los ensayos.

- 40 Generalmente, el sistema para llevar a cabo el procedimiento de la invención comprende: una estación de muestreo; un muestreador para retirar material de una semilla en la estación de muestreo; un transportador de semillas para transportar la semilla desde la estación de muestreo a un compartimento en una bandeja de semillas; y un transportador para transportar el material retirado de la semilla a un compartimento en una bandeja de muestras.

- Este procedimiento de la invención facilita el muestreo automatizado no destructivo de semillas. Permite el ensayo y la clasificación de grandes volúmenes de semillas, facilitando de este modo el aumento de volumen de la población de semillas con rasgos deseables. Esta y otras características y ventajas serán en parte evidentes, y en parte señaladas en lo sucesivo.

Breve descripción de los dibujos

- La **figura 1** es una vista en perspectiva ampliada de una primera realización de un sistema muestreador de semillas para llevar a cabo el procedimiento de esta invención;

La **figura 2** es una vista en perspectiva ampliada del conjunto muestreador de semillas del sistema muestreador de semillas;

- 50 La **figura 3** es una vista en perspectiva ampliada de la tolva y el mecanismo de alimentación de semillas del conjunto muestreador de semillas

- La **figura 4** es una vista en perspectiva del husillo para raspar muestras de las semillas;
- La **figura 5** es una vista en perspectiva de la corredera para conducir el husillo;
- La **figura 6** es una vista en perspectiva del pistón en el mecanismo de alimentación de la tolva;
- 5 La **figura 7** es una vista en perspectiva de un piso con una pluralidad de bandejas de semillas y bandejas de muestras montadas en las mismas;
- La **figura 8** es una vista en perspectiva del mecanismo de traslación bidimensional.
- La **figura 9** es una vista en perspectiva de la entrada del transportador de semillas.
- La **figura 10** es una vista en perspectiva de la salida del transportador de semillas.
- La **figura 11** es una vista en perspectiva de la salida del transportador de muestras.
- 10 La **figura 12** es una vista en perspectiva del multiplicador de aire usado en los transportadores de semillas y muestras;
- La **figura 13** es una vista superior en planta de un sistema muestreador de semillas de alto rendimiento para llevar a cabo el procedimiento de esta invención;
- La **figura 14** es una vista en alzado lateral del sistema muestreador de semillas de alto rendimiento;
- 15 La **figura 15** es una vista en perspectiva frontal del sistema muestreador de semillas de alto rendimiento;
- La **figura 16** es una vista en perspectiva posterior del sistema muestreador de semillas de alto rendimiento;
- La **figura 17** es una vista en perspectiva de la estación de muestreo del sistema muestreador de semillas de alto rendimiento;
- 20 La **figura 18A** es una vista en perspectiva parcial de una porción de la estación de muestreo de semillas, con el husillo retraído;
- La **figura 18B** es una vista en perspectiva parcial de una porción de la estación de muestreo de semillas, con el husillo extendido;
- La **figura 19A** es una vista en alzado lateral de la estación de muestreo de semillas, con el husillo en su posición retraída;
- 25 La **figura 19B** es una vista en alzado lateral de la estación de muestreo de semillas, con el husillo en su posición extendida;
- La **figura 20** es una vista en sección transversal longitudinal de la estación de muestreo de semillas;
- La **figura 21** es una vista en alzado de extremo frontal de la estación de muestreo de semillas;
- La **figura 22** es una vista en sección transversal transversal de la estación de muestreo de semillas;
- 30 La **figura 23A** es una vista en alzado lateral de la rueda de selección de semillas;
- La **figura 23B** es una vista de despiece ordenado de la rueda de selección de semillas;
- La **figura 23C** es una vista en sección transversal vertical de la rueda de selección de semillas;
- La **figura 24** es una vista en alzado frontal del mecanismo de alimentación;
- La **figura 25** es una vista en alzado lateral del mecanismo de alimentación;
- 35 La **figura 26A** es una vista en perspectiva del mecanismo de alimentación;
- La **figura 26B** es una vista en alzado lateral del mecanismo de alimentación;
- La **figura 26C** es una vista en sección transversal longitudinal del mecanismo de alimentación, tomada a lo largo del plano de la línea 26C-26C en la figura 26B;
- La **figura 26D** es una vista en planta inferior del mecanismo de alimentación;
- 40 La **figura 27A** es una vista en sección transversal longitudinal vertical del mecanismo de muestreo;

La **figura 27B** es una vista en sección transversal vertical parcial ampliada del mecanismo de muestreo mostrado en la figura 27A;

La **figura 28A** es una vista en sección transversal transversal vertical del mecanismo de muestreo;

5 La **figura 28B** es una vista en sección transversal parcial ampliada del mecanismo de muestreo mostrado en la figura 28A; y

La **figura 29** es un alelograma que representa muestras de tejido del endospermo del maíz que han experimentado PCR para la detección de un polimorfismo SNP particular.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

10 Una primera realización de un sistema muestreador automatizado de semillas para el rendimiento del procedimiento de la invención se indica generalmente mediante **20** en la **figura 1**. El sistema muestreador de semillas **20** se adapta para asilar una semilla de una tolva, alimentarla a una estación de muestreo, rascar una muestra de la semilla, transportarla muestra a un recipiente de semillas, y transportar la semilla a un recipiente de semillas correspondiente. Como se muestra en la **figura 1**, el sistema muestreador de semillas comprende un soporte **22**, un bastidor **24** sobre el soporte; un conjunto muestreador **26**, un piso **28** montado sobre un mecanismo de traslación bidimensional **30**, un transportador de semillas **32** para transportar semillas desde el conjunto muestreador de semillas, y un transportador de semillas **34** para transportar una muestra retirada de una semilla al conjunto muestreador de semillas.

20 Como se muestra en la **figura 1**, en la primera realización preferida, el soporte **22** comprende una carretilla con ruedas **40**, que tiene cuatro montantes verticales **42** conectados por miembros longitudinales superior e inferior **44** y **46**, en la parte delantera y frontal, y por miembros transversales superior e inferior **48** y **50** en los lados izquierdo y derecho, y una mesa **52** montada sobre el mismo. Una rueda **54** se puede montar en la parte inferior de cada montante **42** para facilitar el desplazamiento del soporte **22**. Los detalles de la construcción del soporte **22** no son críticos para la invención, y por lo tanto el soporte **22** podría tener alguna otra configuración.

25 Como se muestra también en la **figura 1**, el bastidor **24** comprende cuatro vástagos de extensión vertical **60** sobre la mesa **52**, que soportan una placa **62** generalmente horizontal. El conjunto muestreador **26** se monta sobre la placa **62**, como se describe más en detalle en lo sucesivo. Un árbol **64** se monta también sobre la placa, y se extiende generalmente en horizontal desde la misma. El extremo libre del árbol **64** tiene un primer y un segundo montantes verticales **66** y **68** para montar un transportador de semilla **32** y partes del transportador de muestras **34**, respectivamente. Los detalles de la construcción del bastidor **24** no son críticos para la invención, y de este modo el bastidor podría tener alguna otra configuración.

Como se muestra en las **figuras 1** y **2**, el conjunto muestreador **28** se monta sobre la placa **62** del bastidor **24**. El conjunto de muestras comprende un silo o tolva **70**, una estación de muestreo **72**, y un mecanismo de alimentación **74** para proporcionar una única semilla desde la tolva **70** a la estación de muestreo.

35 Como se muestra en las **figuras 1** y **3**, el piso **28** se adapta para montar de manera segura una pluralidad de bandejas de semillas **80** y bandejas de muestras **82** en posiciones y orientaciones fijas. Cada una de las bandejas de semillas **80** y bandejas de muestras **82** se divide preferiblemente en una pluralidad de compartimentos. El número y las disposiciones de los compartimentos en las bandejas de semillas **80** corresponden preferiblemente al número y las disposiciones de los compartimentos en las bandejas de muestras **82**. Esto facilita la correspondencia unívoca entre una semilla y su muestra. Sin embargo, en algunas realizaciones puede ser deseable proporcionar múltiples compartimentos en la bandeja de muestras para cada compartimento en la bandeja de semillas, por ejemplo donde se pueden efectuar múltiples ensayos en las muestras, o donde se pueden tomar diferentes muestras de la misma semilla (por ejemplo, muestras de diferentes profundidades).

45 El piso **28** se monta sobre un mecanismo de traslación bidimensional **30**, que en esta realización preferida comprende una base **90** con un primer accionador lineal **92** que tiene un carro desplazable **94** montado sobre una base **90**, y un segundo accionador lineal **96**, que tiene un carro **98** montado sobre el carro **94** del primer accionador lineal **92**. El piso **28** se monta sobre el carro **98** del segundo accionador lineal **96**, y de este modo se puede desplazar con precisión en dos dimensiones a través del funcionamiento del primer y del segundo accionadores lineales **92** y **96**.

50 El transportador de semillas **32** comprende un tubo **100** con un extremo de entrada **102** adyacente a la estación de muestreo **72**, y un extremo de salida **104** montado sobre el montante **66** del bastidor **24**. Hay un primer dispositivo Venturi **106** en el extremo de entrada **102** del tubo **100** para inducir un flujo de aire en el tubo hacia el extremo de salida **104** del tubo, y un segundo dispositivo Venturi **108** en el extremo de salida **104** del tubo **100** para inducir un flujo de aire hacia el extremo de entrada **102** del tubo. El primer dispositivo Venturi **106** se usa para crear un flujo de aire en el tubo y extraer una semilla de la estación de muestreo dentro del tubo a lo largo del primer extremo. El segundo dispositivo Venturi **108** se usa entonces para crear un flujo de aire en la dirección opuesta, ralentizando la semilla para reducir el potenciar de daño a la semilla cuando sale por el extremo de salida **104** del tubo y se

suministra a un compartimento en la bandeja. En esta realización preferida, el segundo Venturi **108** detiene efectivamente el movimiento de la semilla, permitiéndole por gravedad en su compartimento en una bandeja **90**. Varios sensores de posición pueden disponerse sobre el tubo **100** para detectar la presencia de la semilla, y confirmar el funcionamiento apropiado del transportador de semillas **32**.

El transportador de muestras **34** comprende un tubo **120** con un extremo de entrada **122** adyacente a la estación de muestreo **72**, y un extremo de salida **124** montado en el montante **68** del bastidor **24**. Hay un primer dispositivo Venturi **126** en el extremo de entrada **122** del tubo **120** para inducir un flujo de aire en el tubo hacia el extremo de salida **124** del tubo. Se dispone un separador **128** en el extremo de salida para separar el material de muestra de la corriente de aire que lo lleva, de manera que la corriente de aire no saque la muestra del compartimento en la bandeja **92**. El separador contiene asimismo preferiblemente un filtro para evitar la contaminación cruzada de las muestras.

Como se muestra en la **figura 2**, el conjunto de muestreo de semillas **26** se adapta para montarse en la placa **62** sobre un montante **140**. El conjunto de muestreo de semillas **26** comprende una placa de montaje de tolva **142**, una placa de montaje de corredera **144** y cuatro soportes separados de corredera **146** entre medias de las mismas. La tolva **70** (mostrado en la **figura 3**), que alimenta semillas individuales a una estación de muestreo **72**, se monta sobre la placa de tolva **142**. La estación de muestreo **72** comprende un nido de semilla **148** montado en un montaje de nido **150**, que está soportado desde la placa de montaje de corredera **144** por un par de separadores **152**. El nido **148** tiene un rebaje que se abre a su superficie inferior, dentro del cual la tolva **70** alimenta una única semilla. Hay una ranura en la parte superior del nido de semillas **148** a través de la cual se expone una porción de una semilla en el rebaje. Un husillo **154** (**figura 4**) se monta en el portahusillo **156** que se monta sobre una placa de transición de corredera **158** sobre una corredera programable **160**, con un bloque de sujeción de husillo **162**. La corredera programable **160** (**figura 5**) se monta sobre la parte inferior de la placa de montaje de corredera **144**, y desplaza el husillo **154** a través de la ranura en el nido de semillas **148** para retirar una muestra de una semilla en el rebaje en el nido de semillas.

Como se observa mejor en la **figura 4**, el husillo **154** tiene una pluralidad de dientes **164** que aumentan en altura hacia el extremo proximal, de manera que a medida que el husillo **154** avanza en la ranura, corta cada vez más profundamente en la semilla en el rebaje en el nido **148**. El rebajado gradual resultante reduce el daño a la semilla, protegiendo su viabilidad. Además, como se describe más en detalle en lo sucesivo, cortando a diferentes profundidades en momentos diferentes, las muestras de diferentes profundidades de la misma semilla se pueden separar para análisis separados.

Un tubo de transferencia de muestras **166** se extiende desde el rebaje en el nido de muestras **148**, y tiene un conector **168** sobre su extremo para su conexión al transportador de muestras **34**.

La estación de muestreo **26** incluye asimismo una tolva **70**, que se observa mejor en la **figura 3**. La tolva **70** comprende placas de montaje de tolva izquierda y derecha **170** y **172**, y una placa de montaje de cilindro **174** y un soporte de cilindro superior **176**. La tolva **70** tiene asimismo un panel frontal **178**, un panel trasero **180**, un primer y un segundo paneles de extremo **182** y **184**, y un fondo **186**. Un divisor **188** divide la tolva en un primer y un segundo compartimentos **190** y **192**. El primer compartimento **190** contiene un suministro de semillas que se transfieren individualmente al segundo compartimento **192**.

Un accionador de pistón **194** acciona un pistón **196** para extraer una semilla del primer compartimento. Un conjunto de chorro de aire **198** transfiere una semilla desde el extremo del pistón **196** al segundo compartimento **192**. El segundo compartimento tiene un fondo conformado **200** con un pocillo **202** para recibir la semilla y colocarla. Un accionador de pistón **210** acciona un pistón **214** para extraer una semilla del segundo compartimento **192**. Un conjunto de chorro de aire **216** se usa para agitar las semillas durante el procedimiento de recogida de semillas.

Como se muestra en la **figura 7**, el piso **28** tiene soportes **220** para montar las bandejas de semillas **90** y las bandejas de muestras **92** en registro de manera que el transportador de semillas y el transportador de muestras suministren semillas y muestras a los compartimentos correspondientes, en las bandejas respectivas. Las bandejas de muestras **92** pueden (como se muestra) adaptarse para contener viales individuales. Evidentemente, se pueden usar bandejas de diferentes configuraciones, por ejemplo donde múltiples compartimentos están provistos de múltiples muestras de la misma semilla. Por ejemplo, donde una muestra se divide en varias muestras, o donde las muestras se separan del emplazamiento donde se han tomado, por ejemplo por profundidad.

Como se muestra en la **figura 8**, el mecanismo de traslación bidimensional **30** incluye asimismo un cursor **230** que tiene un carril **232** y un carro **234**, que se posiciona en paralelo al primer accionador lineal **92**. El segundo accionador **96** se monta sobre el carro **96** que tiene el carro **98** montado sobre el carro **94** del primer accionador lineal **92**. El piso **28** se monta sobre el carro **98** del segundo accionador lineal **96**, y de este modo se puede desplazar con precisión en dos dimensiones a través del funcionamiento del primer y el segundo accionadores lineales **92** y **96**. Bajo el control apropiado, el mecanismo de traslación puede alinear compartimentos individuales de las bandejas de semillas **90** y las bandejas de muestras **92** con las salidas del transportador de semillas y el transportador de muestras.

Como se muestra en la **figura 9** en el extremo de entrada **102** del tubo **100** del transportador de semillas **32**, un soporte **240** monta un amplificador de aire **242** y un tubo de sensores de semillas **244**. El soporte **240** comprende secciones **246**, **248**, **250**, **252** y **254**. Como se muestra en la **figura 2**, el soporte **240** se monta en la placa de montaje de tolva **142**. El amplificador de aire **242** (mostrado en la **figura 12**) se adapta para conectarse a una fuente de aire comprimido. Cuando se aplica aire al amplificador de aire, se induce un flujo de aire a través del tubo **100**, empleando el efecto Venturi. El tubo sensores **244** lleva sensores de semillas **256** para detectar el paso de una semilla a través del mismo. Los sensores **256** son preferiblemente sensores ópticos alineados con aberturas en el tubo de sensores **244** que detectan ópticamente el paso de una semilla.

Como se muestra en la **figura 10**, un conjunto de descarga de semillas **260** se dispone en el extremo de salida **104** del tubo **100** del transportador de semillas **32**. El conjunto de descarga se monta sobre el montante **66**, con un soporte **262** y un soporte de descarga **264**. El tubo de sensores de semillas **266** se monta en el soporte **262**, y lleva sensores de semillas **268** para detectar el paso de una semilla a través del mismo. Los sensores **268** son preferiblemente sensores ópticos alineados con aberturas en el tubo de sensores **266** que detectan ópticamente el paso de una semilla. Un amplificador de aire **270** se conecta al tubo de sensores de semillas **266**. El amplificador de aire **270** (**Figura 12**) se adapta para conectarse a una fuente de aire comprimido. Cuando se aplica aire comprimido al amplificador de aire, se induce un flujo de aire a través del tubo **100**, empleando el efecto Venturi. Por debajo del amplificador de aire **270** se encuentra un tubo de conector **272**, y por debajo del mismo hay un tubo de descarga de semilla ventilado **274**, que está asimismo soportado por un porta-tubo de descarga de semillas **276**, llevado sobre un accionador de tubo de descarga de semilla **278**.

El extremo de entrada **122** del tubo **120** del transportador de semillas **34** se conecta mediante **168** al tubo de descarga de muestras **166**. Como se muestra en la **figura 11**, el extremo de salida **124** del tubo **120** se conecta a un conector de muestra **280**, que a su vez se conecta al amplificador de aire **282**, que se conecta al conjunto de boquilla de fragmentos **284**. El conjunto de boquilla de fragmentos **284** se monta sobre el porta-tubo de descarga de semilla **286**, que es llevado sobre un accionador de descarga **288**. El accionador de descarga se monta sobre el montante **68**. Los filtros **290** se montan sobre las salidas del conjunto de boquilla de chip **284**, para evitar que las muestras que se están descargando contaminen los otros compartimentos.

Funcionamiento del sistema muestreador

En funcionamiento, una pluralidad de semillas, por ejemplo semillas de soja, se depositan en la tolva **70**. El mecanismo de alimentación de semillas **74** transporta una semilla individual a la estación de muestreo **72**. En la estación de muestreo, se retira una muestra de material de la semilla de manera a reducir al mínimo el impacto sobre la viabilidad de la semilla.

La muestra se retira de la estación de muestreo **74** por el transportador de muestras **34**. El dispositivo Venturi **126** crea un flujo de aire en el tubo **120** hacia el extremo de salida **124**. El material de muestra es arrastrado dentro del tubo y hacia el compartimento de la bandeja de muestras alineada con el extremo de salida **124** del tubo **120**. El separador **128** separa la muestra de la corriente de aire que la lleva, y permite que la muestra caiga dentro del compartimento. En algunas realizaciones, la muestra se puede distribuir en dos o más compartimentos en la misma bandeja, en cuyo caso el mecanismo de traslación bidimensional **30** se usa para poner uno o más compartimentos adicionales en alineación con la salida **124**. Es posible coordinar con precisión el movimiento de las bandejas de muestras con el funcionamiento de la estación de muestreo **72** de manera que las muestras de diferentes porciones de la semilla, y en particular diferentes profundidades de la semilla, puedan ser proporcionadas a compartimentos separados en la bandeja de muestras.

Después de terminar el muestreo de la semilla, se acciona el transportador de semillas **32** para retirar la semilla de la estación de muestreo. El primer dispositivo Venturi **106** se acciona para crear un flujo de aire en el tubo y arrastrar una semilla de la extracción de muestreo **72** dentro del tubo **100**. El segundo dispositivo Venturi **108** se acciona entonces para crear un flujo de aire en la dirección opuesta, permitiendo de este modo ralentizar la semilla para reducir el daño a la semilla a medida que sale por el extremo de salida **104** del tubo **100** y se suministra a un compartimento en la bandeja de semillas **92**. El segundo Venturi **108** detiene preferiblemente el movimiento de la semilla, haciendo que caiga por gravedad en su compartimento en una bandeja **90**. El funcionamiento del primer y el segundo Venturi **106** y **108** se puede temporizar, o se pueden poner en marcha por sensores de posición que vigilan el tubo **100**.

Una realización de un sistema muestreador de semillas de alto rendimiento se indica generalmente como **500** en las **figuras 13-26**. Como se muestra en las **figuras 13** y **14**, el sistema muestreador de semillas **500** comprende una estación de muestreo **502**, una estación de manipulación de muestras **504**, y una estación de manipulación de semillas **506**. Es deseable, pero no esencial, que el sistema muestreador de semillas **500** se ajuste en uno o más carretillas con ruedas que pueden pasar a través de puertas convencionales, de manera que el sistema pueda ser transportado de manera convencional. En la realización preferida, la estación de muestreo de semillas **502** se monta sobre una carretilla **508**, la estación de manipulación de muestra se monta sobre una carretilla **510**, y la estación de manipulación de semillas se monta sobre una carretilla **512**.

La estación de muestreo de semillas **502** comprende un alimentador de semillas **514** y una trituradora **516**. Una

pluralidad de columnas **518** se extiende verticalmente hacia arriba desde la superficie **520** de la carretilla **508**. Una plataforma **522** se monta sobre la parte superior de unas columnas **518** y soporta la trituradora de semillas **514**. Dos soportes en forma de L **524** se extienden horizontalmente desde las columnas **518**, y soportan una plataforma **526**. Un piso **528** se monta sobre la plataforma **526** por una pluralidad de montantes **530** y soporta el alimentador de semilla **514**.

Una pluralidad de pilares **532** se extienden hacia arriba desde la placa **522**. Una placa **534** se monta sobre los pilares **532**. Una pluralidad de montantes **536** dependen de la placa **534**, y soportan un estante **538**.

