



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 308 758**

51 Int. Cl.:

G01N 24/08 (2006.01)

G01R 33/44 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

G01N 35/02 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07007688 .0**

96 Fecha de presentación : **19.12.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1813936**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.08.2007**

54 Título: **Análisis de semillas por resonancia magnética.**

30 Prioridad: **20.12.2000 US 739871**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2008

73 Titular/es: **Monsanto Technology, L.L.C.**
800 North Lindbergh Boulevard
St. Louis, Missouri 63167, US

72 Inventor/es: **Kotyk, John J. y**
Deppermann, Kevin L.

74 Agente: **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).

DESCRIPCIÓN

Análisis de semillas por resonancia magnética.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento para analizar productos agrícolas. Más particularmente, la presente invención se refiere a un procedimiento para la introgresión a partir de semillas de un rasgo en una planta.

10 **Antecedentes de la invención**

La mejora genética de productos agrícolas composicionalmente mejorados puede requerir el análisis de un gran número de muestras de semillas de plantas para identificar aquellas plantas con las propiedades agronómicas y composicionales deseadas para su uso o avance a la siguiente generación. El análisis de lotes de semillas a granel para ciertos rasgos, tal como alto contenido en aceite o proteínas, en una única planta o mazorca, en conjunción con una metodología de mejora genética apropiada tal como selección recurrente, a menudo permite la selección e introducción de tales rasgos en una población comercial. Aunque el análisis de estos lotes de semillas puede realizarse mediante diversas técnicas, los procedimientos que son rápidos, de bajo coste y no destructivos son los más deseables.

La formación de imágenes por resonancia magnética (MRI) se basa en una técnica espectroscópica no invasiva conocida como resonancia magnética nuclear (RMN). La RMN requiere que la muestra en investigación contenga átomos que muestran espín nuclear, una calidad intrínseca que hace que los núcleos atómicos sean magnéticos. El átomo más común con espín nuclear es hidrógeno, cuyo núcleo es un protón con espín $\frac{1}{2}$. Un experimento de RMN de protón (RMN de ^1H) típico implica en colocar una muestra que va a estudiarse en un campo magnético homogéneo fuerte. El campo magnético fuerte produce la alineación preferencial de los protones en la muestra con el campo magnético, un fenómeno que es análogo a una aguja de brújula magnética que se alinea con el campo magnético de la Tierra. En un experimento de "RMN pulsada" moderno sencillo, se aplica de forma transitoria otro campo magnético (la radiofrecuencia o campo RF) a la muestra, que tiene el efecto de hacer girar los protones alineados hasta un estado de energía superior, que es perpendicular al campo magnético fuerte (esto se denomina un pulso de 90°). Los protones experimentan un movimiento de precesión a tasas características a medida que realinean con el campo fuerte, induciendo así una corriente en un par de bobinas que sirven como detector. Se mide la corriente en las bobinas de detección como una función del tiempo, y a partir de esto se infieren las tasas de precesión de los protones en la muestra. Se determinan las tasas de precesión principalmente mediante la fuerza del campo magnético fuerte (conduciendo los campos más fuertes a mayores tasas de precesión), pero el entorno molecular único experimentado por cada uno de los protones también tiene un efecto en la tasa de precesión. Es el entorno molecular único el que es objeto de estudio en los experimentos de RMN.

En un experimento de RMN pulsada moderno ligeramente más complicado, puede eliminarse la complejidad de las señales que surgen a partir de entornos moleculares múltiples, dejando solamente las señales de protones en un subconjunto seleccionado de entornos moleculares. Este enfoque, denominado experimento "eco de espín", puede usarse, por ejemplo, en una muestra que comprende una mezcla de aceite y agua para eliminar la señal que surge de los protones en las moléculas de agua y para dejar solamente las señales que surgen de protones en las moléculas de aceite. Esto puede llevarse a cabo usando una serie de pulsos RF de 90° y 180° , y los instrumentos comerciales normalmente vienen con un programa que es útil para programar el instrumento para ejecutar apropiadamente la secuencia de pulsos.