Como se muestra en las figuras 13, 14, 15 y 16, el alimentador de semillas **514** comprende una tolva **550**, con una superficie conformada adaptada para alimentar semillas depositadas en la tolva hacia una rueda de separación **552** (véase también las figuras **13A** a **23C**). La rueda de separación **552** se monta para girar en un plano vertical adyacente a la tolva **550**, y tiene una pluralidad de rebajes espaciados **554** que tienen cada uno una abertura **556** en su interior que comunica con un sistema de vacío (no mostrado). La rueda **552** avanza con un motor de indexación **560**. Las semillas individuales son recogidas por los rebajes **554** en la rueda **552** y mantenidas en los rebajes por succión a partir del sistema de vacío por las aberturas **556**. Una rasqueta **562** elimina las semillas individuales de los rebajes **554**, permitiéndolas caer a través de una guía **564** dentro de una abertura en un distribuidor **566**.

Como se muestra en las figuras **24-26**, el distribuidor **566** comprende un árbol **568** que tiene una pluralidad (seis en la realización preferida) de pasos **570** que se extienden transversalmente a través del mismo. Las camisas **572** y **574** se montan deslizando sobre cada extremo del árbol **568** para trasladarse entre la primera posición (interior) y la segunda posición (exterior). Las camisas **572** y **574** tienen una pluralidad de pares de aberturas alineadas **576** y **578** sobre lados opuestos de las mismas. Las aberturas **576** son alargadas y las aberturas **576** y **578** se dimensionan y disponen de manera que cuando las camisas **572** y **574** están en su primera posición (interior) (en el lado izquierdo en la figura **24**), una parte de las aberturas alargadas **576** se alinea con un paso **570** en el árbol **568**, y cuando las camisas se encuentran en su segunda posición (exteriores) una porción de las aberturas alargadas **576** y las segunda aberturas **578** se alinean con el paso (en el lado derecho en la figura **24**). Un accionador **580** desliza selectivamente las camisas **572** y **574** entre su primera y segunda posiciones.

El distribuidor **566** se monta mediante un soporte **582** sobre el carro **582** de un accionador lineal **586**, para trasladar respecto de la guía **564**, poniendo sucesivamente cada uno de los pasos **570** en el árbol **568** en alineación con la guía **564** para que una semilla se pueda depositar en su interior. Un sensor de semillas (no mostrado) se puede montar adyacente a la guía **564** para confirmar que una semilla se deposita en cada paso **570**. Una pluralidad de boquillas de aire **590** se montan en el piso **528**, y se alinean con los pasos **570** cuando el distribuidor **566** se desplaza dentro de su posición de dispensación por el accionador **586**. Un tubo **592** se alinea con cada paso **570**, y cada tubo se conecta a una de una pluralidad de estaciones de muestreo de semillas **600** en la trituradora de semillas **515**. Las semillas **572** y **574** se trasladan permitiendo a las semillas en los pasos **570** caer dentro de los tubos **592**. Una de las boquillas **590** se alinea con cada uno de los pasos **570**, y se acciona para facilitar el movimiento de las semillas desde los pasos **570** a través de los tubos **592** a sus estaciones de muestreo de semillas **600** respectivas.

Hay preferiblemente un orificio **596** a través de la tolva **550** que se alinea con la abertura **556** en cada rebaje **554** a medida que la rueda **552** gira. El orificio **596** se puede conectar a un hueco para extraer cualquier suciedad o fragmentos de cascara de semillas o semilla que pueda atascar las aberturas **556** en el rebaje **554**, y dificultar la capacidad de la rueda **552** de seleccionar semillas individuales de la tolva **550**.

La trituradora de semillas **516** comprende al menos una, y en esta realización preferida seis, estaciones de muestreo **600**. Cada estación de muestreo de semillas **600** retira una muestra de material de una semilla suministrada a la misma. En esta realización preferida, las estaciones de muestreo **600** se disponen o agrupan en dos grupos de tres, pero el número y disposición de las estaciones de muestreo podría variar. La estación de manipulación de muestras **504** recibe muestras de tejido retiradas de una semilla y transportadas separadas de cada estación de muestreo **600**. Asimismo, la estación de manipulación de semillas **506** recibe una semilla después de haberse retirado una muestra de la semilla, y la semilla se transporta desde la estación de muestreo **600**.

Cada estación de muestreo **600** tiene un anillo de entrada **602** conectado al tubo **590**, que se abre a una cámara **604**. La superficie de fondo de la cámara **604** se forma mediante el extremo de una varilla **606** de accionador **608**. La superficie del fondo está por debajo del anillo de entrada **602** para garantizar que toda la semilla cae dentro de la cámara **604** y no queda atrapada en posición solo parcialmente en la cámara. Un respiradero **610** se puede situar opuesto al anillo de entrada **602** para permitir que el aire de las boquillas de aire **590** se escape. El respiradero **610** se puede cubrir con una rejilla de malla **612** para evitar que la semilla se escape de la cámara **604** y para amortiguar la semilla a medida que se suministra dentro de la cámara.

Esta varilla **606** extrae una semilla de la cámara **604** y la introduce dentro de un rebaje de recepción de semillas **614** en la parte inferior de una placa de muestreo de semillas **616**. La placa de muestreo **616** tiene una abertura de muestreo **618** a través de la cual sobresale una semilla en el rebaje de recepción de semillas **614**. Una ranura de muestreo **620** se forma en la superficie superior de la placa de muestreo **616** de manera que una porción de una semilla en el rebaje **614** sobresale dentro de la ranura. La placa de muestreo **616** tiene también aberturas

lateralmente orientadas **622** y **624** alineadas en su interior con el rebaje de recepción de semillas **614**. Cuando la varilla **606** introduce una semilla proporcionada a la estación de muestras dentro del rebaje **614** en la placa **616**, los dedos **626** y **628** se extienden transversalmente a través de las aberturas **622** y **624** y son accionadas por el accionador **630** para enganchar y comprimir la semilla. Se ha descubierto que la compresión en algunos tipos de semillas durante el proceso de muestreo puede mejorar la viabilidad de las semillas después del muestreo. Para las semillas tales como las semillas de soja, se ha descubierto que una presión compresiva mejora la viabilidad de las semillas, y que la presión compresiva de entre aproximadamente 0,12 kPa y aproximadamente 0,24 kPa es suficiente para mejorar la viabilidad.

Un husillo de muestreo **650** que tiene una pluralidad de borde de corte **652** que oscilan en la ranura **620** de manera que los bordes de corte **652** pueden raspar una muestra de una semilla retenida en el rebaje **614** por la varilla **606** y los dedos **626** y **628**. Los bordes de corte **652** son preferiblemente paralelos, y orientados formando un ángulo oblicuo inferior a 90° respecto de la dirección de avance del husillo. Es deseable, pero no esencial, que los bordes de corte **652** se pueden ajustar suficientemente en ángulo para que un borde permanezca en contacto con la semilla en todo momento. El ajuste en ángulo de los bordes de corte permite que la siguiente cuchilla entre en contacto con la semilla antes de que la cuchilla actual pierda el contacto con la semilla. En la realización preferida, los bordes de corte se orientan formando un ángulo de aproximadamente 60°, aunque este ángulo dependerá en alguna medida de la anchura del husillo. La anchura del husillo puede también ser importante para preservar la viabilidad de las semillas después del muestreo, y puede variar dependiendo del tipo de semilla y su contenido en humedad.

Los bordes de corte **652** están escalonados, siendo cada corte progresivamente más profundo que el anterior. La cantidad de material de muestra y la profundidad del corte se pueden controlar controlando el avance del husillo **650**. Para muestras más pequeñas y profundidades más superficiales de corte, la carrera del husillo **650** es menor, y para muestras mayores o profundidades más profundas de corte, la carrera del husillo es más larga. Para carreras parciales, los tejidos de la semilla pueden quedar atrapados entre los bordes **652**. El husillo **650** puede avanzar y retraerse para ayudar a la liberación de toda la muestra. Por ejemplo, después de la liberación de la semilla, el husillo puede avanzar y retraerse para ayudar a retirar el tejido de semilla atrapado entre los bordes de corte. Todo el intervalo de desplazamiento del husillo **650** se muestra en las figuras **19A** y **18B**.

El husillo de muestreo **650** es impulsado preferiblemente por un accionador lineal **654**. En la realización preferida, tres husillos **650** son impulsados por un solo accionador **654**. Usar un único accionador para accionar múltiples husillos ahorra espacio y es más económico.

Un sistema de transporte de muestras **656** que comprende un conducto **658** que tiene una entrada **660** que comunica con un paso **662** que se abre a la abertura de muestreo **618** y la ranura **620** en la placa de muestreo **616** retira muestras de tejido realizadas por la acción de los bordes de corte **652** del husillo de muestreo **650**. El conducto **658** trasporta la muestra a la salida **664** donde se deposita en un único portamuestras en la estación de manipulación de muestras **504**. Este porta-muestras puede ser, por ejemplo, un pocillo **666** en una bandeja **686** montada en una tabla de indexación x-y **688** sobre la carretilla **612**, de manera que se pueda determinar la relación entre las muestras y sus semillas respectivas. El mecanismo de transporte de semillas **680** incluye un chorro de aire **690** que induce un flujo de aire a través del conducto **658** para desplazar la muestra a través del conducto.

Se puede montar un segundo mecanismo de muestreo sobre el accionador lineal **654** y moverse con el husillo **650**. El segundo mecanismo de muestreo puede comprender un dispositivo de muestreo **674**, que tiene una herramienta de extracción **676** para tomar una muestra de la semilla del corte hecho por el husillo **650**. El tejido de esta muestra procede de una zona más profunda que el tejido levantado por el husillo **650** y proporciona una información diferente. En algunas realizaciones, el material retirado por el husillo **650** simplemente se puede desechar y solo se conservará el material tomado por el dispositivo de muestreo **674**. En algunas realizaciones pueden conservarse ambas muestras y almacenarlas por separado para analizarlas de manera individual. En otras realizaciones más, la única muestra es la tomada por el husillo **650**. En las realizaciones sin el segundo mecanismo de muestreo, se pueden sustituir el dispositivo de muestreo **674** y la herramienta de extracción **676** por un accionador con una varilla de empuje simple que se extiende a través de la abertura de muestreo **618** para ayudar a empujar a una semilla hasta el rebaje **614**.

Después de la operación de muestreo, un mecanismo de transporte de semillas **680**, que tiene un rebaje **614** adyacente a una entrada **682** para introducir semillas después de que hayan sido liberadas por los dedos **626** y **626** y la varilla **606**, hace descender la semilla. El sistema de transporte de semillas **680** transporta en la carretilla **512** las semillas a un receptáculo para semillas único de la estación de manipulación de semillas **506**. Este receptáculo puede ser, por ejemplo, un pocillo **684** de una bandeja **686** montada en una tabla de indexación **688** de la carretilla **612**, de tal manera que se puede determinar la relación entre muestras y sus respectivas semillas. El mecanismo de transporte de semillas **680** incluye un chorro de aire **690** que induce un flujo de aire a través del conducto **680** para desplazar la muestra a través del conducto.

Funcionamiento

En funcionamiento, una pluralidad de semillas, por ejemplos semillas de soja, se vierten en la tolva **550** del sistema de muestreo **500**. Estas semillas fluyen por gravedad hacia el disco **552**, la succión a través de los orificios **556**

retiene una semilla en cada cavidad **554**. A medida que el disco **552** gira mediante el motor de indexación **560**, las semillas individuales se eliminan del disco mediante la rasqueta **562**, y caen por gravedad a través de la guía **564** en la salida. El accionador lineal **586** desplaza el distribuidor **566** para que cada paso **570** del distribuidor se alinee con la guía **564** para cargar una semilla a través de la abertura **576** y dentro del paso **570**. Cuando todos los pasos **570** en el distribuidor **566** están llenos, el accionador lineal **568** desplaza el distribuidor a la posición de carga de sus semillas dentro de las estaciones de muestreo **600** en la trituradora de semillas **516**. Las camisas **572** y **574** se desplazan mediante el accionador **580**, que alinea las aberturas **578** con los pasos **570**, permitiendo que las semillas en los pasos **570** caigan dentro de los tubos **592** que conducen a las unidades de muestreo **600**. Las boquillas **590** proporcionan una ráfaga de aire que ayuda a empujar las semillas desde los pasos **570** a través de los tubos **592** a las cámaras **604** en las unidades de muestreo **600**.

Preferiblemente todos los pasos **570** se cargan en serie y descargan sus semillas simultáneamente a las unidades de muestreo **600**, pero el distribuidor se podría programar para accionar de alguna manera. Una vez que las semillas llegan a las estaciones de muestreo **600**, las varillas **606** levantan las semillas dentro de los rebajes **614** en la parte inferior de las placas **616**. Los rebajes **614** se pueden dimensionar y conformar para ayudar a orientar de manera óptima la semilla. En los rebajes **614**, una porción de las semillas sobresale a través de los orificios de muestreo **618** y dentro de las ranuras **620**. Los husillos **650** se trasladan en las ranuras **620** permitiendo que sus bordes de corte **652** retiren material de las porciones de las semillas que sobresalen dentro de las ranuras **620**, y formando pequeños cortes en las semillas. A medida que cada husillo **650** retira material, el sistema de transporte de muestras **656** arrastra el material de muestra a través del paso **662** y dentro de la entrada **660**. Las muestras se desplazan en los conductos **658** alejándose de las estaciones de muestreo **600** a una localización de almacenamiento de muestras, tal como pocillos **666** en una bandeja de muestras **668**. Una segunda muestra puede ser tomada por una herramienta de extracción **676** del dispositivo de muestreo **674** a través de la abertura **618** en la placa de muestreo **616**. Después de terminar el muestreo, la varilla **606** se retrae, y a medida que la semilla cae el sistema de transporte de semillas muestreadas **680** transporta la semilla muestreada a una localización de almacenamiento de semillas, tales como un pocillo **684** en una bandeja de semillas **688**.

Las tablas de indexación **670** y **688** se desplazan para alinear diferentes pocillos con las salidas del sistema de transporte de muestras **565** y el sistema de transporte de semillas **680**, y se repite el proceso de muestreo. Cuando todos los pocillos **666** en una bandeja de muestras **668** están llenos, las muestras en la bandeja de muestras se pueden ensayar, y las semillas en la bandeja de semillas **686** correspondientes se pueden seleccionar basándose en los resultados del ensayo de muestras. El muestreo no afecta preferiblemente de manera sustancialmente adversa la viabilidad de las semillas.

Aplicaciones

La presente invención proporciona procedimientos para analizar un rasgo, marcador o genotipo deseado. En un aspecto de la invención, los procedimientos analíticos permiten que las semillas individuales a analizar que están presentes en una partida o una población a granel de semillas para que se puedan determinarlas características químicas y/o genéticas de las semillas individuales.

Se pueden usar muestras preparadas por la presente invención para determinar una gran variedad de rasgos físicos, químicos y/o genéticos. Ejemplos de análisis químicos para su uso en los procedimientos de la presente invención incluyen el contenido de almidón, contenido de proteínas, contenido de aceites, la determinación de perfiles de ácidos grasos, etc.

En una realización, los procedimientos de la presente invención se pueden usar en un programa de cultivo para seleccionar plantas o semillas que tienen un rasgo, marcador o genotipo deseado. Los procedimientos de la presente invención se pueden usar en combinación con cualquier metodología de cultivo y se pueden usar para seleccionar una única generación o para seleccionar múltiples generaciones. La elección de los procedimientos de cultivo depende del modo de reproducción de plantas, siendo la heredabilidad del o de los rasgos mejorada, y el tipo de cultivar usado comercialmente (por ejemplo, cultivar híbrido F_1 , cultivar de línea pura, etc.). Los enfoques no limitativos seleccionados para cultivar las plantas de la presente invención se establecen en lo sucesivo. Cabe entender además, que cualesquiera cultivares comerciales y no comerciales se pueden usar en un programa de cultivo. Los factores tales como, por ejemplo, vigor de emergencia, vigor vegetativo, tolerancia al estrés, resistencia a enfermedades, ramificación, floración, desarrollo de semillas, dimensión de semillas, densidad de semillas, resistencia, y desgranabilidad, etc. Dictarán generalmente la elección.

En una realización particular, los procedimientos de la presente invención se usan para determinar las características genéricas de las semillas en un programa de cultivo asistido por marcadores. Tales procedimientos permiten programas de cultivo asistidos por marcadores mejorados en los cuales se puede llevar a cabo el muestreo directo de semillas de manera no destructiva mientras se mantiene la identidad de los individuos del muestreador de semillas al campo. En consecuencia, el programa de cultivo asistido por marcadores da como resultado una plataforma de "alto rendimiento" en la cual una población de semillas que tiene un rasgo, marcador o genotipo deseado se pueden agrupar más efectivamente en un periodo de tiempo más corto, con menos recursos requeridos de campo y de mano de obra. Tales ventajas se describirán de manera más completa en lo sucesivo.

En una realización, la presente invención proporciona un procedimiento para analizar semillas individuales dentro de una población de semillas que tienen diferencias genéticas. El procedimiento comprende retirar una muestra que comprende células con ADN de semillas en la población sin afectar a la viabilidad de germinación de las semillas; seleccionar del ADN extraído de la muestra para la presencia o ausencia de al menos un marcador genético; seleccionar semillas de la población basándose en los resultados de la selección de ADN; y cultivar plantas a partir de la semilla seleccionada.

Como se ha descrito anteriormente, los sistemas y procedimientos de muestreo de esta invención protegen la viabilidad de germinación de las semillas y no son destructivos. La viabilidad de germinación significa que un número predominante de semillas muestreadas, (es decir, superior al 50% de todas las semillas muestreadas) permanecen viables después del muestreo. En una realización particular, al menos aproximadamente el 75% de las semillas muestreadas, y en algunas realizaciones al menos aproximadamente el 85% de las semillas muestreadas siguen siendo viables. Cabe resaltar que pueden ser tolerables proporciones inferiores de viabilidad de germinación en algunas circunstancias o para algunas aplicaciones, por ejemplo, ya que los costes de genotipificación se reducen con el tiempo porque un mayor número de semillas se podría muestrear con el mismo coste de genotipo.

En otra realización, la viabilidad de germinación se mantiene durante al menos seis meses después del muestreo para garantizar que la semilla muestreada será viable hasta que alcance el campo para su plantación. En una realización particular, los procedimientos de la presente invención comprenden, además, tratar las semillas muestreadas para mantener la viabilidad de germinación. Tal tratamiento puede incluir generalmente cualquier medio conocido en la técnica para proteger una semilla de las condiciones ambientales durante el almacenamiento o el transporte. Por ejemplo, en una realización, las semillas muestreadas se pueden tratar con un polímero y/o un fungicida para proteger la muestra muestreada durante el almacenamiento o el transporte al campo antes de su plantación.

El ADN se puede extraer de la muestra usando cualesquiera procedimientos de extracción de ADN conocidos por el experto en la técnica, el cual proporcionará rendimiento de ADN, calidad de ADN y respuesta PCR suficientes. Un ejemplo no limitativo de procedimientos de extracción de ADN apropiados es la extracción basada en SDS con centrifugación. Además, el ADN extraído se puede amplificar después de la extracción usando cualquier procedimiento de amplificación conocido por el experto en la técnica. Por ejemplo, un procedimiento de amplificación apropiado es la preparación de amplificación de ADN Fenomphi® de AmershamBiosciences.

Le ADN extraído se criba para la presencia o ausencia de un marcador genético apropiado. Una gran variedad de marcadores genéticos son disponibles y conocidos por el experto en la técnica. El cribado de ADN para la presencia o ausencia del marcador genético se puede usar para la selección de semillas en una población de cultivo. Los alelos, QTL, o halotipos a seleccionar para poder ser identificados usando recientes técnicas de biología molecular con modificaciones de las estrategias de cultivo clásicas.

En una realización, la semilla se selecciona basándose en la presencia o ausencia de un marcador genético que se une genéticamente a un QTL. Ejemplos de QTL que son a menudo de interés incluyen pero no se limitan a rendimiento, resistencia al acostado, altura, madurez, resistencia a enfermedades, resistencia a plagas, resistencia a deficiencia de nutrientes y composición del grano. Alternativamente, la semilla se puede seleccionar basándose en la presencia o ausencia de un marcador que está unido genéticamente a un halotipo asociado a un QTL. Ejemplo de tal QTL puede de nuevo incluir sin limitación rendimiento, resistencia al acostado, altura, madurez, resistencia a enfermedades, resistencia a plagas, resistencia a deficiencia de nutrientes y composición del grano.

La selección de una población de cultivo se puede iniciar ya al nivel de cruce F_2 , si los parentales endógamos homocigóticos se usan en el cruce inicial. Una generación F_1 también se podría muestrear y avanzar si uno o más de los parentales del cruce son heterocigóticos para los alelos o marcadores de interés. Le cultivador puede cribar cualquier población F_2 para recuperar el genotipo marcador de cada individuo en la población. Las dimensiones de población inicial, limitadas solo por el número de semillas disponibles para cribar, se pueden ajustar para cumplir con la probabilidad deseada de identificar con éxito el número deseado de individuos. Véase Sedcole, J.R. "Number of plants necessary to recover a trait". Crop Sci. 17:667-68 (1977). En consecuencia, la probabilidad de encontrar el genotipo deseado, la dimensión de población inicial, y la dimensión de población resultante diana se puede modificar para varias metodologías de cultivo y el nivel de endogamia de la población muestreada.

Las semillas seleccionadas se pueden agrupar o mantener separadas dependiendo de la metodología de cultivo y la diana. Por ejemplo, cuando un criador está cribando una población F_2 para resistencia a enfermedades, todos los individuos con el genotipo deseado se pueden agrupar y plantar en viveros. Inversamente, si se seleccionan múltiples QTL con efectos variables para un rasgo tal como rendimiento de granos a partir de una población dada, el criador puede mantener la identidad individual preservada, yendo al campo para diferenciar individuos con varias combinaciones del QTL diana.

Se pueden usar varios procedimientos para preservar una única identidad de semilla, mientras se transfiere la semilla del laboratorio al campo. Los procedimientos incluyen, pero no se limitan a, transferir individuos seleccionados a una banda de semillas, una bandeja de casete, o la bandeja de indexación, trasplantar con macetas con turba, y plantar a mano a partir de paquetes de semillas individuales.

Se pueden usar múltiples ciclos dependiendo de las dianas de cultivo y la complejidad genética.

Las ventajas de usar los procedimientos de criba de la invención incluyen, sin limitación, la reducción de mano de obra y los recursos de campo requeridos por población o línea de cultivo, mayor capacidad para evaluar un mayor número de poblaciones de cultivo por unidad de campo, y mayor capacidad para cribar poblaciones de cultivo para rasgos deseados antes de la plantación. Los recursos de campo por población se reducen limitando el espacio de campo requerido para avanzar los genotipos deseados. Por ejemplo, una población de 1.000 individuos se pueden plantar en 25 semillas por fila consumiendo un total de 40 filas en el campo. Usando el muestreo de tejido convencional, las 1.000 plantas se catalogan y muestrean manualmente evaluando el tejido foliar. Los resultados del marcador molecular serían necesarios antes de la polinización y solo se polinizarían las plantas que contienen la composición genética deseada. De este modo, si se determinase que 50 semillas contenían la composición genética deseada, la metodología de cultivo convencional requeriría la plantación de 1.000 plantas para obtener 50 semillas. Por el contrario, los procedimientos de cribado de esta invención permiten que al criador cribar las 1.000 semillas en el laboratorio y seleccionar las 50 semillas deseadas antes de la plantación. Los 50 individuos se pueden entonces plantar en el campo, consumiendo dos filas de 25 filas de semillas. Además, los procedimientos de cribado de esta invención no requieren catalogación o muestreo en el campo, reduciendo de este modo de manera significativa los recursos de mano de obra necesarios.

Además, de reducir el número de filas de campo por población, los procedimientos de cribado de la invención pueden aumentar, además, el número de poblaciones que el criador puede evaluar en un vivero dado. Usando el ejemplo anterior en el cual 50 semillas de cada población de 1.000 semillas contenían la composición genética deseada, un criador que aplica los procedimientos de la invención podrían evaluar 20 poblaciones de 50 semillas cada uno usando la misma área de campo consumida por una única población usando técnicas de muestreo de tejido de campo convencionales. Incluso si se seleccionan las poblaciones para un único alelo, usando una relación de segregación esperada de 1:2:1 para una población F_2 , el criador evaluaría 4 poblaciones en la misma área de campo que una única población muestreada de tejido de campo.

Una ventaja potencial adicional a la división de semillas es que se podría usar para mitigar los riesgos asociados al cultivo de plantas en algunas geografías en las que las plantas pueden crecer con dificultad o experimentar condiciones ambientales pobres. O incluso destruirse durante las tormentas. Por ejemplos, las semillas con la "mejor" composición de genotipo o marcador se podrían plantar en la geografía 1 y las semillas con el "siguiente mejor genotipo" se podrían plantar en la geografía 2. En este caso, la geografía 2 sería una copia de seguridad en caso de que se produzca cualquier problema en las plantas cultivadas en la geografía 1. Esto es muy difícil de llevar a cabo con el procedimiento tradicional de toma de muestras de tejido de plantas germinadas para genotipificación, porque estas plantas necesitarían entonces desarraigarse y trasplantarse en la segunda geografía. Usando los procedimientos de esta invención se evita el problema del trasplante.

Los procedimientos de cribado de la invención se pueden usar, además, en un programa de cultivo para la introgresión de un rasgo en una planta. Tales procedimientos comprenden retirar una muestra que comprende células con ADN de las semillas en una población, cribar el ADN extraído de cada semilla para la presencia o ausencia de al menos un marcador genético, seleccionar semillas de la población basándose en los resultados del cribado de ADN, cultivar una planta fértil a partir de la semilla; y usar la planta fértil bien como un parental hembra o un parental macho en un cruce con otra planta.

Ejemplo de cribado genético para seleccionar semillas para la integración de rasgos incluyen, sin limitación, la identificación de frecuencias de alelo s parentales recurrentes altas, seguimiento de transgenes de interés o cribado para la ausencia de transgenes no deseados, selección de semilla híbridas de ensayo, y ensayo de cigosidad.

La identificación de frecuencias de alelos pares recurrentes por los procedimientos de cribado de la presente invención permite de nuevo un número reducido de filas por población y un número mayor de poblaciones, o líneas endogamas, a plantar en una unidad de campo dada. De este modo, los procedimientos de cribado de la presente invención pueden también reducir efectivamente los recursos requeridos para terminar la conversión de líneas endogamas.

Los procedimientos de la presente invención se pueden aplicar, además, para identificar una semilla híbrida para ensayo de transgenes. Por ejemplo, en una conversión en una línea endogama en el piso BC_nF_1 , un criador podría crear efectivamente un lote de semillas híbridas (salvo la selección de gametos) que era del hemicigótico al 50% para el rasgo de interés y homocigótico al 50% para la falta de raso con el fin de generar una semilla híbrida para ensayo. El criador podría entonces cribar todas las semillas F_1 producidas en el cruce de ensayo e identificar y seleccionar las semillas que eran homocigóticas. Tal procedimiento es ventajoso porque las interferencias de los ensayos híbridos representarían productos genéticos híbridos comerciales respecto de la cigosidad del rasgo.

Otras aplicaciones de los procedimientos de cribado de la invención para identificar y seguir los rasgos de interés tienen las mismas ventajas identificadas anteriormente respecto del del campo y los recursos de mando de obra requeridos. Generalmente, los programas de conversión transgénica se ejecutan en localizaciones multitemporada que llevan una mayor estructura de coste de gestión y una de tierra. De este modo, el impacto bien en la reducción de las necesidades de filas por población o bien en el aumento del el número de poblaciones dentro de una unidad

de campo dada es significativamente más drástico en el coste frente a aplicaciones modelo.

Asimismo, los procedimientos de cribado de la invención se pueden usar para mejorar la eficiencia del programa de doble haploide a través de la selección de genotipos deseados en la etapa haploide y la identificación del nivel de ploidía para eliminar el procesamiento de las semillas no haploides y su avance en el campo. Ambas aplicaciones dan de nuevo como resultado la reducción de los recursos de campo por población y la capacidad de evaluar un mayor número de poblaciones dentro de una unidad de campo dada.

En otra realización, la invención proporcionar, además, un ensayo para predecir la cigosidad embrionaria para un gen particular de interés (GOI). El ensayo predice cigosidad embrionaria basándose en la relación del número relativo de copias de un GOI y de un gen de control interno (IC) por célula o por genoma. Generalmente, este ensayo usa un gen IC que es de cigosidad conocida, por ejemplo, homocigótico en el locus (dos copias IC por célula diploide), para normalizar la medición del GOI. La relación de los números relativos de copias del IC respecto del GOI predice el número de copias GOI en la célula. En una célula homocigótica para cualquier gen dado, (o secuencia genética única), el número de copia de gen es igual al nivel de ploidia de la célula ya que la secuencia está presente en el mismo locus en todos los cromosomas homólogos. Cuando una célula es heteróloga para un gen particular, el número de copia del gen será inferior al nivel de ploidia de la célula. La cigosidad de una célula en cualquier locus se puede determinar de este modo por el número de copias de gen en la célula.

En una realización particular, la invención proporciona un ensayo para predecir la cigosidad embrionaria del maíz. En la semilla de maíz, el tejido de endospermo es triploide, mientras que el tejido embrionario es diploide. El endospermo que es homocigótico para IC contendrá tres copias de IC. El número de copias del endospermo GOI puede variar entre 0 (homocigótico negativo) y 3 (homocigótico positivo); y el número de copias de endospermo GOI de 1 o 2 se encuentra en la semilla que es homocigótico para el GOI (o hemicigótico para el GOI si el GOI es un transgen). El número de copias de endospermo es un reflejo de la cigosidad del embrión: un endospermo homocigótico (positivo o negativo) acompaña un embrión homocigótico, el endospermo heterocigótico (con un número de copia de 1 o 2) refleja un embrión heterocigótico (número de copia GOI de 1). El número de copia de endospermo GOI (que puede variar entre 0 y 3 copias) se puede determinar a partir de la relación del número de copias de endospermo IC respecto del número de copias del endospermo GOI (que puede variar de 0/3 a 3/3, es decir, de 0 a 1), que se puede usar entonces para predecir la cigosidad del embrión.

Los números de copias del GOI o el IC se pueden determinar por cualquier técnica de ensayo apropiada para la cuantificación de números de copias, como es conocido en la técnica. Ejemplos de ensayos apropiados incluyen, pero no se limitan, a ensayos de PCR entiendo real (TaqMan®) (Applied Biosystems, Foster City, CA) e Invader® (Third Wave Technologies, Madison, WI). Preferiblemente, tales ensayos se desarrollan de manera que la eficiencia de amplificación tanto de las secuencias IC como GOI son iguales o muy similares. Por ejemplo en un ensayo de PCR en tiempo real con TaqMAN®, la señal de un GOI de copia única (se determina que la célula fuente sea heterocigótica para el GOI) será detectada un ciclo de amplificación más tarde que la señal de un IC de dos copias, porque la cantidad del GOI es la mitad de la del IC. Para la misma muestra heterocigótica, un ensayo Invader® mediría una relación GOI/IC de aproximadamente 1:2 o 0,5. Para una muestra que es homocigótica tanto para GOI como para IC, la señal GOI sería detectada al mismo tiempo que la señal IC (TaqMan®), y el ensayo Invader® mediría una relación GOI/IC de aproximadamente 2:2 o 1.

Estas directrices se aplica a cualquier célula diploide, o a las células haploides (tales como células de polen), ya que el número de copias del GOI o del IC siguen siendo proporcionales al número de copias de genoma (o nivel de ploidia) de la célula. De este modo, tales ensayos de cigosidad se pueden llevar a cabo en tejidos triploides tales como el endospermo de maíz.

Ejemplo

Los siguientes ejemplos son meramente ilustrativos, y no limitan en modo alguna esta divulgación.

Ejemplo 1

Este ejemplo describe un ensayo para predecir la cigosidad de embriones de maíz usando un gen de control interno (IC) homocigótico en el locus (es decir, dos copias IC en el embrión diploide y tres copias en el endospermo triploide). En una línea endogama de un organismo diploide (o ploidia superior) tal como maíz, el control interno endogamo es normalmente homocigótico, los eventos transgénicos en tales organismos en la primera generación (denominada "R0" en el maíz) son normalmente hemicigótico (es decir, el transgen está normalmente presente en solo uno de los dos o más cromosomas homólogos). El maíz (*Zea mays*) es un organismo diploide, de este modo, una evento R0 de "copia única" tiene una copia del GOI por célula, pero 0,5 copias por genoma haploide, un evento R0 de "dos copias" tiene dos copias del GOI por célula, pero 1 copia por genoma haploide, y así sucesivamente.

En este ejemplo, se usó tubulina como el gen IC y el GOI fue un transgen que codifica fosfotransferasa de neomincina II (NPT II), que se usa para selección de resistencia a la Kanamicina. El tejido de endospermo (triploide) se tomó de la semilla (bien por muestreo manual o raspando una semilla con un muestreador automatizado de la presente invención). La semilla de endospermo muestreado se germinó, y el tejido foliar (diploide) de una planta

germinada con éxito se muestreo también para análisis genético. El tejido foliar se correlaciona directamente con la cigosidad embrionaria y de ese modo se uso para demostrar que la cigosidad de endospermo predice generalmente la cigosidad del embrión y para confirmar las células de homocigosidad del endospermo. El ADN genómico total se extrajo del tejido de endospermo y del tejido foliar, y se analizó cuantitativamente usando un ensayo Invader® con sondas oligonucleotídicas específicas para el gen de interés, NPT II, o para el gen de control interno, tubulina. La relación del GOI respecto del IC se midió usando técnica convencionales de biología molecular. Véase la Tabla 1. Se muestra un sumario de resultados de múltiples experimentos en la Tabla 2.

Los resultados indicaron que la cigosidad de endospermo predijo generalmente la cigosidad del embrión (como se indica mediante la cigosidad de la hoja) y fue fiable en predecir homocigosidad para todas las semillas que germinaron. Asimismo, el análisis de cigosidad de endospermo dio predicciones homocigóticas de faso negativo (especialmente cuando el tejido de endospermo se obtuvo con el muestreador automatizado). Estos resultados demuestran que para una célula de un nivel de ploidia conocido, la relación de número de copias de un GOI respecto del de un IC que indica la cigosidad de esa célula. Asimismo, el ensayo de cigosidad de la presente invención puede predecir cigosidad de un tejido basándose en la cigosidad de otro, es decir, el ensayo puede predecir la cigosidad embrionaria basándose en la cigosidad de endospermo

Tabla 1

Relación Automatizada	Cigosidad automatizada	Relación manual	Cigosidad manual
1,39	Heterocigótico	1,42	Heterocigótico
0,14	Homocigótico negativo	0,12	Homocigótico negativo
0,08	Homocigótico negativo	0,08	Homocigótico negativo
0,13	Homocigótico negativo	0,10	Homocigótico negativo
0,10	Homocigótico negativo	0,08	Homocigótico negativo
1,55	Heterocigótico	1,38	Heterocigótico
0,84	Heterocigótico	1,45	Heterocigótico
0,14	Homocigótico negativo	1,48	Heterocigótico
1,48	Heterocigótico	1,37	Heterocigótico
1,39	Heterocigótico	1,47	Heterocigótico
2,03	Homocigótico POS	1,93	Homocigótico POS
0,13	Homocigótico negativo	0,05	Homocigótico negativo
1,71	Homocigótico POS	1,81	Homocigótico POS
0,81	Heterocigótico	1,41	Heterocigótico
1,84	Homocigótico POS	1,77	Homocigótico POS
1,54	Heterocigótico	1,43	Heterocigótico
1,48	Heterocigótico	1,50	Heterocigótico
0,92	Heterocigótico	1,40	Heterocigótico
1,51	Heterocigótico	1,42	Heterocigótico
1,60	Heterocigótico	1,37	Heterocigótico
0,86	Heterocigótico	1,47	Heterocigótico
1,81	Homocigótico POS	2,02	Homocigótico POS
0,15	Homocigótico negativo	ADN bajo	

1,89	Homocigótico POS	1,85	Homocigótico POS
0,21	Homocigótico negativo	0,10	Homocigótico negativo
0,09	Homocigótico negativo	0,11	Homocigótico negativo
0,89	Heterocigótico	1,50	Heterocigótico
1,50	Heterocigótico	1,37	Heterocigótico
1,82	Inconcluso	2,02	Homocigótico POS
2,14	Homocigótico POS	0,99	Inconcluso
1,22	Heterocigótico	1,44	Heterocigótico
2,22	Homocigótico POS	2,24	Homocigótico POS
0,79	Heterocigótico	1,40	Heterocigótico
1,23	Heterocigótico	1,47	Heterocigótico
1,49	Heterocigótico	1,38	Heterocigótico
1,33	Heterocigótico	1,37	Heterocigótico

Tabla 2

Procedimiento de muestreo de endospermo	Número de semillas homocigóticas identificadas por análisis de endospermo	Número de semillas homocigóticas predichas que no germinaron	Número de células homocigóticas confirmadas basadas en análisis de hoja	Número de células homocigóticas falso negativo
Manual	8 de 36	0	8 (todas)	5 (13,9%)
Automatizado	6 de 24	1	5	0
Manual	6 de 36	0	6 (todas)	2 (5,6%)
Automatizado	6 de 24	1	5	0
Manual	5 de 36	0	5 (todas)	7 (19,4 %)
Automatizado	7 de 24	2	5	0
Manual	7 de 36	1	6	0
Automatizado	5 de 24	2	3	0

Ejemplo 2

- 5 Este ejemplo demuestra el uso de los procedimientos de cribado de la presente invención en un programa para selección asistida por marcador de sojas con bajo contenido en ácido linoleico.

La soja es el cultivo de leguminosas más valioso, con muchos usos nutricionales e industriales debido a su composición química única. Las semillas de soja son una fuente importante de aceite vegetal, que se usa en productos alimentarios por todo el mundo. El nivel relativamente alto (habitualmente aproximadamente el 8%) de ácido linoleico (18:3) en el aceite de soja reduce su estabilidad y sabor. La hidrogenación del aceite de soja se usa para reducir el nivel de ácido linoleico (18:3) y mejorar tanto la estabilidad como el sabor de los aceites de soja. Sin embargo, la hidrogenación da como resultado la producción de ácidos grasos *trans*, que aumentan el riesgo de enfermedad cardíaca coronaria cuando se consumen. El desarrollo de soja con bajo contenido de ácido linoleico se ha complicado por la naturaleza cuantitativa del rasgo. Las variedades de soja con bajo contenido de ácido linoleico que se han desarrollado se han encontrado tener un bajo rendimiento, limitando su utilidad en la mayoría de los

ámbitos comerciales. Desarrollar un producto con un rendimiento de semillas comercialmente significativo es una prioridad elevada en la mayoría de los programas de desarrollo de cultivares de soja.

Un ejemplo de la aplicación de los procedimientos de cribado de la presente invención es la selección de plantas de soja tanto con gran rendimiento con un rendimiento de la progenie de Soja con un contenido de ácido linoleico reducido entorno al bajo contenido en ácido linoleico se basa principalmente en dos locus principales de rasgo cuantitativo (QTL) en *Fad3-1c*. El análisis de la segregación de plantas demuestra que *fad3-1b* y *Fad3-1c* controlan adicionalmente el contenido linolénico en soja. Por lo tanto, usando una combinación de marcadores para *Fad3-1b* y *Fad3-1c*, un criador que usa la invención puede predecir con precisión el contenido de ácido linolénico en las plantas de soja. Los marcadores se pueden usar para inferir el estado genotípico de una semilla en cualquier etapa en el proceso de cultivo, por ejemplo, en la etapa de línea endogama acabada, o la F_1 , F_2 , F_3 , etc.

Un híbrido F_1 seminal se puede producir cruzando dos líneas de soja endogamas (por ejemplo, cruzando una planta que contiene los alelos *Fad3-1b* y/o *Fad3-1c* asociados a contenido de ácido linoleico reducido a una planta que carece de estos alelos) seguido de autopolinización natural. Puesto que los marcadores se pueden usar para inferir el estado genotípico de una única semilla obtenida a partir de un interacoplamiento de tales líneas endogamas, se puede llevar a cabo el cultivo asistido por marcado de primera generación (es decir, F_2).

La semilla de soja a temperatura y humedad ambiente se equilibran normalmente a una humedad del 8% de peso en seco. La semilla de soja a este nivel de humedad tiende a partirse cuando se corta. Para reducir la división, la semilla debería humedecerse hasta un nivel de humedad del 12%. Cuando se pretrata de esta manera, la división se reduce significativamente hasta menos del 5%.

Las semillas F_2 seleccionadas que tienen el genotipo deseado se pueden agrupar o mantener separadas dependiendo de los objetivos de cultivo. Si se hubiesen seleccionado múltiple QTL con efectos variables a partir de una población dada, el criador podría preservar la única identidad de semilla para diferenciar los individuos con varias combinaciones del QTL de resistencia diana. Estas semillas se podrían plantar en el campo con identificación de campo apropiada. Varios procedimientos de preservación de identidad de semillas única se pueden usar mientras se transfiere la semilla desde el laboratorio de corte al campo. Los procedimientos incluyen transferir individuos seleccionados a la cinta se semillas hortícolas que también podría incluir identificación de radiofrecuencia para ayudar a la identificación de la semilla individual genotipificada. Otros procedimientos serían usar una bandeja de indexación, semillas de plantas en macetas con turba y a continuación trasplantarlas, o plantar a mano a partir de paquetes individuales de semillas.

Ejemplo 3

Este ejemplo demuestra el uso de los procedimientos de cribado de la presente invención en un programa para alelos parentales recurrentes en un programa de cría por retrocruzamiento.

Los procedimientos de cribado de la presente invención se pueden usar para la selección de transgenes así como la identificación de alelos parentales recurrentes. La identificación de genotipos con frecuencias de alelos parentales recurrentes deseadas antes de la plantación permite que el número de filas por población se reduzca a lo largo de todo el programa de cultivo junto con un aumento en el número de poblaciones incluidas en el programa de conversión dentro de una unidad de campo dada. Estos dan como resultado un uso mejorado de la tierra, costes de manos de obra y de la tierra reducidos, etc.

Un ejemplo de cribado de tejido de endospermo a partir de maíz para alelos parentales recurrente en un programa de cultivo por retrocruzamiento se muestra en la **figura 29**.

Ejemplo 4

Este ejemplo demuestra el uso de procedimientos de cribado de la presente invención para el uso en la determinación de la base de vinculación e impresiones digitales de líneas de ADN.

Combinado con el ADN de célula única, la huella genética de línea se puede llevar a cabo si la necesidad de muestrear la línea en el campo.

Usando tejido de endospermo de semillas (revestimiento de semilla en soja) derivado de una planta diploide, los halotipos de marcador parental se puede determinar usando un sistema de genotipificación que permite la detección de diferentes frecuencias de alelos en muestras de ADN. Puesto que el tejido de endospermo es triploide, con dos copias derivadas del gameto femenino, la fase de vinculación de la línea parental se puede derivar diseccionando genotipos de progenie heterocigótica. La muestra de ADN de tejido de endospermo permite una determinación del nivel de ploidia del marcador genético. Un nivel de ploidia diploide en el marcador genético indica la herencia materna y un nivel de ploidia haploide en el marcador genético indica la herencia paterna.

REIVINDICACIONES

1.- Un procedimiento automatizado para analizar semillas en una población de semillas que tienen diferencias genéticas, comprendiendo el procedimiento:

- 5 aislar semillas individuales de la población de semillas;
 colocar las semillas individuales aisladas en un portasemillas;
 cortar muestras de tejido que comprendan células con ADN de las semillas individuales asiladas y
 colocadas en el portasemillas usando un muestreador de semillas automatizado mientras se mantiene la
 viabilidad de germinación de las semillas;
10 cribar el ADN extraído de la muestra para la presencia o ausencia de un marcador genético;
 seleccionar semillas de la población basándose en los resultados del cribado de ADN;
 y
 cultivar plantas a partir de la semilla seleccionada.

15 2.- El procedimiento según la reivindicación 1 en el cual el procedimiento comprende, además, determinar el carácter genotípico de la descendencia de la semilla antes de seleccionar las semillas de la población.

3.- El procedimiento según la reivindicación 1 en el cual las plantas fértiles cultivadas a partir de la semilla seleccionada se usan bien como parental femenino o masculino en un cruce con otra planta.