Los procedimientos de RMN pulsada de campo bajo se basan en la diferenciación del aceite de los otros componentes en la semilla basándose en diferencias inherentes en las tasas de relajación nuclear espín-espín y longitudinal entre el aceite y las otras especies protonadas. Los procedimientos de RMN usados para medir el aceite se han normalizado, son no destructivos, son robustos y producen resultados reproducibles y precisos. El procedimiento de MRI para medir el contenido en aceite se basa en los mismos principios físicos descritos en estudios de RMN pulsada. La diferencia es que la MRI proporciona señales de RMN codificadas espacialmente, proporcionando la presentación de los datos en un formato de imagen en lugar de en un espectro de RMN convencional.

Existe otra similitud entre los estudios de RMN convencionales y el procedimiento de MRI para medir los niveles de aceite en semillas individuales. Ambos procedimientos proporcionan un contenido relativo en aceite para las semillas en una base en porcentaje (p/p) comparando los resultados experimentales con patrones de calibración de aceite, que es el procedimiento útil y generalmente aceptado para comparar niveles de aceite en semillas individuales. Véase Tiwari *et al.*, "Rapid and nondestructive determination of seed oil by pulsed nuclear magnetic resonance technique", J. Am. Oil Chem. Soc. 51: 104-109 (1974). Se obtienen índices relativos porque una pequeña porción de la intensidad de la señal de RMN se pierde durante los retardos de tiempo incorporados en los esquemas de adquisición de datos. Pueden corregirse los índices relativos en índices absolutos normalizando los datos mediante el uso de una medición de aceite independiente para cada población dada de semillas, por ejemplo, el promedio del valor del aceite medido para la población se fija para el valor de aceite determinado en una medición a granel y por consiguiente se ajustan todas las semillas individuales. También puede obtenerse índices de aceite absolutos usando espectroscopia de RMN y procedimientos de MRI usando patrones de semillas en el análisis. En este caso, el contenido en aceite de una semilla se determina absolutamente dado que el patrón de semillas coincide más estrechamente con la relajación nuclear y el contenido en cera de la semilla experimental. Sin embargo, los índices de aceite absolutos han demostrado ser menos

exactos para comparar los niveles de aceite relativos entre semillas. Véase G. Rubel, "Simultaneous determination of oil and water contents in different oilseeds by pulsed nuclear magnetic resonance", J. Am. Oil Chem. Soc. 71: 1057-1062 (1994).

5 Mientras que los mejores instrumentos de RMN requieren campos magnéticos extremadamente homogéneos, las máquinas de MRI inducen intencionadamente gradientes de campo (variaciones en la fuerza del campo magnético con respecto a la posición) usando tres imanes de gradiente. Los imanes de gradiente son mucho más débiles que el imán fuerte, pero son suficientes para producir tasas de precesión de protones distinguibles en partes diferentes de la muestra. Las máquinas de MRI modernas pulsan no solamente el campo RF, pero también los campos de gradiente,
10 con el fin de hacer girar selectivamente y detectar selectivamente protones en regiones particulares de la muestra. La medición de la fuerza de la señal de los diversos componentes de frecuencia (tasas de precesión) indica la densidad y los tiempos de relajación (el tiempo que les lleva a los protones particulares a volver a relajarse a su estado de baja energía original y realinearse con el campo magnético fuerte, el tiempo de relajación longitudinal, y a experimentar un movimiento de precesión fuera de fase o desfasado debido a relajación espín-espín, con respecto a los otros protones)
15 de los protones en diversas ubicaciones en la muestra.

Los procedimientos de MRI proporcionan mediciones directas de características tales como los niveles de aceite, proporcionando así un ensayo primario independiente de un modelo quimiométrico. Por tanto, puede construirse una imagen tridimensional en la que las intensidades en diversos puntos en la imagen se refieren a las densidades y los
20 tiempos de relajación de los protones en esos puntos en la muestra. Además, dado que entornos moleculares diferentes dan como resultado frecuencias precesión diferentes, puede determinarse el entorno molecular en cada punto en la muestra. Un enfoque de este tipo se denomina "obtención de imagen de desplazamiento químico" (CSI).