4.- El procedimiento según la reivindicación 1 en el cual la muestra de tejido comprende tejido de endospermo y el procedimiento comprende, además, determinar el nivel de ploidía del marcador genético.

20 5.- El procedimiento según la reivindicación 2, en el cual el nivel de ploidía diploide en el marcador genético indica la herencia materna y un nivel de ploidía haploide en el marcador genético indica la herencia paterna.

6.- El procedimiento según la reivindicación 1, en el cual el marcador genético se encuentra en el parental materno de la semilla.

25 7.- El procedimiento según la reivindicación 1, en el cual el marcador genético se encuentra en el parental paterno de la semilla.

8.- El procedimiento según la reivindicación 1, en el cual el procedimiento comprende seleccionar la semilla basándose en la presencia de un marcador genético que está genéticamente vinculado a un QTL seleccionado a partir del grupo constituido por rendimiento, resistencia al acostado, altura, madurez, resistencia a enfermedades, resistencia a plagas, resistencia a deficiencia de nutrientes y composición del grano.

30 9.- El procedimiento según la reivindicación 1, en el cual el procedimiento comprende seleccionar la semilla basándose en la presencia de un marcador genético que está genéticamente vinculado a un halotipo asociado a un QTL seleccionado a partir del grupo constituido por rendimiento, resistencia al acostado, altura, madurez, resistencia a enfermedades, resistencia a plagas, resistencia a deficiencia de nutrientes y composición del grano.

35 10.- El procedimiento según la reivindicación 1, en el cual el procedimiento comprende seleccionar la semilla basándose en la presencia de un marcador genético que está vinculado genéticamente a un transgen.

11.- El procedimiento según la reivindicación 1 en el cual las semillas en la población son semillas de soja.

12.- Un procedimiento automatizado para agrupar semillas en una población de semillas que tienen diferencias genéticas, comprendiendo el procedimiento:

- 40 (a) aislar semillas individuales de una población de semillas, colocar las semillas individuales aisladas en un portasemillas, cortar muestras de tejido que comprenden células con ADN de las semillas individuales asiladas y colocadas en el portasemillas usando un muestreador de semillas automatizado;
 (b) cribar el ADN extraído de cada muestra para la presencia o ausencia de al menos un marcador genético;
 (c) seleccionar semillas de la población basándose en los resultados del cribado de ADN;
45 (d) cultivar plantas a partir de la semilla seleccionada;
 (e) recolectar las semillas de las plantas cultivadas y repetir las etapas (a) a (d).

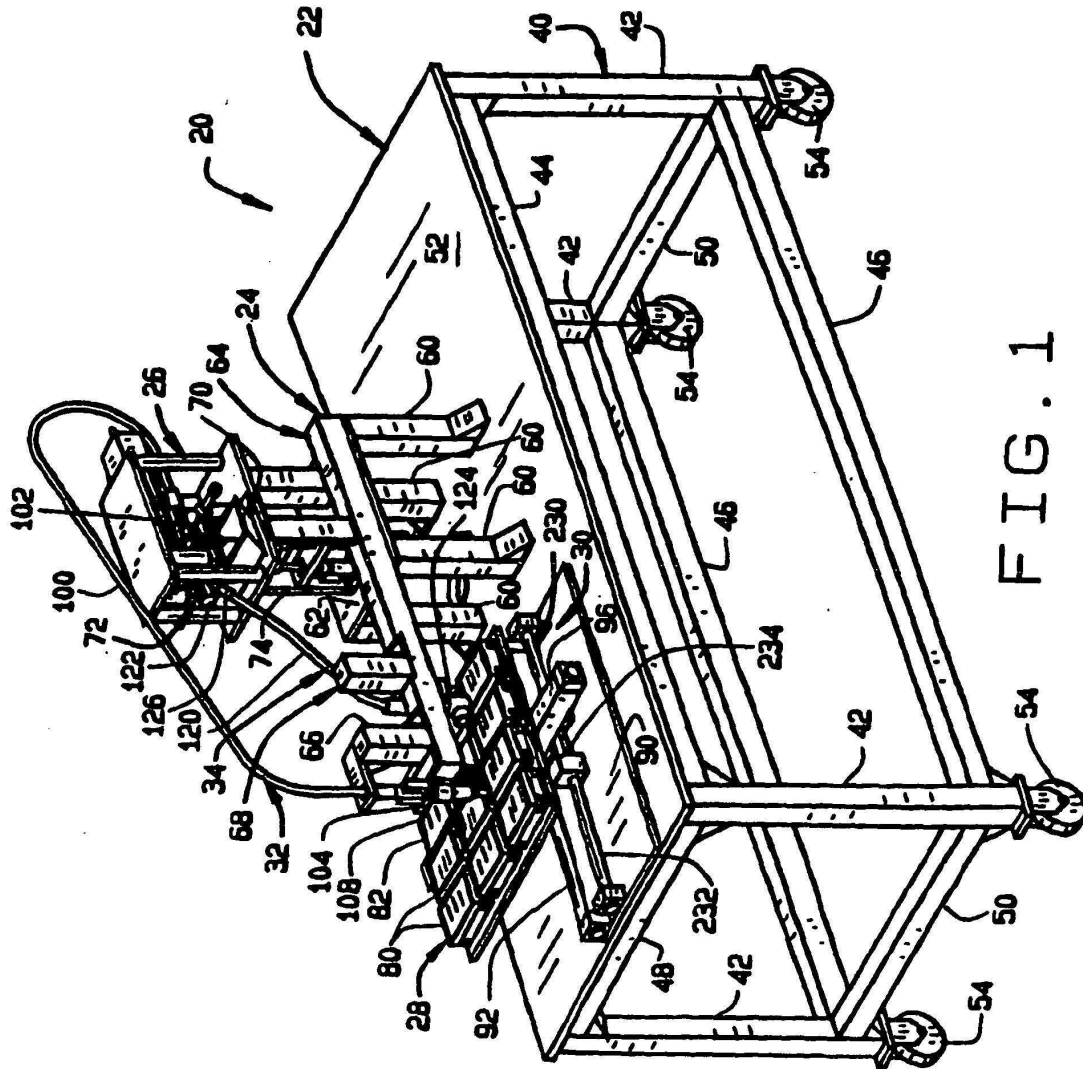


FIG. 1

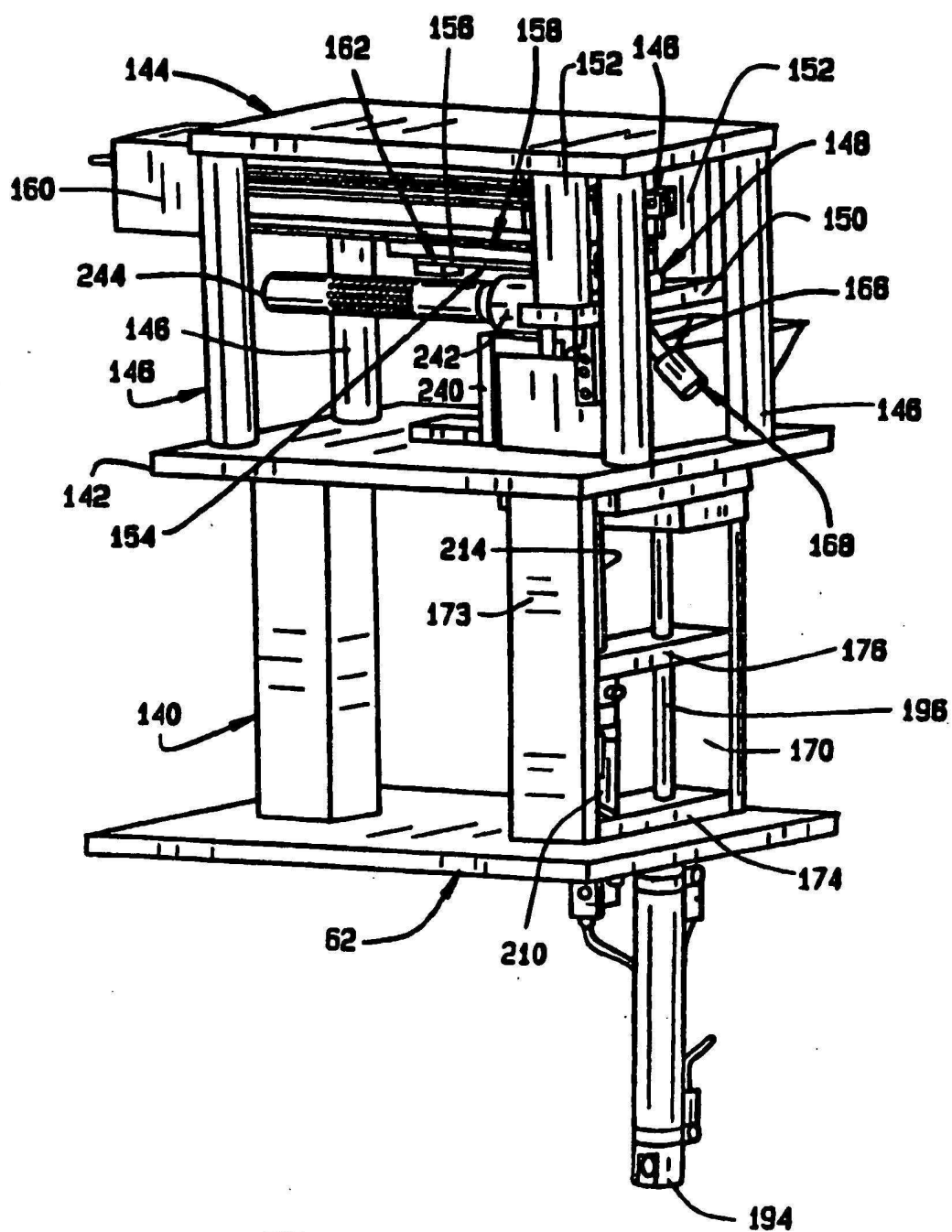


FIG. 2

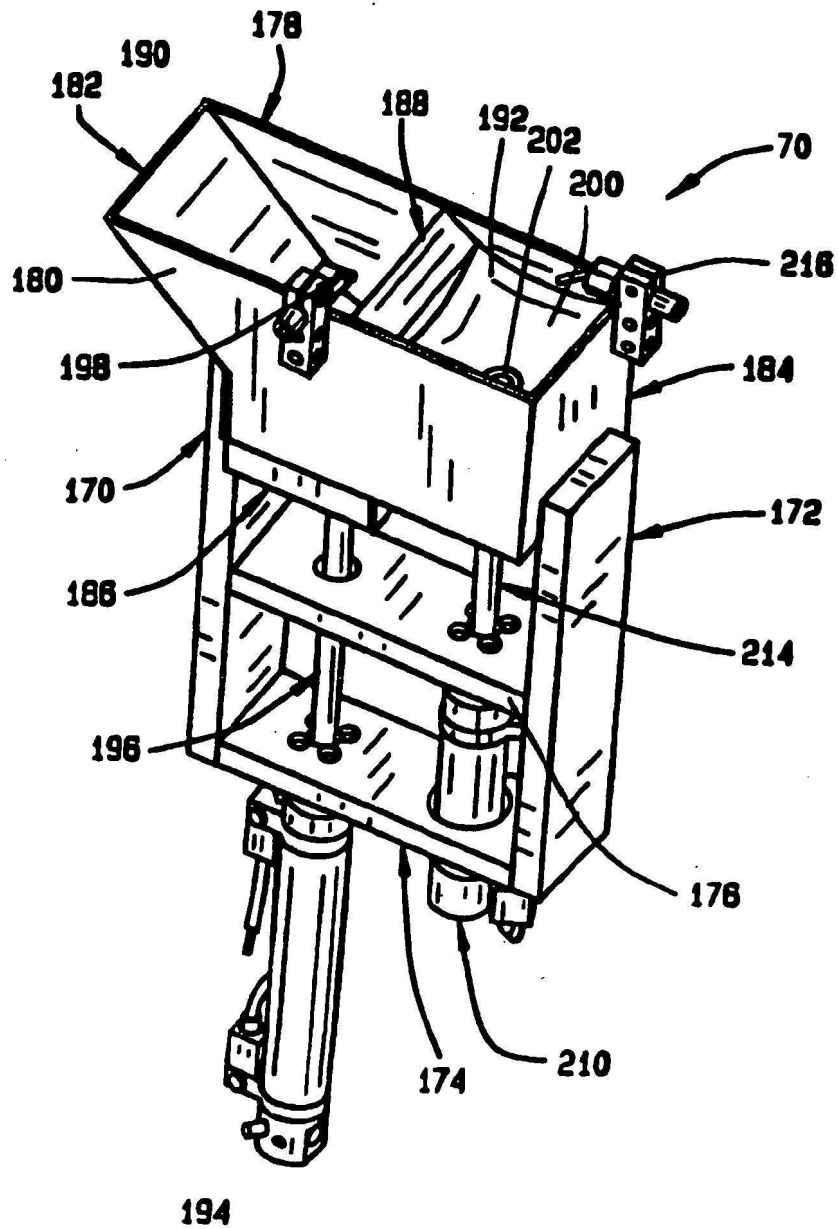


FIG. 3

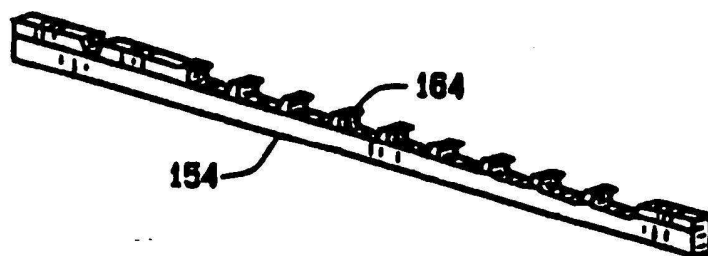


FIG. 4

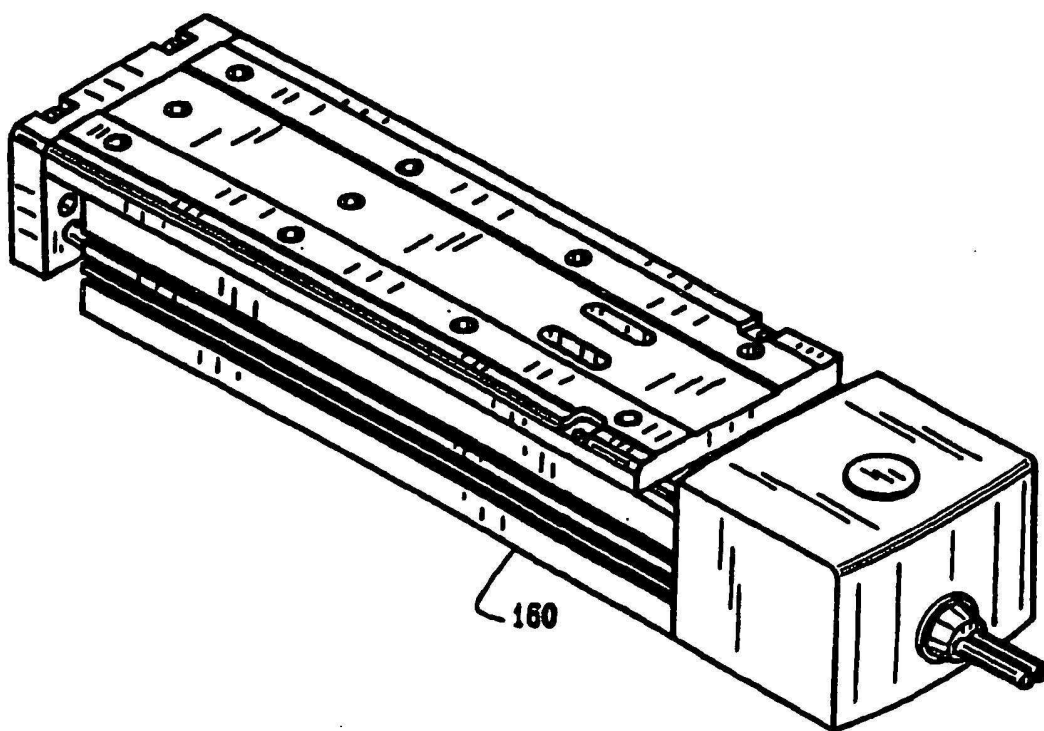


FIG. 5

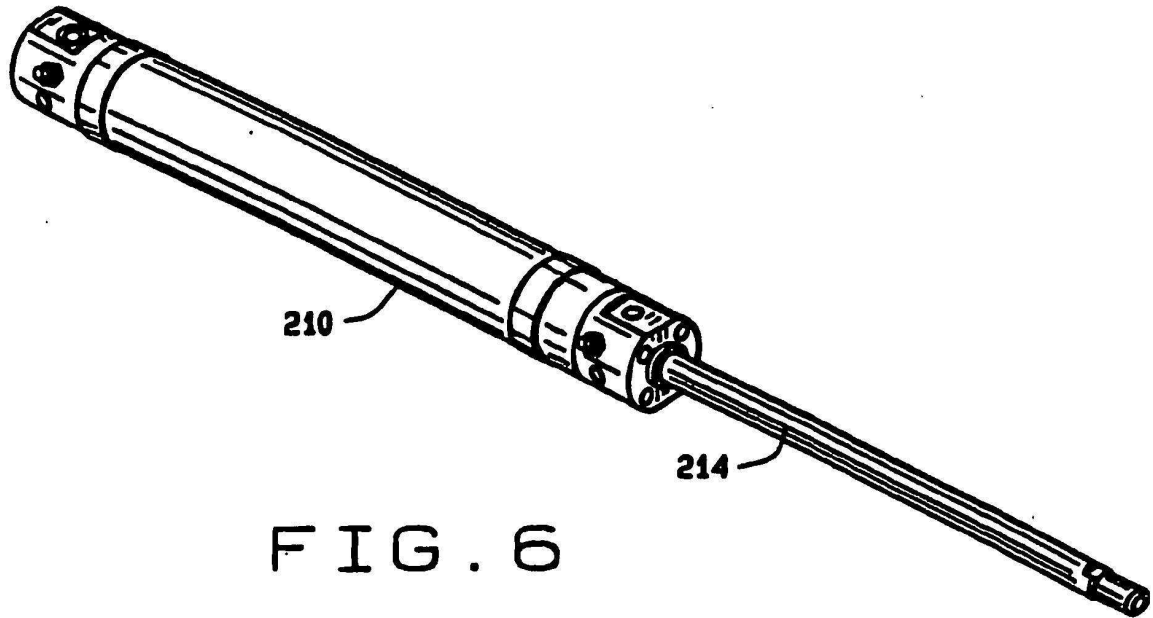


FIG. 6

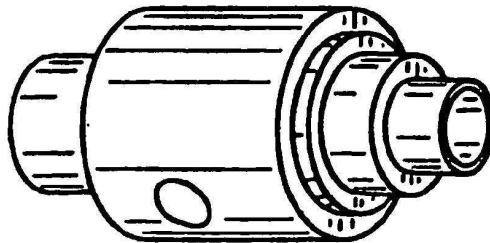


FIG. 12

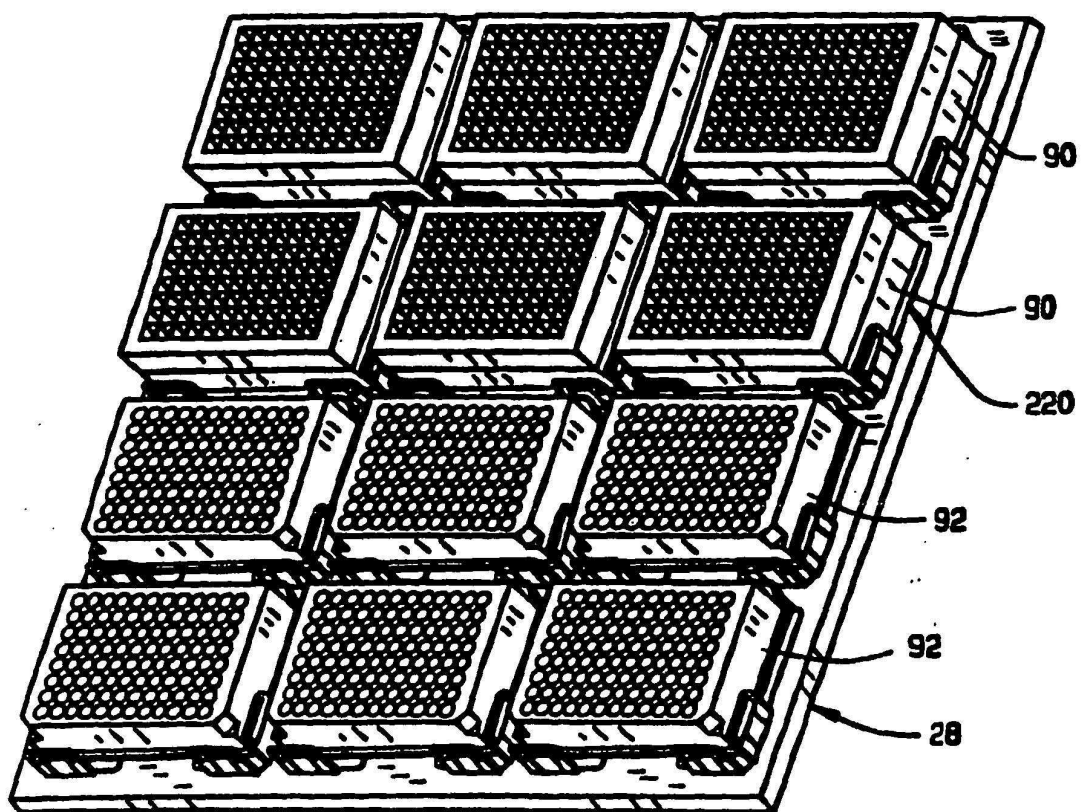


FIG. 7

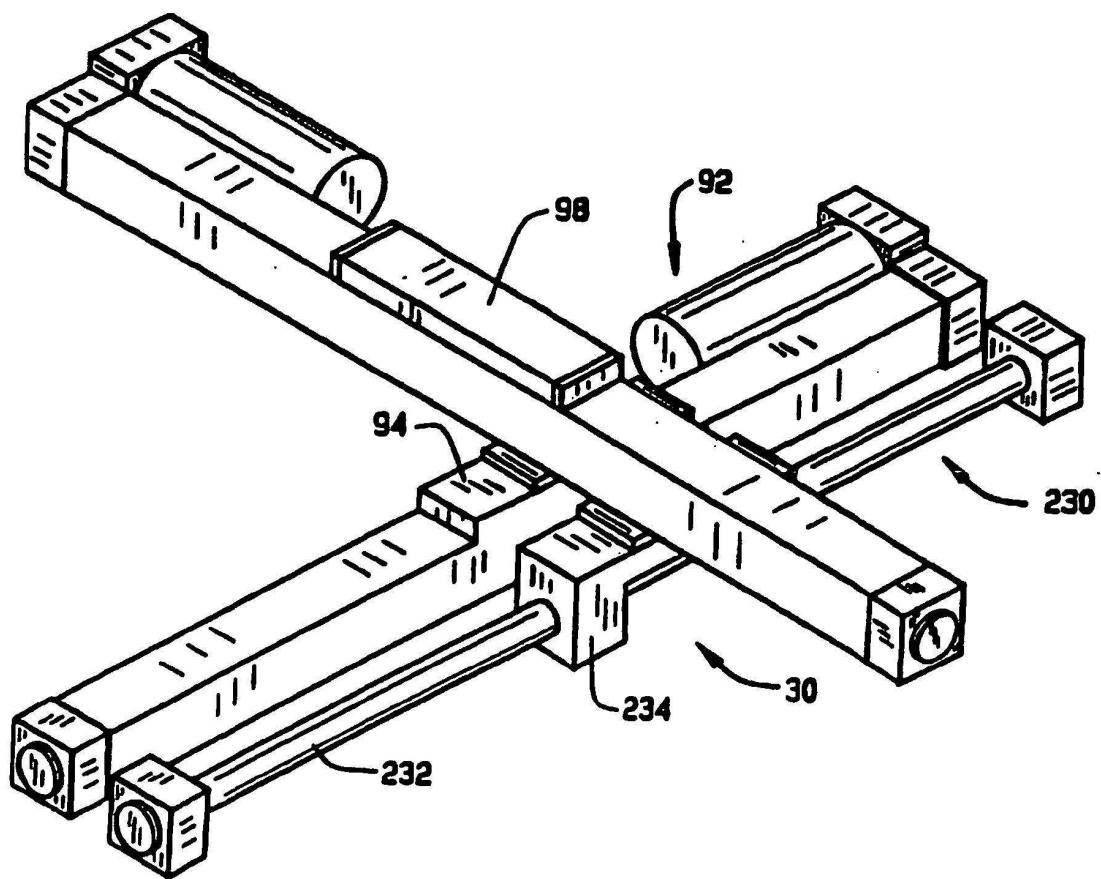


FIG. 8

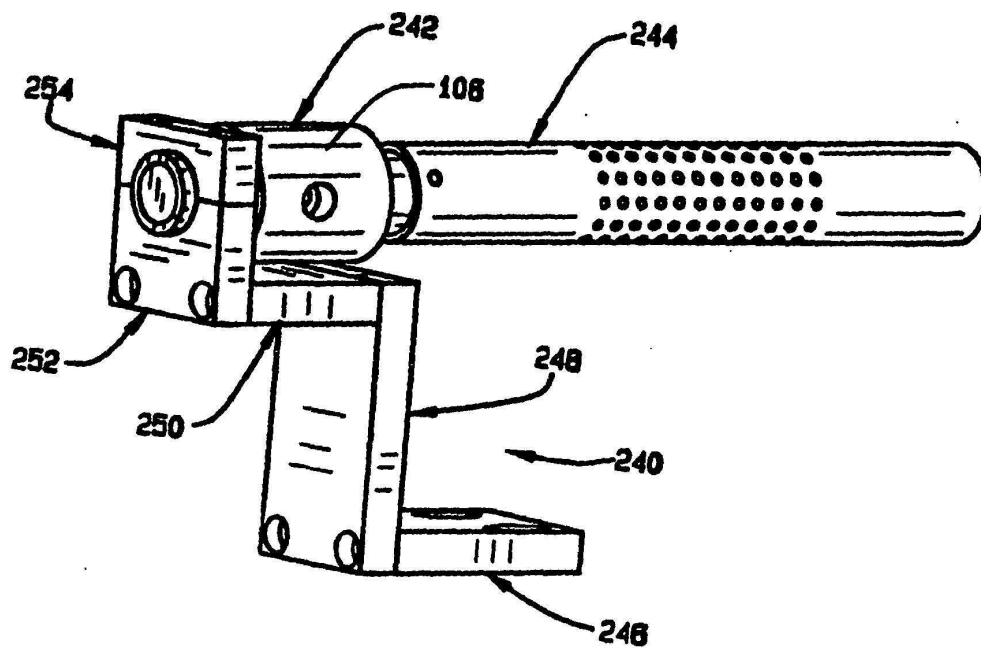


FIG. 9

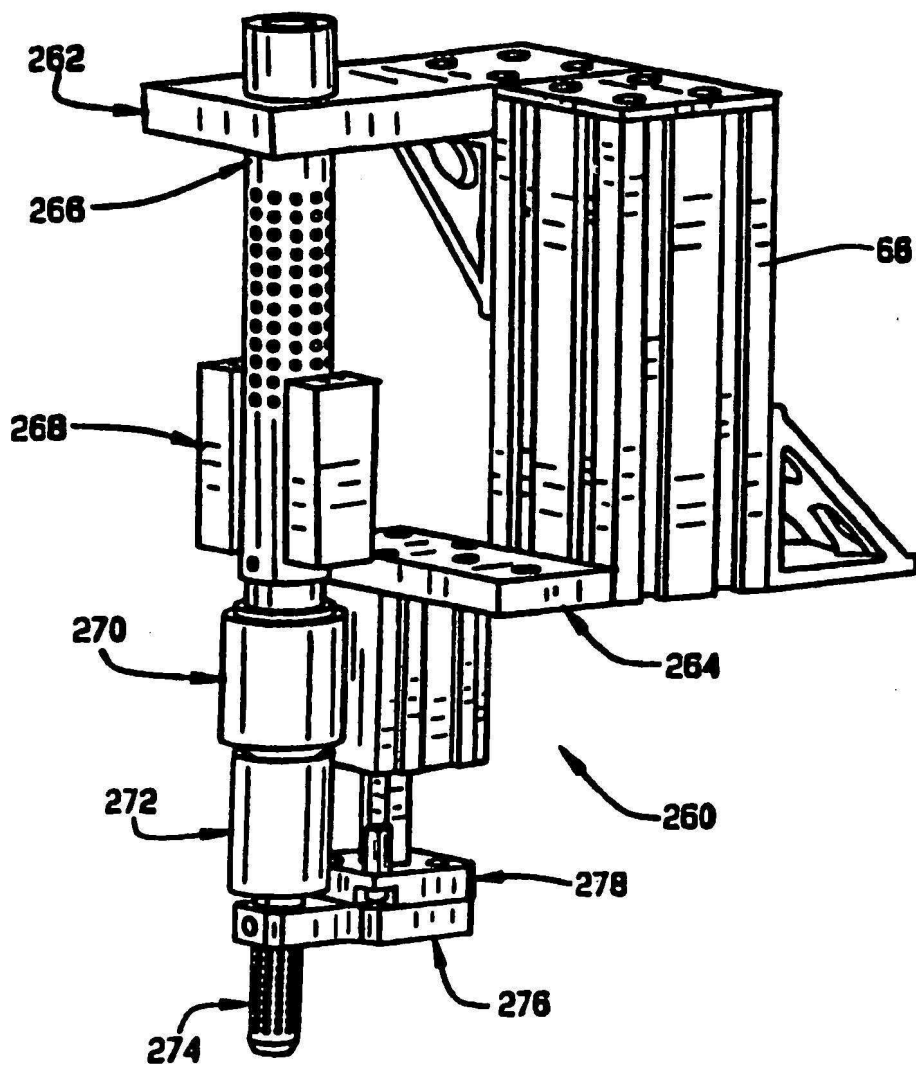


FIG. 10

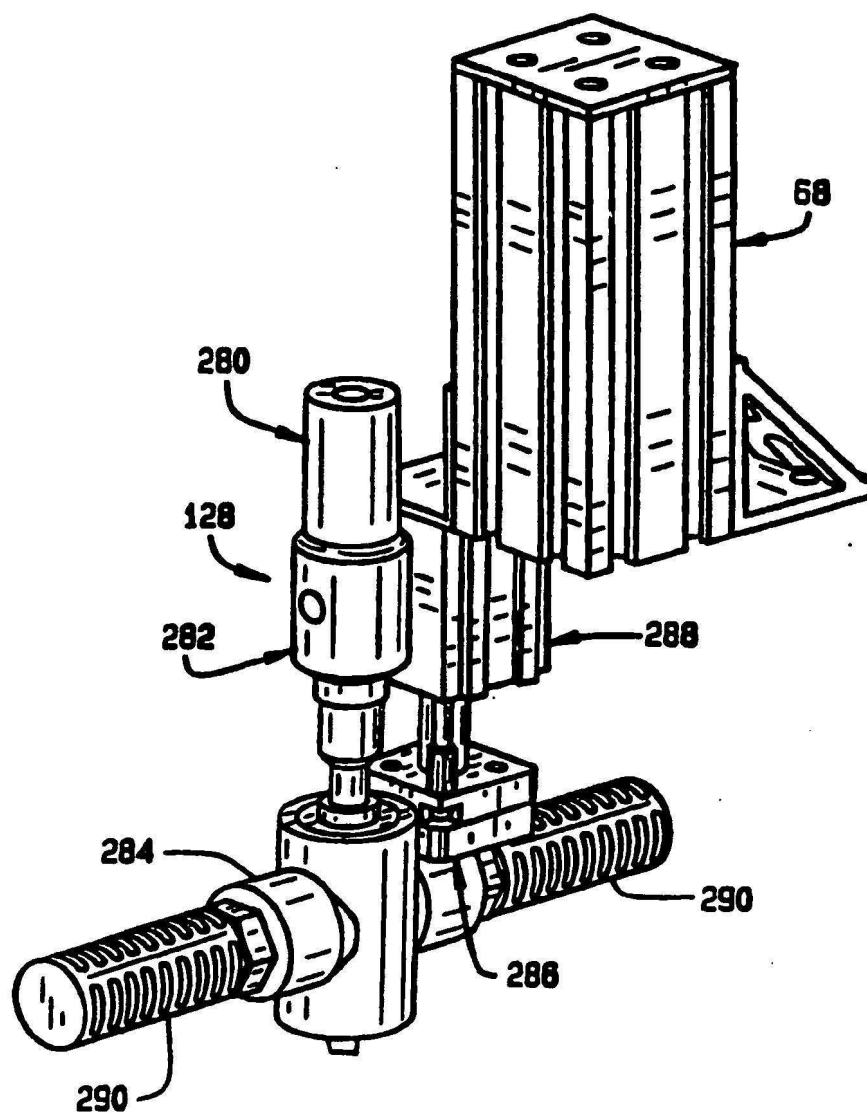
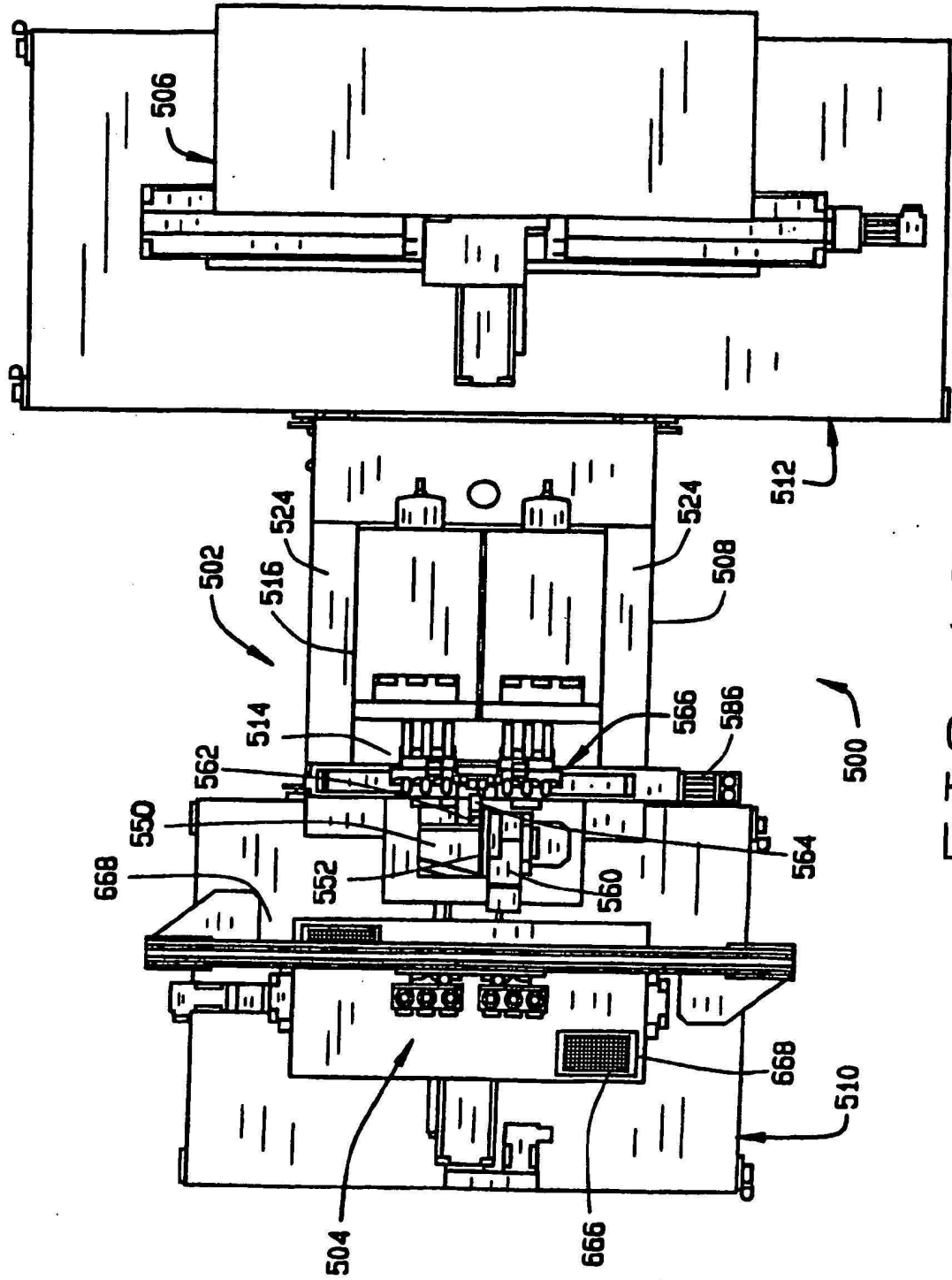
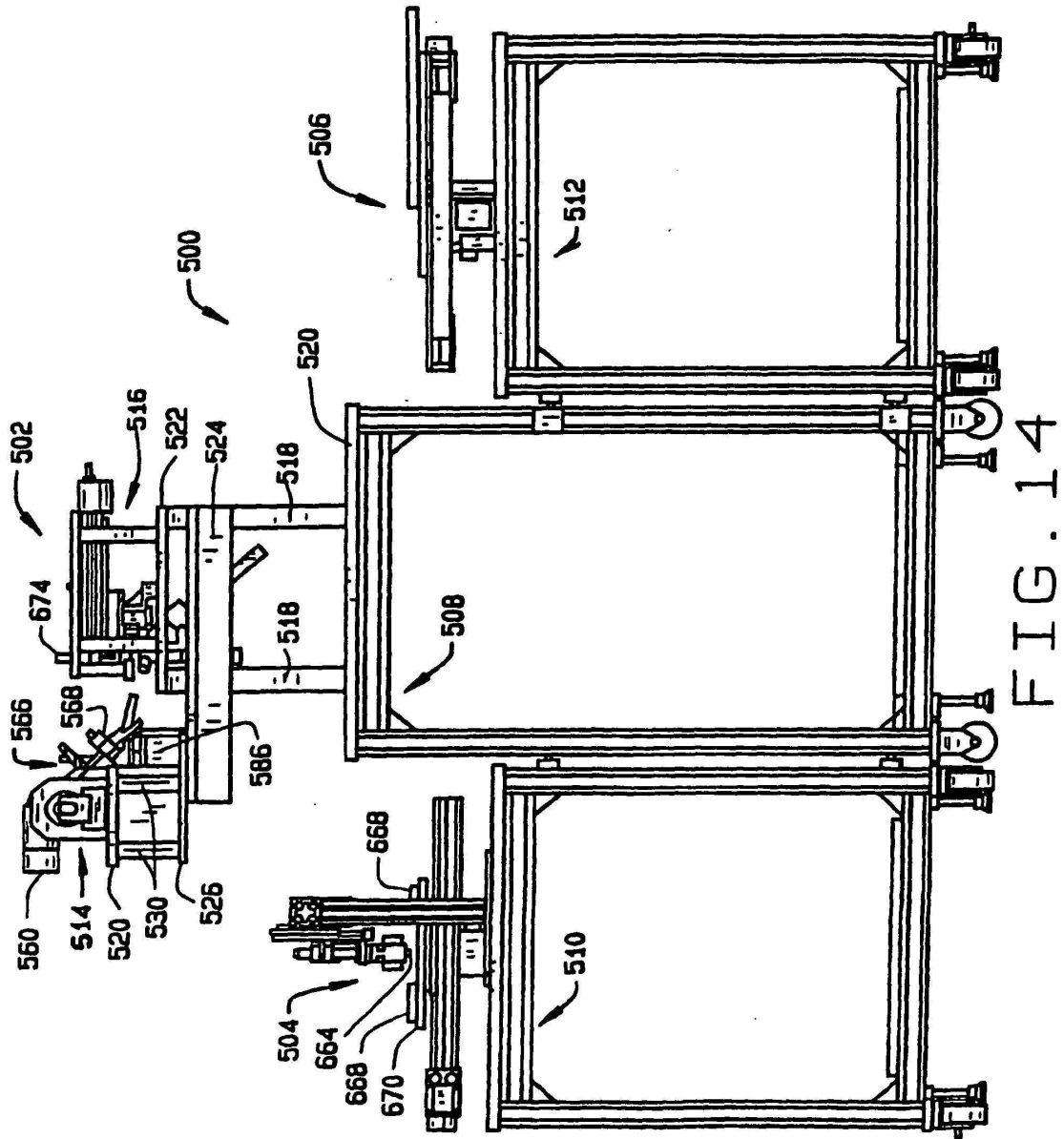