Una alternativa a la CSI es la "obtención de imagen por eco de espín" (SEI). En este experimento, puede individualizarse una clase de protones (basándose en sus tasas de desfasado), y pueden suprimirse las señales del resto de los protones. Por ejemplo, si una muestra contiene aceite y agua separados espacialmente y se realiza un experimento de SEI para detectar el aceite, entonces la imagen resultante mostrará solamente aquellas regiones de la muestra en que se encuentra aceite.

30 La MRI es una técnica radiológica no invasiva bien conocida comúnmente usada en las ciencias médicas. Se considera universalmente la radiación de longitud de onda larga (onda de radio) como menos nociva que las formas de radiación usadas en otros tipos de técnicas radiológicas no invasivas tales como exploraciones TAC (tomografía axial computerizada) por rayos X. Ya en 1988, empezaron a aplicarse técnicas de MRI para el estudio de plantas. Véase la sección de introducción de Lakshminarayana *et al.*, "Spatial distribution of oil in groundnut and sunflower seeds by nuclear magnetic resonance imaging", J. Biosci. 17(1): 87-93 (marzo de 1992) (a continuación en el presente documento Lakshminarayana *et al.*) (que describe la historia hasta 1992 del uso de la MRI en el estudio de plantas, semillas y tejidos vegetales). Lakshminarayana *et al.* describen un experimento en que se usó MRI en semillas individuales para determinar la distribución espacial de aceite y agua en muestras de semilla individuales. Usaron una secuencia de pulso de eco de espín para detectar selectivamente solamente los protones que formaban parte de las moléculas de aceite.
40 Heil *et al.*, "Magnetic resonance imaging and modeling of water up-take into dry beans", Lebensm.-Wiss. u.-Technol. 25:280 (1992) también usaron la MRI para estudiar la captación de agua en judías secas.

Halloin *et al.*, "Proton magnetic resonance imaging of lipid in pecan embryos", J. Am. Aceite Chemists' Soc. 70:1259 (1993) usaron ambas MRI de SEI y de CSI para obtener imágenes de lípidos en embriones de pacana. Estos
45 experimentos estudiaron las diferencias en las imágenes de embriones de pacana que eran normales, estaban infectados por hongos y estaban dañados por insectos. El experimento de MRI de CSI mostró la distribución de lípidos y agua dentro de embriones de pacana.

Los expertos en la técnica conocen otras técnicas de MRI. Un ejemplo es la relaxografía, o mapeo del tiempo de
50 relajación. En esta técnica, se distinguen regiones diferentes de una muestra de la que se están obteniendo imágenes basándose en las diferencias en los tiempos de relajación de los protones en las regiones diferentes.

Los experimentos de MRI en semillas se han realizado tradicionalmente usando instrumentos de MRI de calidad para investigación, por ejemplo, el instrumento Bruker AMX-400 9,4 teslas con un calibre de 8,9 cm de diámetro
55 (Bruker Instruments Inc., Billerica, MA) o el instrumento GE Omega system de 7,1 teslas con un calibre de 15 cm de diámetro (General Electric, Milwaukee, WI). Estos instrumentos normalmente tienen un tamaño de calibre de unos pocos centímetros y en consecuencia, pueden usarse solamente para estudiar muestras que son menores que el tamaño de calibre. La ventaja de la pequeña escala de estos instrumentos es que las bobinas de detección están próximas a la muestra en investigación, y por tanto su sensibilidad es muy alta. También existen instrumentos mayores de MRI de
60 calidad para investigación con tamaños de calibre y diámetros de bobina de detección de 20-50 cm, por ejemplo, el Bruker Biospec II de 4,7 teslas, calibre de 40 cm de diámetro (Bruker Instruments, Inc., Billerica, MA). Estos instrumentos son útiles para obtener imágenes de ratones y otros animales pequeños. Los instrumentos de MRI clínicos, por otro lado, deben tener un tamaño de calibre y bobinas de detección que son lo suficientemente grandes para acomodar un cuerpo humano. Por ejemplo, Siemens (Siemens AG, Erlangen, Alemania) y GE Medical Systems (Milwaukee,
65 WI) fabrican una amplia gama de instrumentos clínicos que pueden acomodar objetos con diámetro de 50 cm y mayores. Algunos sistemas más nuevos con imanes permanentes con campo magnéticos de tan sólo 0,2 teslas no están limitados por el tamaño del calibre, sino por el diámetro de la bobina. Pero el mayor diámetro de bobinas de detección en los instrumentos superconductores convencionales, así como en los sistemas de imán permanente nuevos, hacen