FIG. 11





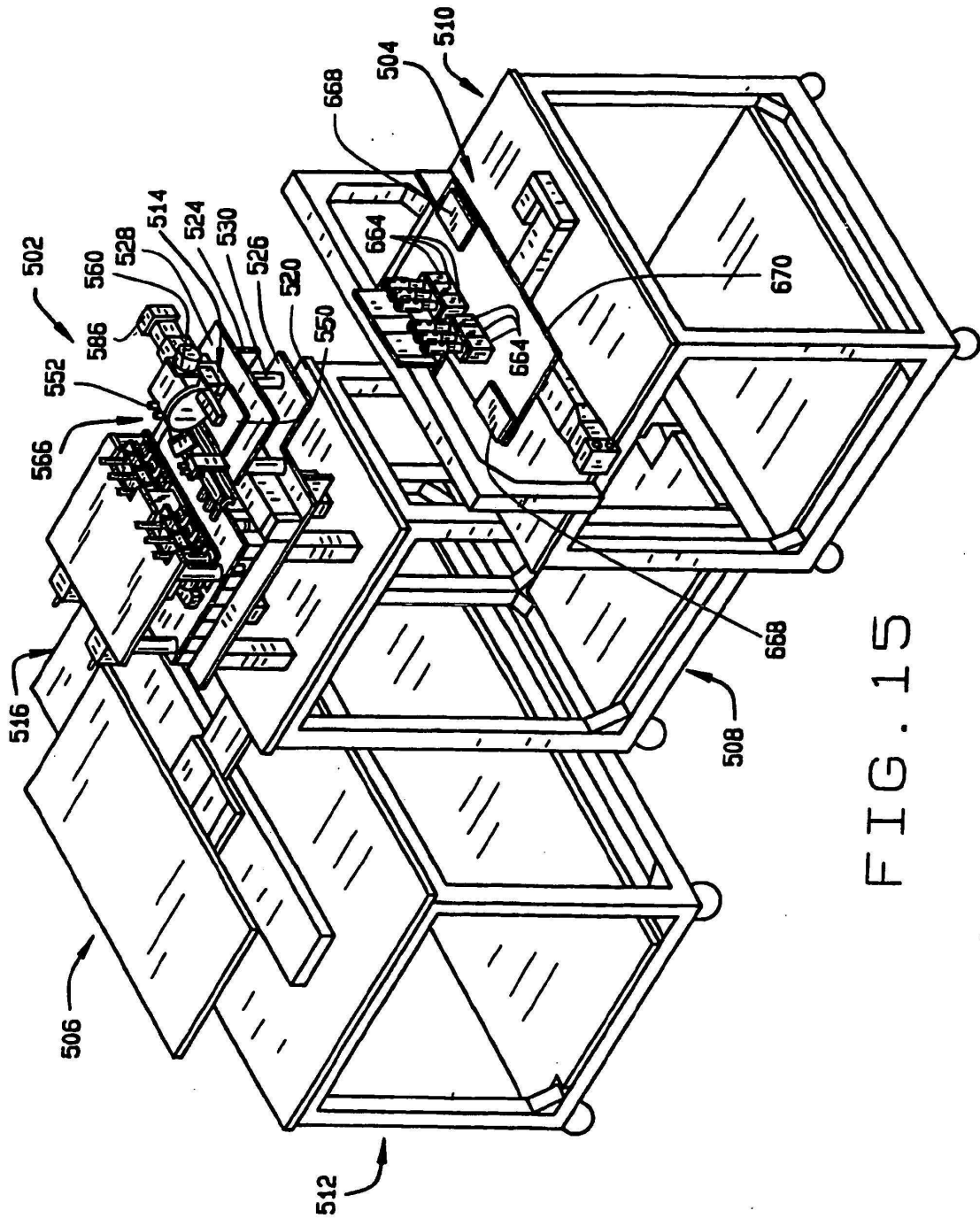


FIG. 15

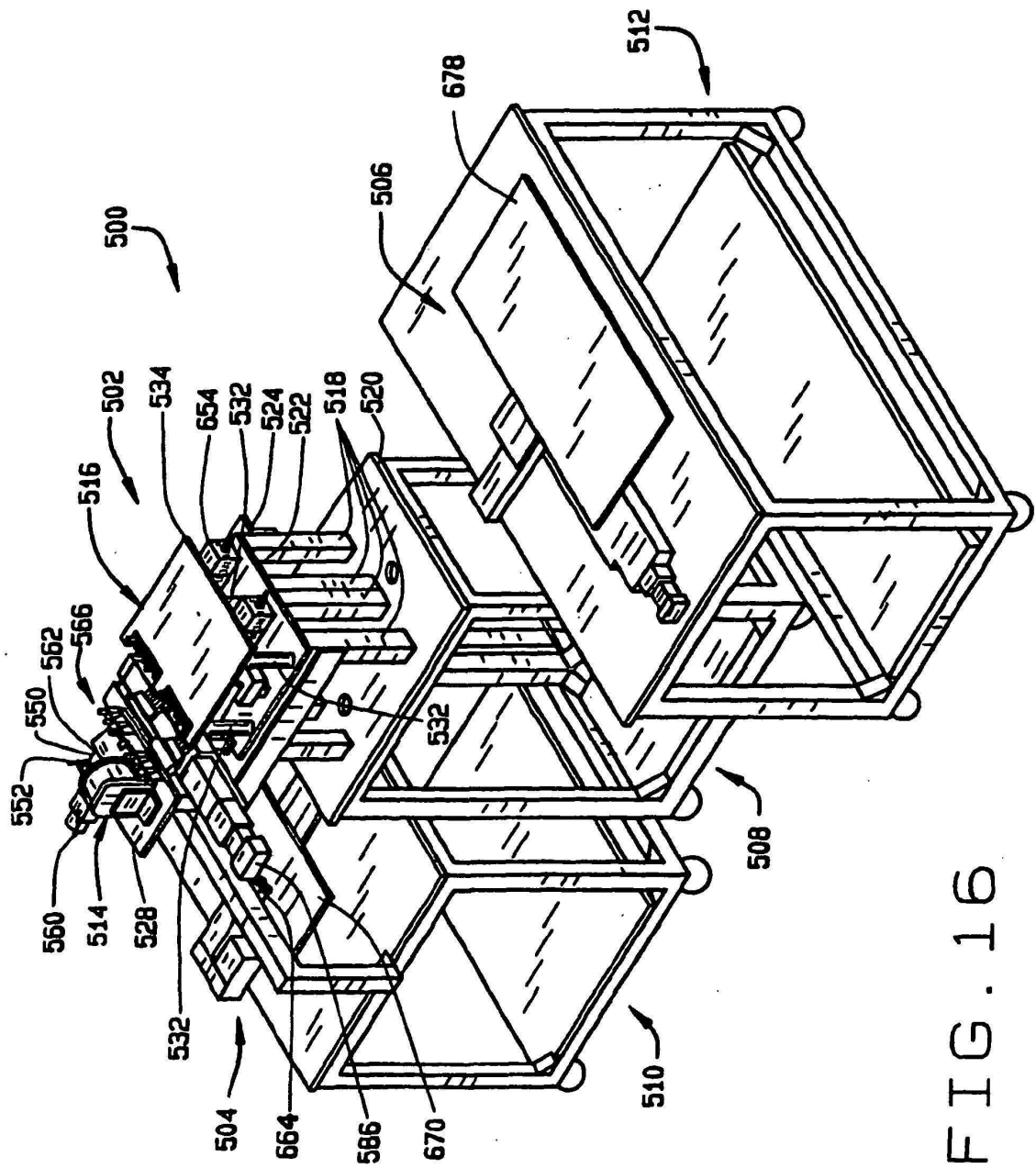


FIG. 16

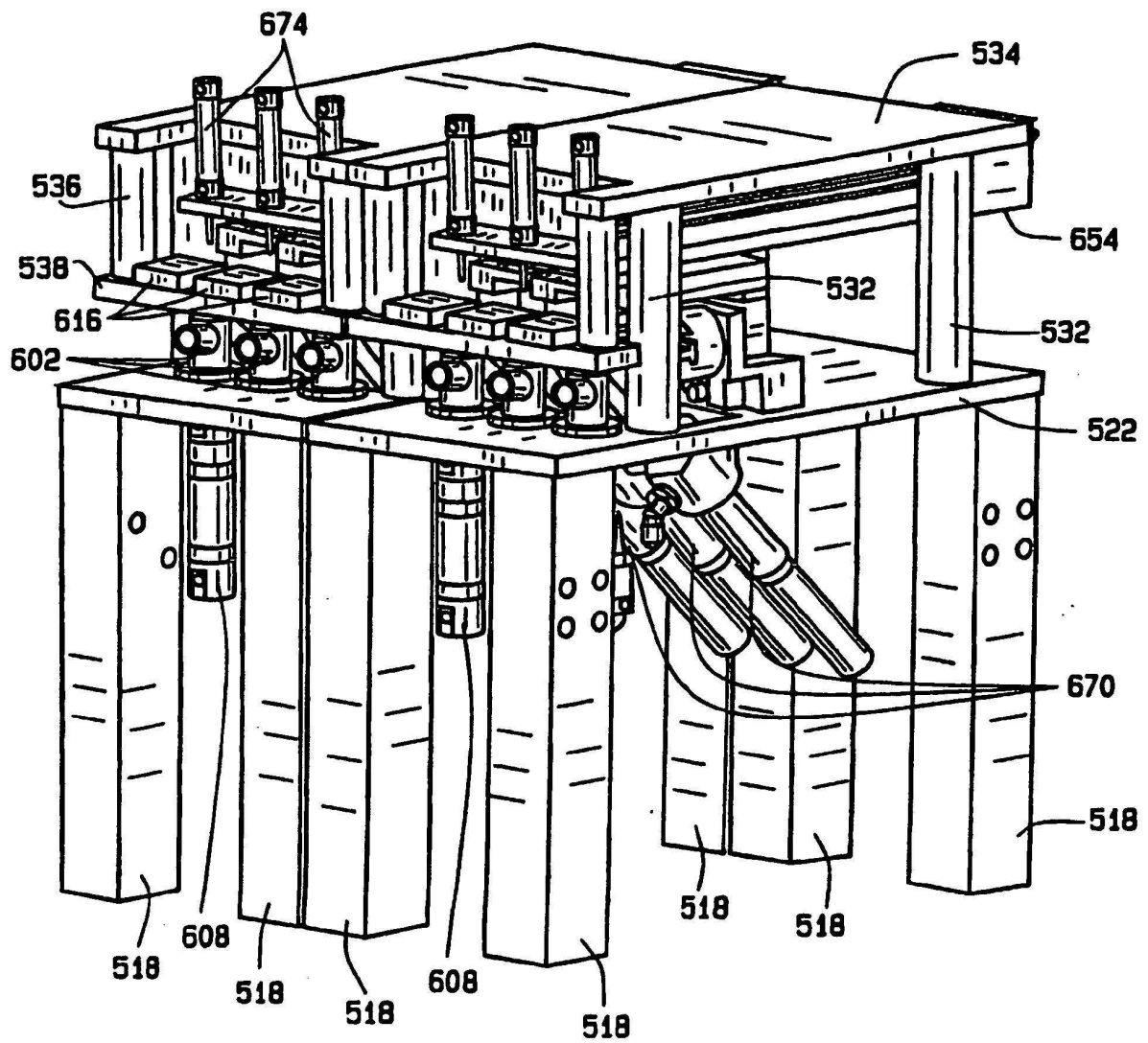


FIG. 17

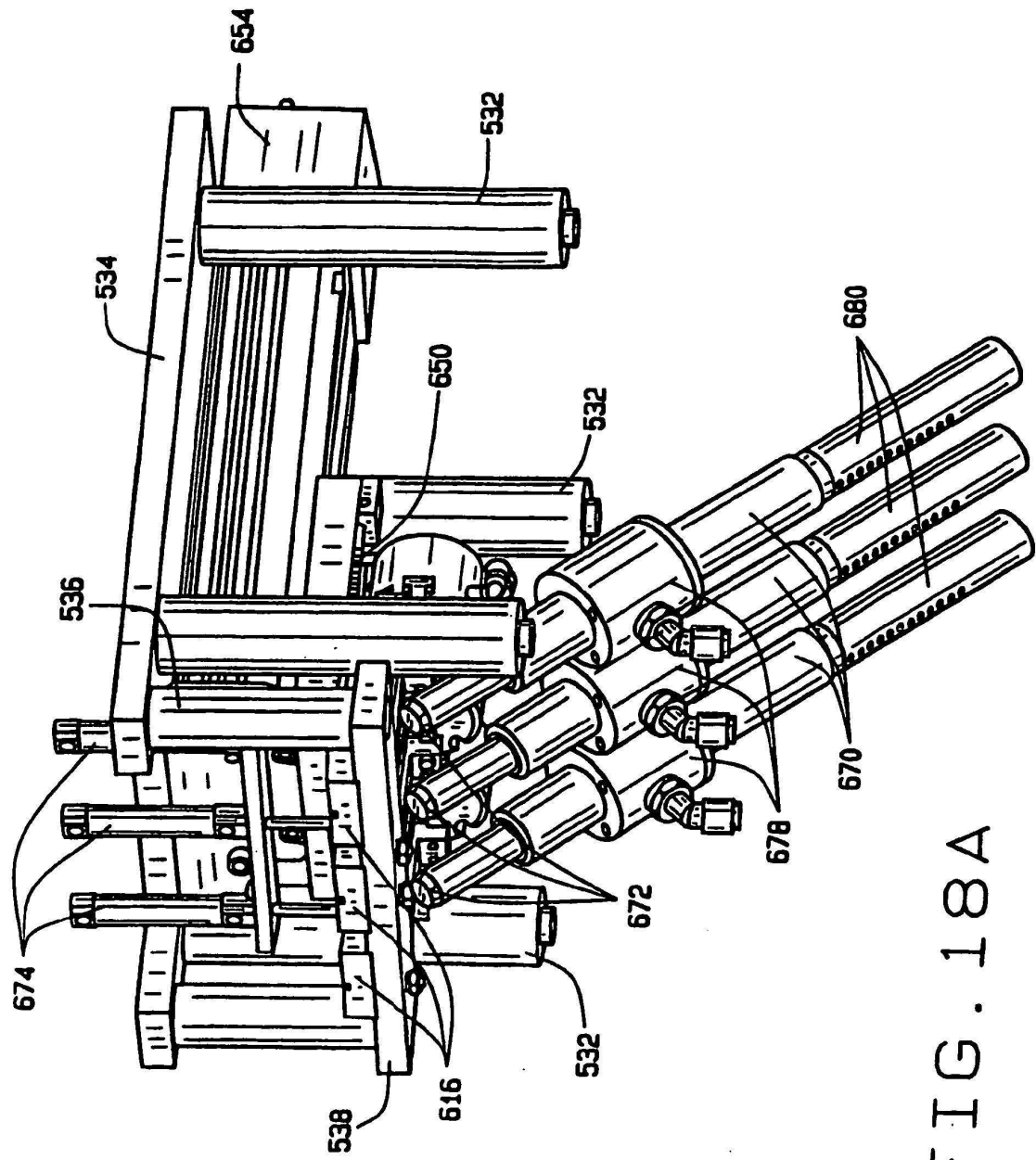


FIG. 18A

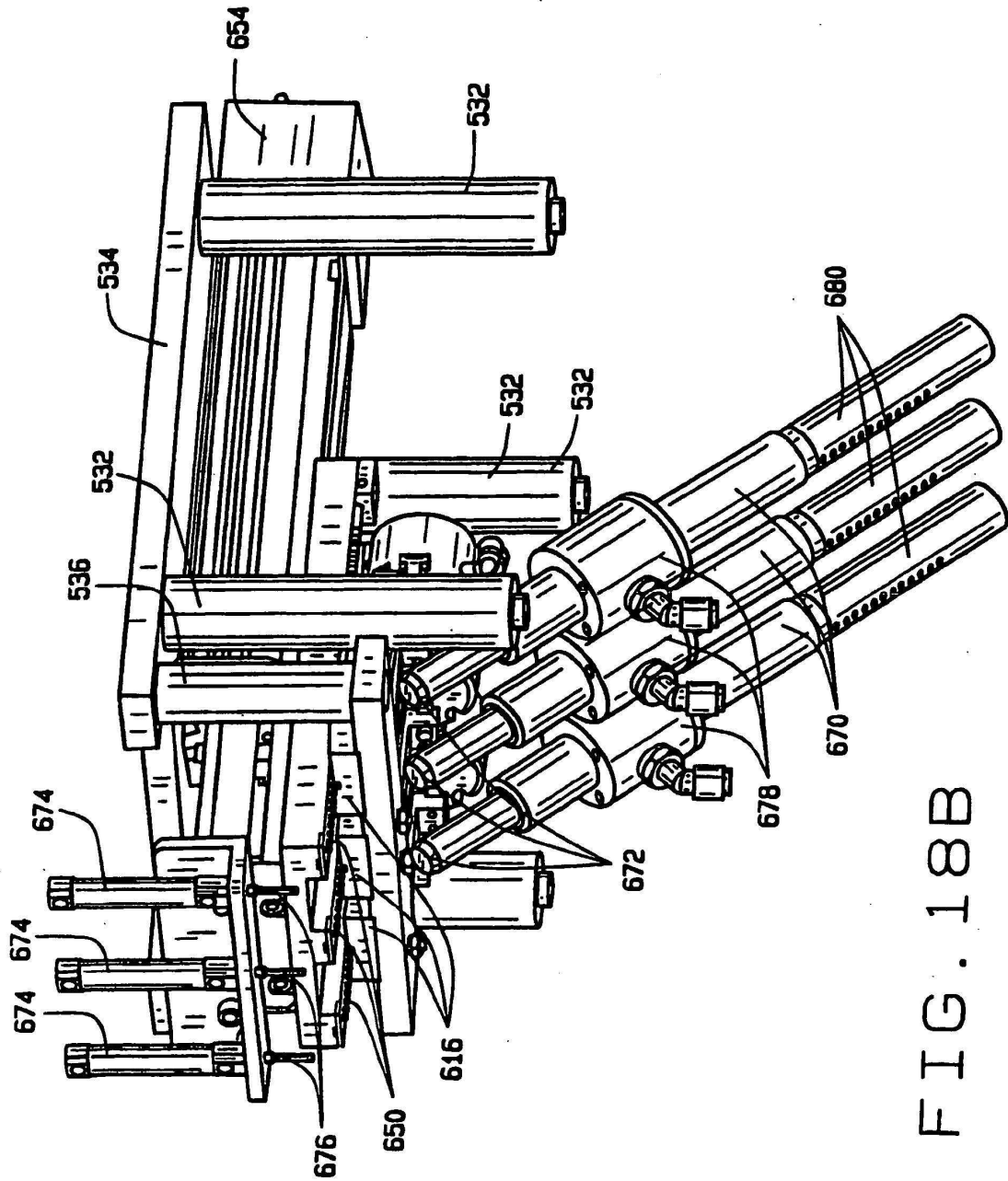


FIG. 18B

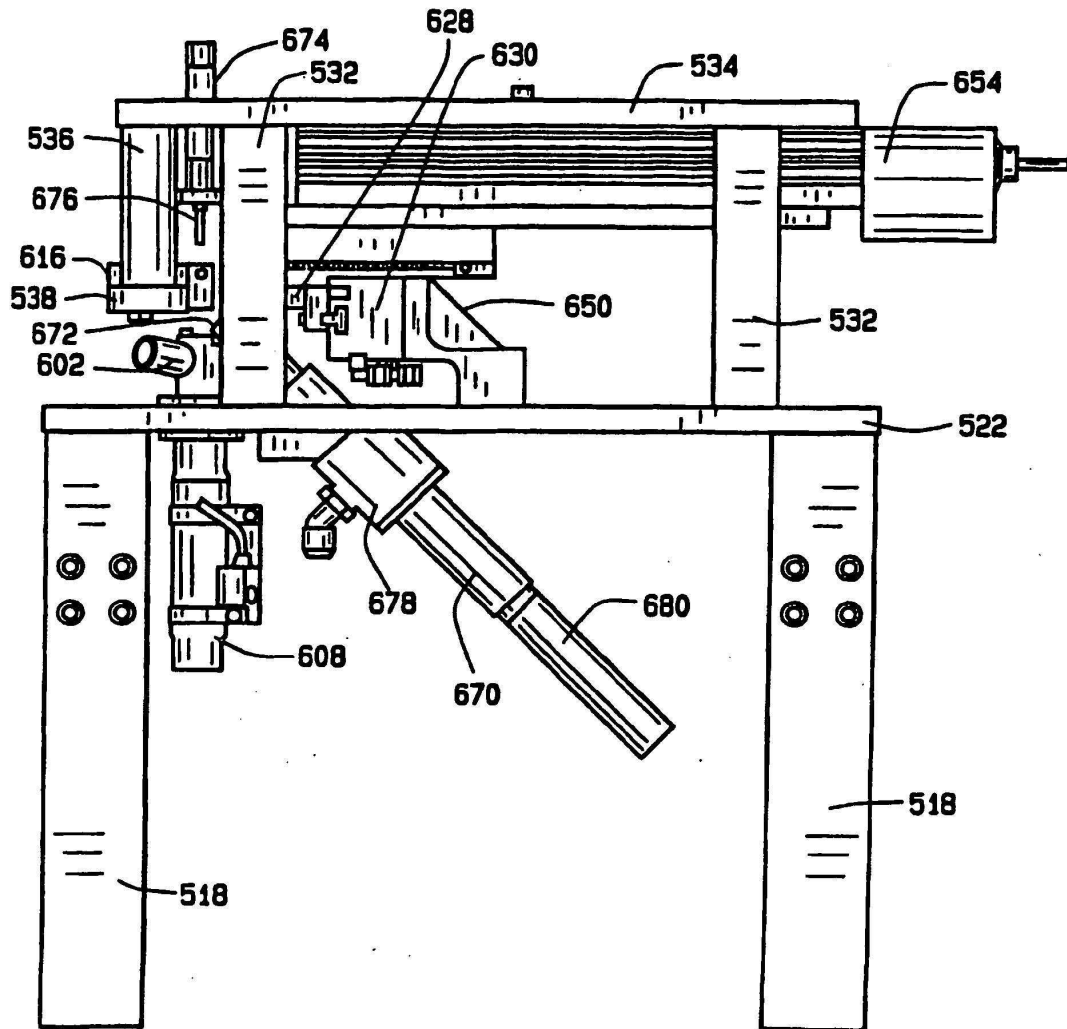


FIG. 19A

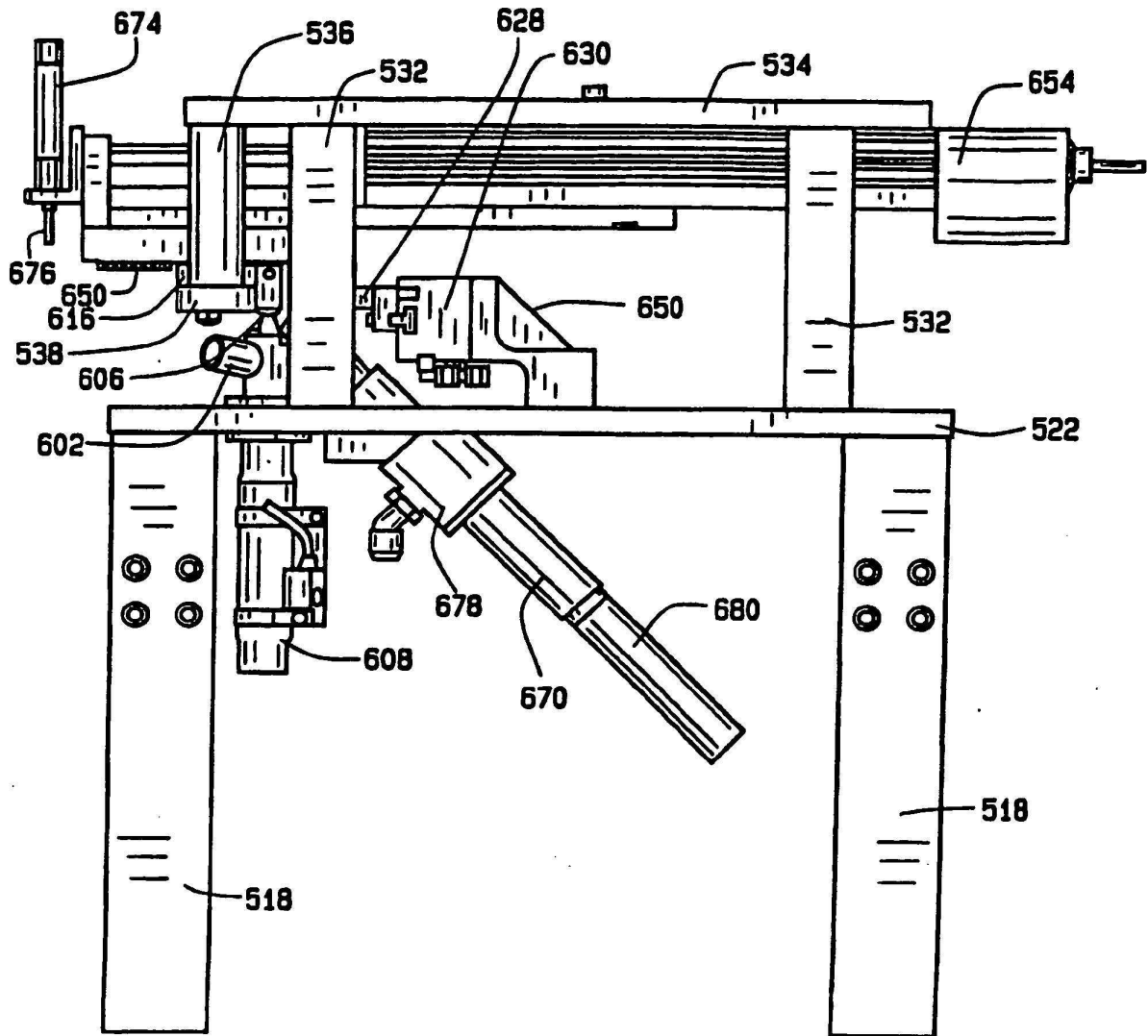
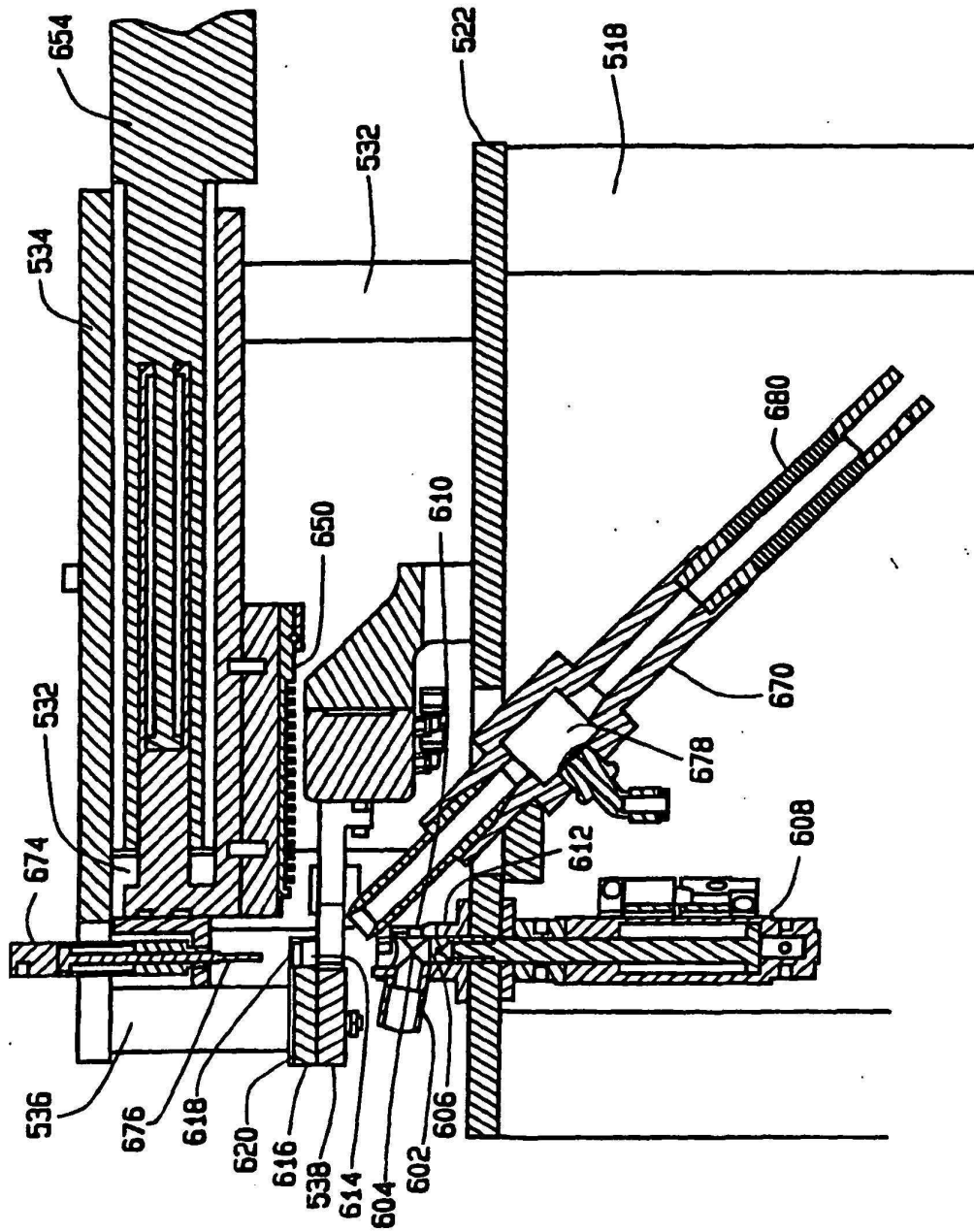