que estos instrumentos clínicos sean inadecuados para obtener imágenes de muestras pequeñas tales como semillas. La gran distancia de las bobinas de detección de una muestra pequeña y la señal inherentemente débil que emana de una muestra pequeña conspiran para hacer que los enfoques convencionales para obtener imágenes cuantitativas de muestras pequeñas usando instrumentos de MRI clínicos no sean prácticos. Pero los volúmenes pequeños de los instrumentos de MRI de investigación de tamaño de calibre pequeño no permiten la obtención de imágenes simultáneas de tantas semillas como permitiría un instrumento de MRI clínico si los instrumentos de MRI mayores fuesen adecuados para detectar señales de muestras pequeñas.

Las técnicas de tiempo intensivo para encontrar características deseables son especialmente desventajosas para programas selectivos de mejora genética de plantas, en los que es necesario examinar muchas semillas individuales rápidamente con el fin de permitir la selección de semilla antes de la próxima generación de plantas. Los retrasos en proporcionar al fitotecnista los resultados analíticos puede producir la pérdida de un ciclo de mejora genética completo.

Las técnicas en la que no se obtienen imágenes, tales como la espectroscopia IR adolecen de la desventaja adicional de recoger información de sólo un subconjunto de la muestra total mediante toma de muestras puntual de sólo porciones de únicamente algunas semillas de entre los centenares de semillas en la muestra a granel. Además, dado que el toma de muestras puntual somete a examen porciones arbitrarias de la semilla, puede que los diferentes tejidos de las semillas en la muestras no estén bien representados por los datos analíticos. Dado que a menudo están presentes calidades como el contenido en aceite en diferentes cantidades en diferentes tejidos, las técnicas en las que no se obtienen imágenes pueden no evaluar con precisión la calidad deseada. Las técnicas en las que no se obtienen imágenes no tienen en cuenta la información espacial, y por tanto no proporcionan información a un fitotecnista con respecto al tamaño, la forma, el daño mecánico, la infestación por insecto o el daño por hongos.

Las técnicas de análisis de semillas convencionales tampoco proporcionan un procedimiento eficaz para el análisis de semillas individuales, que puede acelerar enormemente la tasa de desarrollo de variedades. El análisis de semillas individuales es necesario para diferenciar y seleccionar semillas individuales de la población de semillas heterogénea a menudo encontrada en las poblaciones en mejora genética. El análisis de semillas individuales puede reducir el número de generaciones requeridas para la producción de una planta con el rasgo deseado. La selección de semillas individuales también reduce el número de plantas individuales requeridas. En el maíz, por ejemplo, la habilidad para identificar las semillas individuales con el rasgo deseado en el nivel de semilla individual en lugar del nivel de toda la mazorca puede reducir los requisitos del semillero en 100 veces. Esto hace posible realizar un número mucho mayor de proyectos de mejora genética con los mismos recursos.

Otras técnicas analíticas convencionales, tales como la cromatografía de gases, también tampoco proporcionan un procedimiento eficaz para el análisis de semillas individuales. Por ejemplo, el procedimiento convencional para el análisis de semillas individuales de colza requiere la escisión manual de la mitad de cada semilla para el análisis de ácidos grasos mediante cromatografía de gases, mientras que se planta la otra mitad. Debido a la preparación manual de la muestra y al bajo rendimiento de esta técnica analítica, solamente un pequeño número de muestras pueden someterse a prueba por hora usando este procedimiento. Además, esta técnica permite la posibilidad de destruir los potenciales de las semillas analizadas para de crecer hasta dar lugar a plantas productoras de semillas maduras.

Aunque es deseable el análisis de semillas individuales, los enfoques y los procedimientos de toma de muestras convencionales no permiten el procesamiento eficaz de semillas individuales. Las técnicas convencionales requieren un amplio aporte manual, lo que limita la tasa de desarrollo de plantas con características mejoradas.

El documento US-A-3 530 372 da a conocer un procedimiento para determinar si una muestra que comprende una pluralidad de semillas comprende semillas que muestran un rasgo, comprendiendo el procedimiento proporcionar dicha muestra en un dispositivo de toma de muestras, analizar la muestra mediante RMN para obtener información indicativa de la presencia del rasgo, determinar si cada semilla individual en dicha muestra presenta dicho rasgo basándose en dicho análisis, y clasificar individualmente las semillas para separar las semillas individuales que muestran dicho rasgo. El procedimiento se basa en un análisis de RMN consecutivo de semillas individuales.

El artículo de Reaney, M.J. *et al*, JAOCS, vol. 76, nº 7, 1999 da a conocer un procedimiento para producir plantas que tienen un rasgo mediante la mejora genética de manera selectiva de las plantas, comprendiendo el procedimiento

- a) obtener una muestra constituida por una semilla;
- b) proporcionar dicha muestra en un dispositivo de toma de muestras;
- c) generar un espectro de resonancia magnética de dicha muestra;
- d) analizar dicho espectro de resonancia magnética en vista de dicho rasgo (concretamente la composición de aceite); y
- e) determinar si la semilla muestra dicho rasgo basándose en dicho análisis.

Las técnicas de análisis espectroscópico convencionales no permiten la localización de niveles de componentes químicos dentro de los diferentes tejidos de las semillas. Los enfoques convencionales, tales como la disección manual

de la semilla seguido por el análisis químico mediante técnicas analíticas tradicionales, son no solamente laboriosas y destructivas, sino que también dan como resultado una escasa resolución de los componentes y una mala cuantificación, dado que el tamaño de la muestra que resulta de la disección de las semillas individuales es menor que el tamaño de la muestra en que las técnicas más tradicionales producen resultados fiables.

Se necesitan en la técnica procedimientos para el análisis rápido de semillas a granel e individuales que puedan analizar de manera eficaz y no destructiva las características morfológicas y/o químicas de semillas individuales, y que puedan integrarse en una máquina de procesamiento agrícola. La presente invención proporciona tales procedimientos.

Sumario de la invención

Esta invención proporciona procedimientos para el análisis rápido, no destructivo de semillas con el fin de determinar la presencia o ausencia de un rasgo de una muestra dentro de esa muestra usando formación de imágenes por resonancia magnética en una pluralidad de muestras y usando la información conseguida mediante el análisis de MRI para seleccionar individuos que muestran la característica de un grupo de candidatos que muestran potencialmente la característica. Las características de la invención se exponen en la reivindicación 1, definiendo las reivindicaciones dependientes las realizaciones preferidas.

Descripciones de los dibujos

La figura 1 muestra imágenes de MRI de alta resolución de cuatro granos de maíz diferentes con diferentes niveles de contenido en aceite. Estas imágenes indican que el grano A (18,4% de aceite en peso) tiene un contenido en aceite superior que el grano B (7,8% de aceite en peso), que tiene un contenido en aceite superior que el grano C (5,7% de aceite en peso), que tiene un contenido en aceite superior que el grano D (2,8% de aceite en peso). Estas imágenes usaron secuencia de pulsos de eco de espín que obtuvo imágenes solamente de los protones que formaban parte de las moléculas de aceite. Por tanto, las regiones más oscuras indican un contenido en aceite mayor, mientras que las regiones más claras indican un contenido en aceite menor.