FIG. 19B



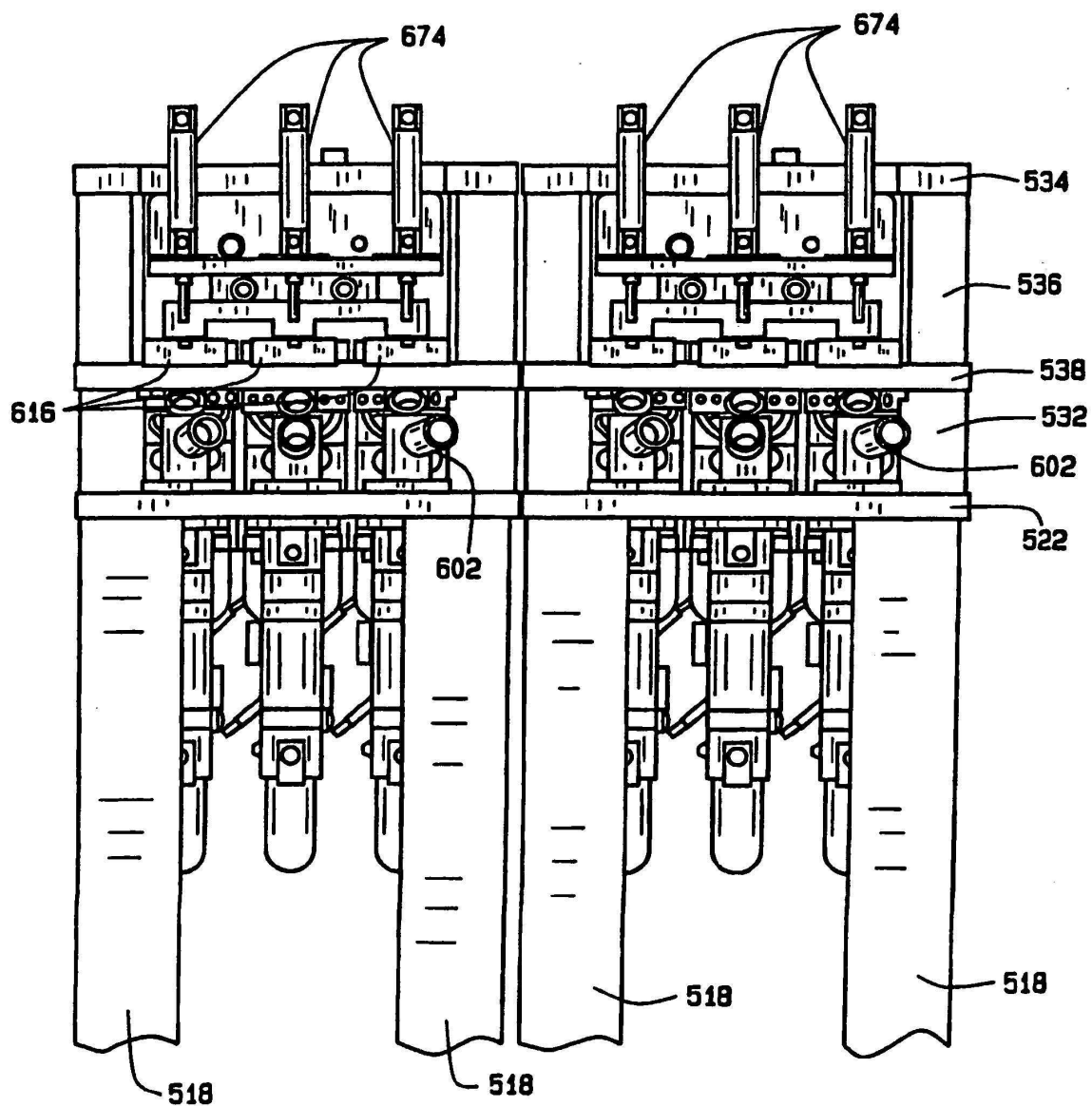


FIG. 21

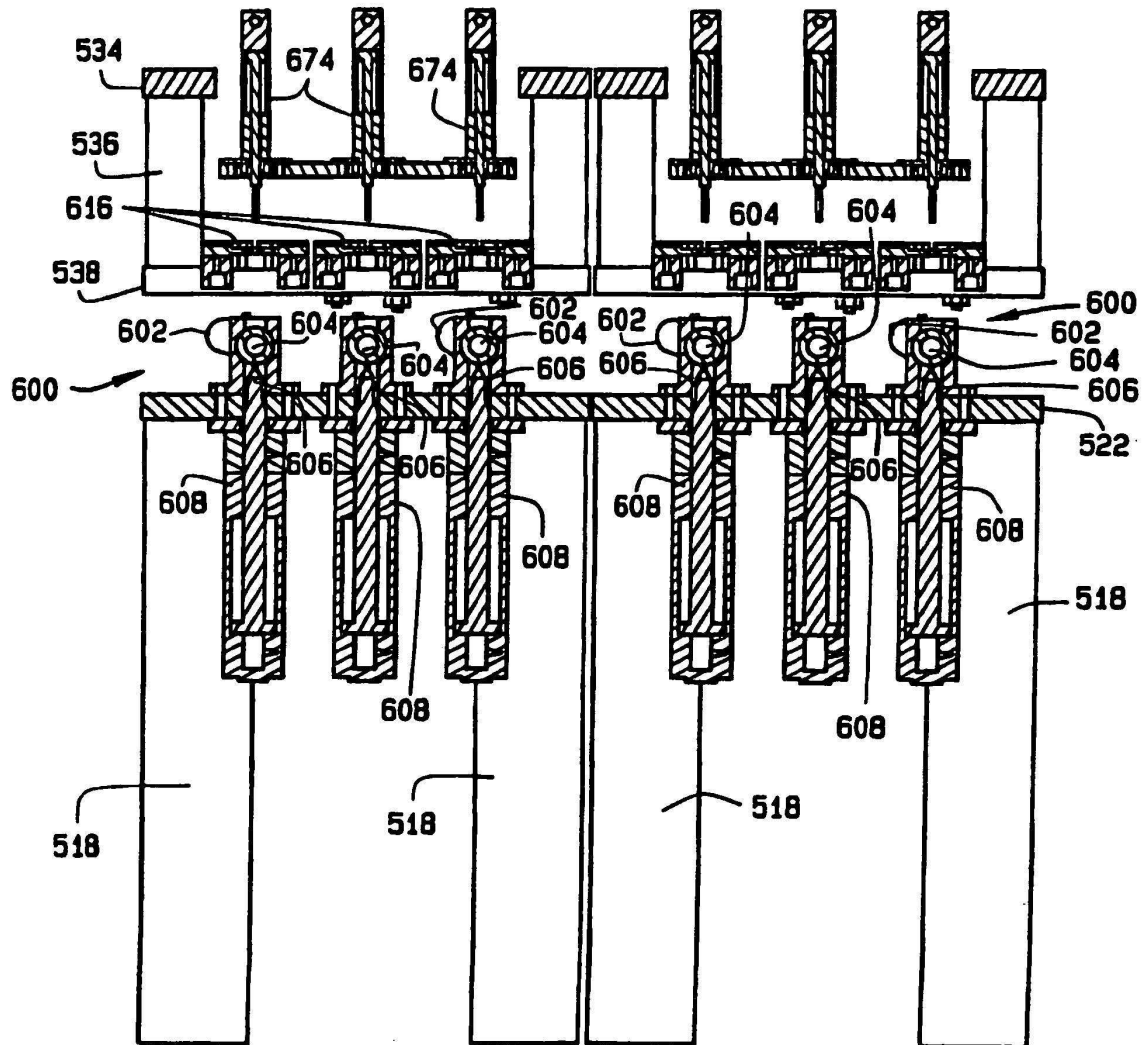


FIG. 22

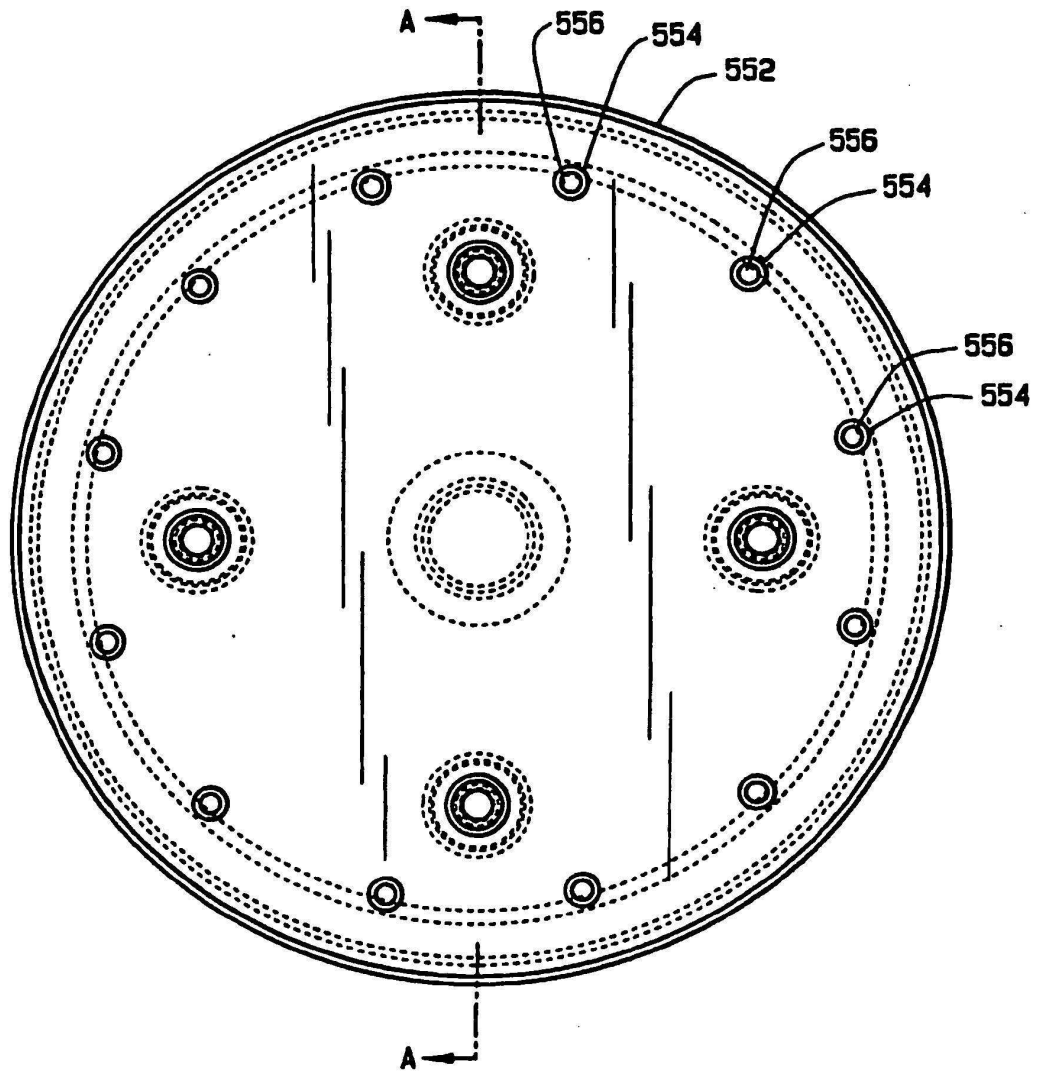


FIG. 23A

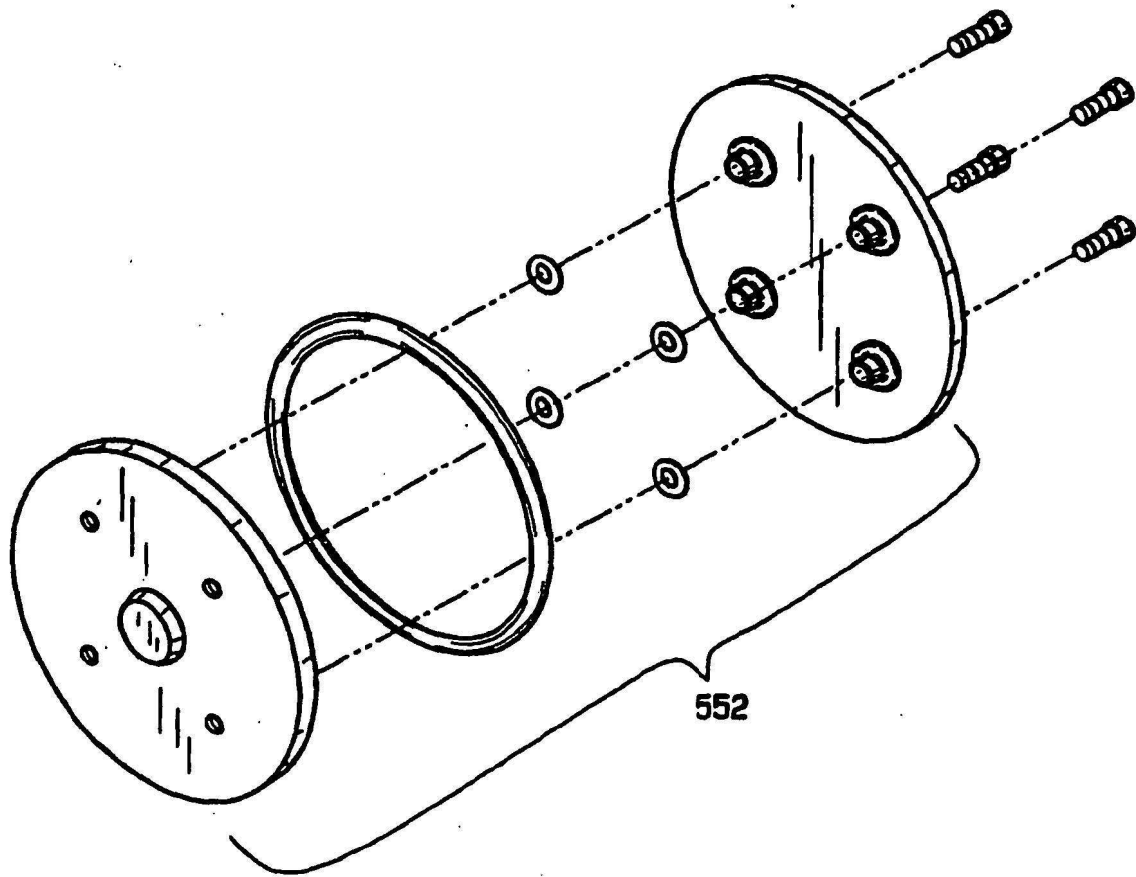


FIG. 23B

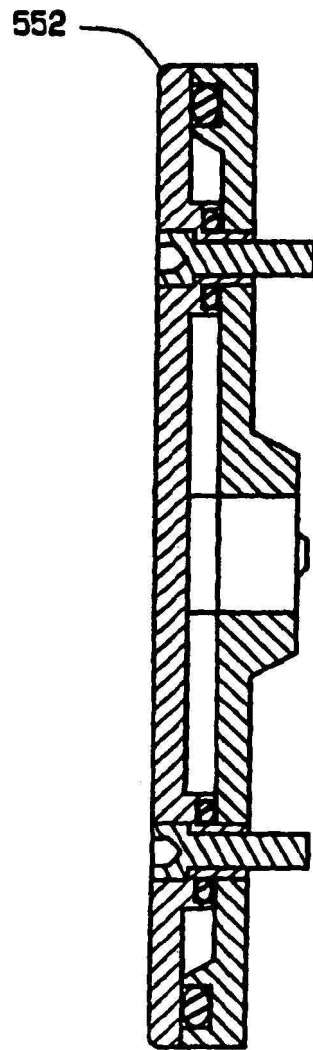


FIG. 23C

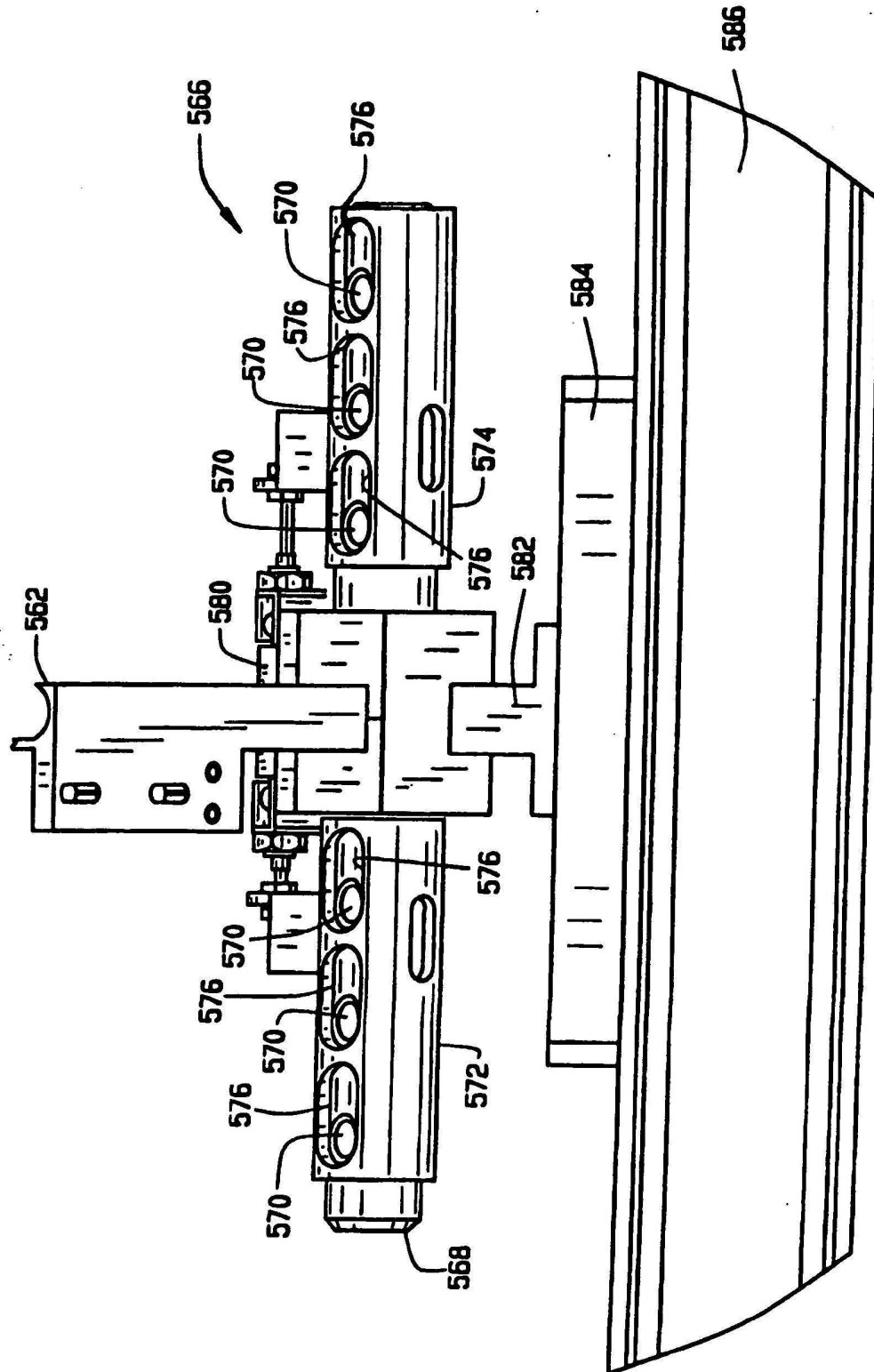


FIG. 24

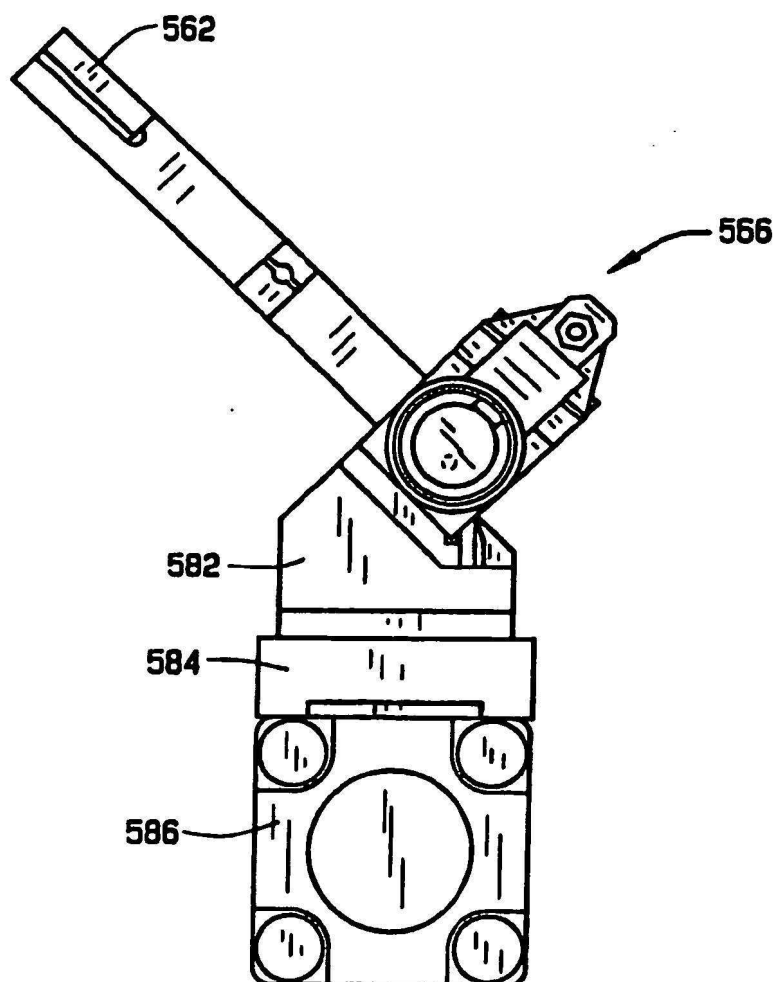
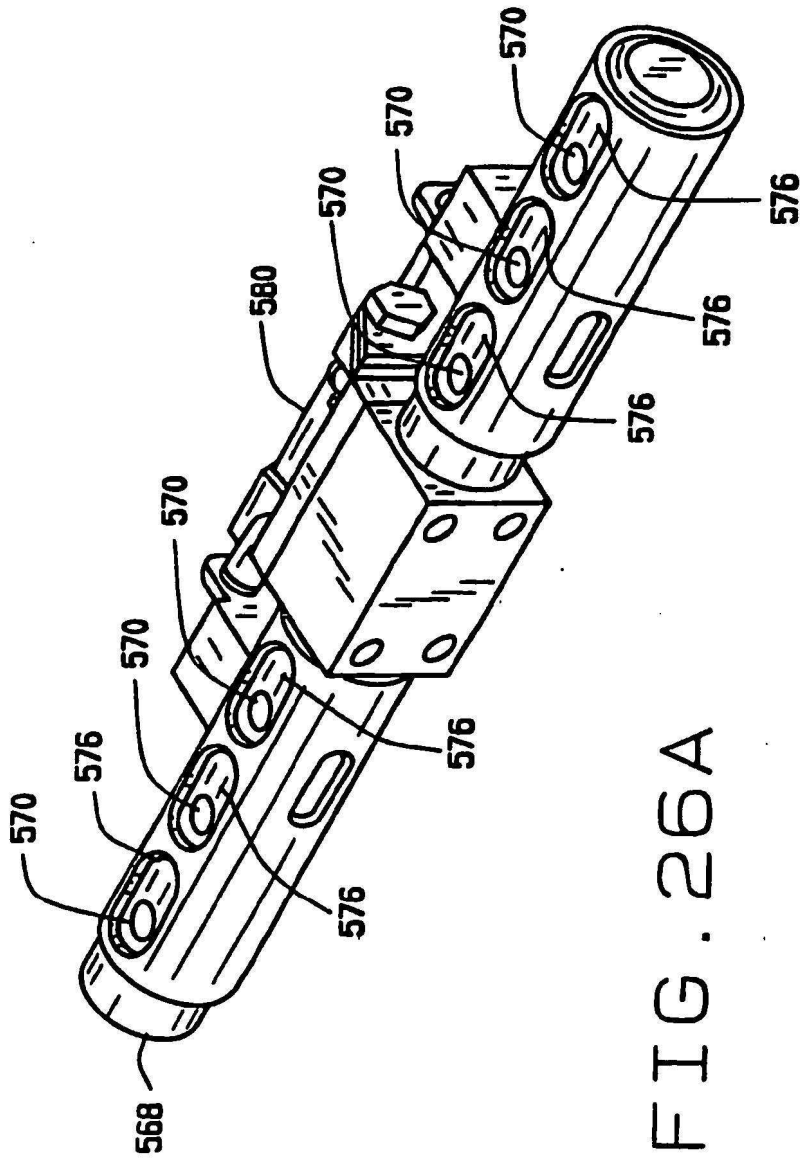