La figura 2 es un diagrama de bloques que detalla las etapas de la recogida de datos inicial de un cubo de muestra que contiene múltiples capas de semillas para la producción de una matriz que detalla el de contenido en aceite en porcentaje en peso de cada una de las semillas dentro de la muestra. Este diagrama de bloques muestra las etapas que pueden aplicarse a los datos sin procesar obtenidos de un experimento de MRI para producir la matriz de datos final para las semillas en forma de contenido en aceite en porcentaje en peso para cada semilla dentro del cubo de muestra. En primer lugar, se recoge un conjunto de datos tridimensional a partir del cubo de muestra para producir un cubo 101 de datos de imagen tridimensional. (Véase la figura 3 para un ejemplo de un cubo de datos de imagen). Se usa un programa de análisis de imágenes tal como IDL (*interactive data language*) para combinar los cortes que comprenden el cubo de datos en un conjunto de imágenes 103 bidimensionales, en las que cada una de las imágenes bidimensionales resultantes corresponde a una capa del cubo de muestra. (Véase la figura 4a para una representación visual de una imagen de capa de este tipo). Puede usarse otro programa de análisis de imágenes y los expertos en la técnica de análisis de imágenes conocen muchos ejemplos de tal programa. Se usa el programa de análisis de imágenes para aplicar un filtro 104 umbral a cada una de las imágenes de capa basándose en la proporción señal-ruido calculada usando la primera imagen de capa para producir una imagen de capa "limpia". (Véase la figura 4b para una representación de una imagen de capa resultante de la aplicación del filtro umbral.) Los expertos en la técnica de análisis de imágenes conocen otros filtros útiles para esta etapa. A continuación se usa el programa de análisis de imágenes para localizar los límites de semillas individuales dentro de cada capa 106 de imagen, usando un filtro de detección de borde u otro filtro conocido por los expertos en la técnica de análisis de imágenes para localizar objetos dentro de una imagen, para producir imágenes bidimensionales limpias de cada semilla dentro de cada capa del cubo 107 de muestra. A continuación, se usa el programa de análisis de imágenes para integrar la intensidad de imagen de MRI para cada semilla dentro de cada capa del cubo 108 de muestra. Se almacenan las intensidades integradas como una matriz de datos sin procesar en los que cada elemento de la matriz de datos sin procesar es la intensidad integrada correspondiente a cada semilla en el cubo 109 de muestra. Finalmente, se combina la información almacenada en la matriz de datos sin procesar con la información acerca de los pesos de cada semilla dentro del cubo 110 de muestra para calcular el porcentaje relativo de aceite en peso en cada semilla dentro del cubo de muestra. Los resultados de este cálculo se almacenan en una matriz de datos procesados en el que cada elemento de la matriz de datos procesados corresponde al porcentaje relativo de aceite en peso en cada semilla dentro de la matriz 111 de muestra, que no se ha corregido para imperfecciones en el campo magnético principal, gradiente de campo pulsado, y bobina de detección de RF no homogéneo, denominado colectivamente defectos de campo. Se procesa adicionalmente estos datos incorporando la intensidad de MRI medida de un patrón de semillas con contenido en aceite conocido con el fin de corregir los defectos de campo y producir una matriz de datos que contiene el contenido relativo en aceite de cada semilla dentro del cubo de muestra.

La figura 3 muestra los datos sin procesar de un cubo de muestra de 12 capas de semillas de maíz en el que cada capa está comprendida por 12 placas, y cada placa tiene 24 pocillos, para un total de 3456 semillas.

La figura 4a son los datos combinados de varios cortes del cubo de datos que corresponden a una capa del cubo de muestra y que muestra los datos para 288 semillas.

La figura 4b es una representación de los datos de la figura 4a tras la aplicación de un filtro "umbral".