FIG. 25



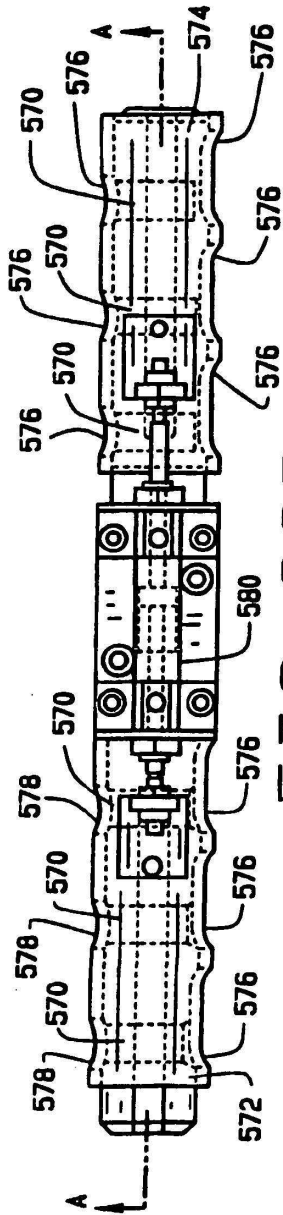


FIG. 26B

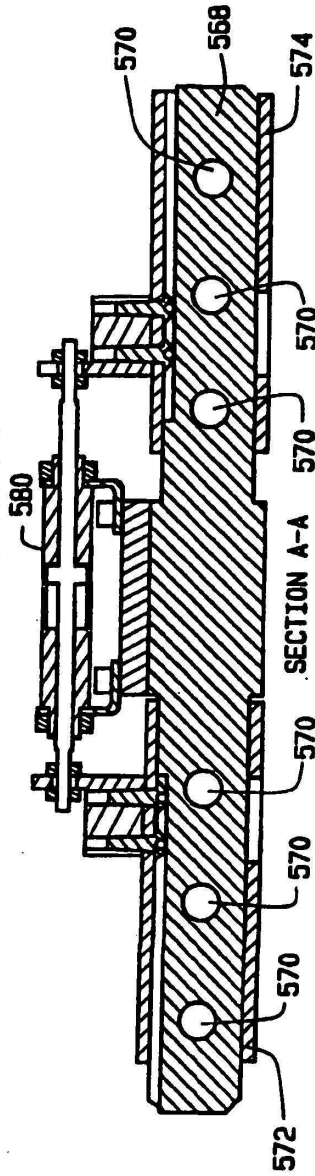


FIG. 26C

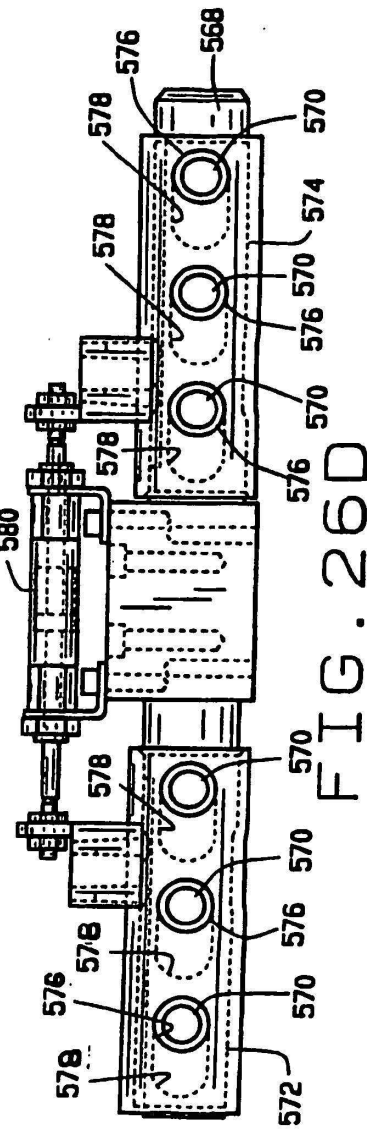
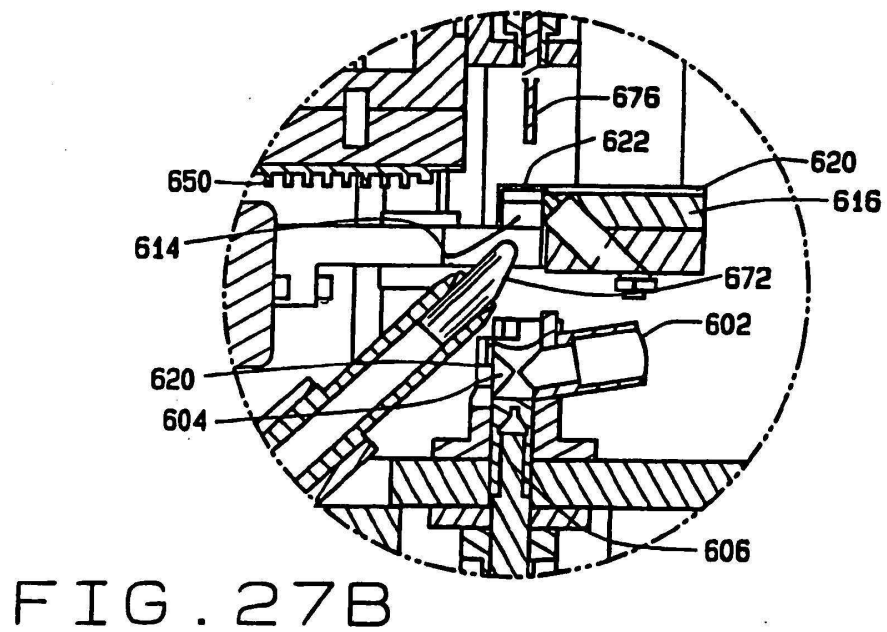
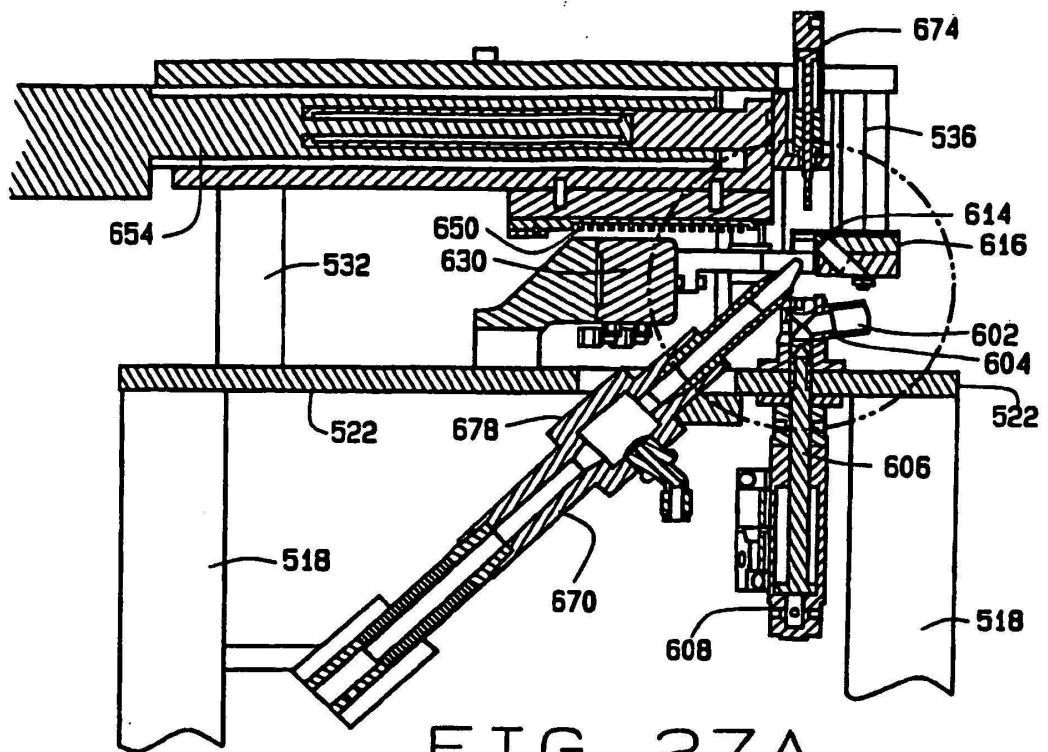


FIG. 26D



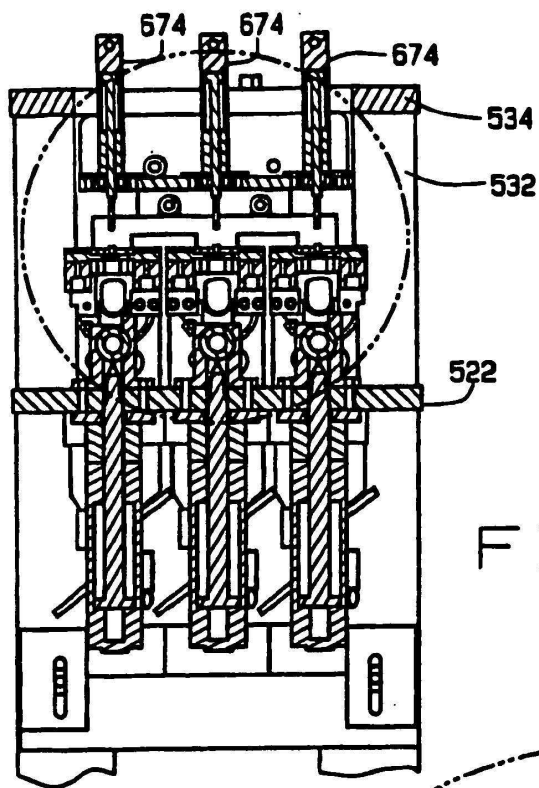


FIG. 28A

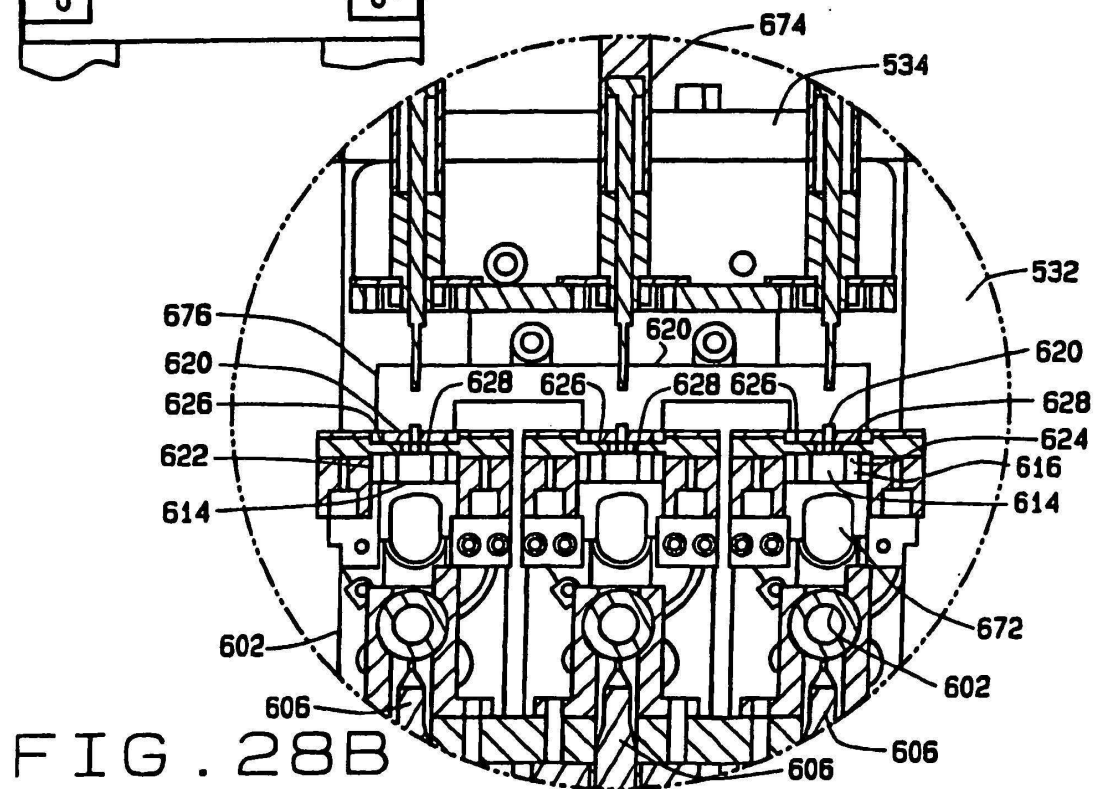


FIG. 28B

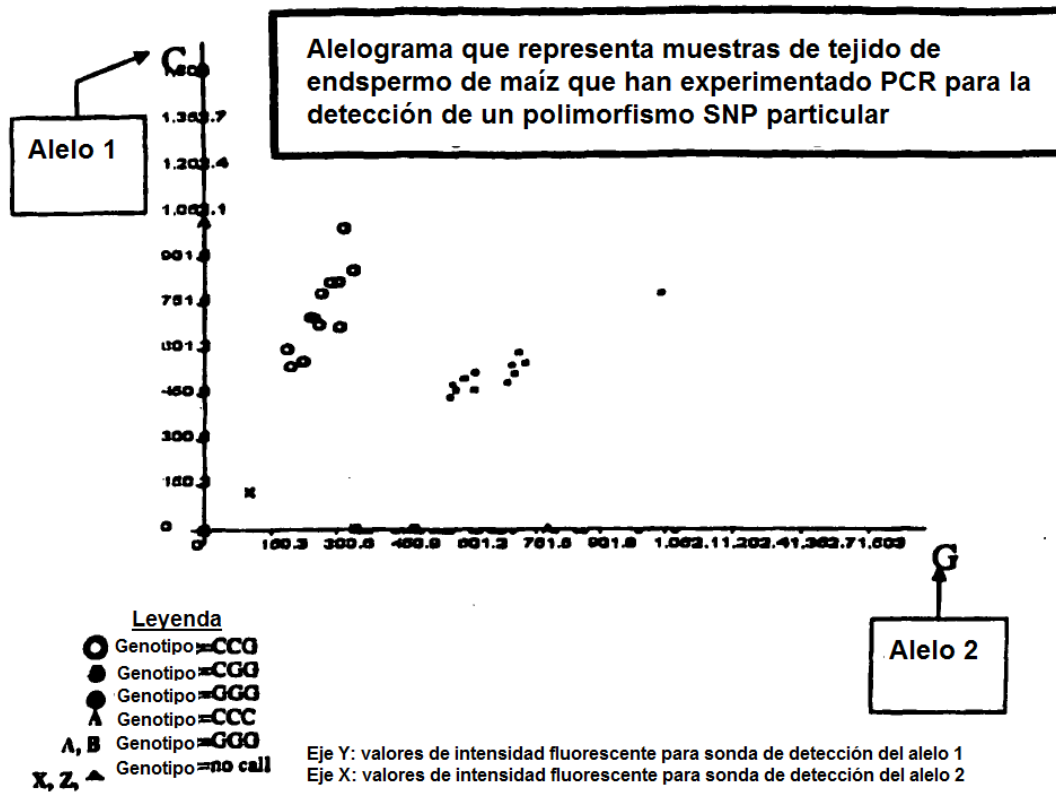


FIG. 29