La figura 5 muestra las etapas requeridas para establecer el experimento de examen por MRI de la invención. Se muestran las etapas fundamentales de análisis previo de la muestra para la preparación de la muestra para un experimento de MRI de alta resolución. En primer lugar, se cargan las placas de múltiples pocillos individuales con las semillas de interés. En los dos ejemplos mostrados, se cargan granos de maíz en una placa de 48 pocillos y se carga soja en una placa de 96 pocillos. Pueden cargarse muestras más pequeñas en placas de pocillos mucho más densas, por ejemplo, pueden cargarse semillas de colza en placas de 960 pocillos. A continuación, se apilan las placas en capas para obtener un cubo de muestra. En esta figura, hay dos conjuntos de cuatro capas, para un total de placas de 8 pocillos. Son posibles cubos de muestra mucho mayores (por ejemplo, son posibles 12 o más capas), pero el tamaño de la bobina de detección es un factor limitante en este ejemplo particular. Se empaqueta el cubo de muestra dentro de la bobina de RF, que entonces se carga en el imán de MRI. Entonces el experimento está listo para funcionar.

La figura 6 es una comparación del experimento de examen por MRI de alta resolución de la invención (figura 6a) y el experimento de examen por MRI de alto rendimiento de la invención (figura 6b). Esto ilustra claramente cómo el instrumento clínico de MRI es más adecuado para un cubo de muestras mayor que un instrumento de investigación por MRI. En la figura 6a, la bobina de RF del instrumento de investigación limita el tamaño del cubo de muestra, en este caso para 2 pilas de 5 capas de placas de 48 pocillos, para un total de 480 semillas. La fuerza de campo magnético superior del imán de investigación (4,7 T) permite una resolución de imágenes superior, pero estas imágenes de alta resolución también requieren tiempos adquisición más largos (3 horas) y tamaños de muestra menores. Los instrumentos clínicos tales como los que se muestran en la figura 6b, por otro lado, pueden acomodar cubos de muestra mucho mayores. En este ejemplo hay 12 pilas de 12 capas de placas de 24 pocillos, para un total de 3456 semillas. Aunque este instrumento clínico no sea el mejor sistema para obtener la obtención de imágenes de resolución más alta en comparación con el imán de investigación, es el más adecuado para obtención de imágenes de alto rendimiento. No sólo son más de siete veces el número de imágenes de semillas obtenidas simultáneamente en comparación con el instrumento de investigación, sino que el experimento de obtención de imagen de resolución más baja tarda solamente 18 minutos, una décima parte de la cantidad de tiempo requerida por el experimento de obtención de imagen de resolución más alta. Por tanto, en este ejemplo, usando el instrumento clínico puede analizarse más de 70 veces el número de semillas que pueden analizarse en una dada cantidad de tiempo usando el instrumento de investigación. Alterando los parámetros de adquisición de datos, pueden obtenerse imágenes de alta resolución usando el instrumento clínico. Este cambio aumentará considerablemente la cantidad de tiempo que se tarda en adquirir los datos.

La figura 7 muestra diseños de un dispositivo de toma de muestras. Estos diseños son sólo dos de los diversos diseños diferentes posibles para la mayor cantidad cubos de muestra, cada uno de los cuales se usa preferiblemente en un instrumento de MRI clínico.

La figura 8 se refiere a una comparación del contenido en aceite promedio por MRI con respecto a contenido en aceite a granel. El gráfico muestra la correlación entre las mediciones de contenido en aceite usando MRI y usando espectroscopia infrarroja (IR).

La figura 9 se refiere a una comparación dentro de un día de la intensidad de la señal de RM medida, usando un patrón de calibración. El gráfico muestra las comparaciones entre los resultados de análisis de MRI del contenido en aceite de los mismos patrones de aceite de las semillas en dos tiempos diferentes en el mismo día.

La figura 10 se refiere a una comparación entre días de la intensidad de la señal medida, usando un patrón de calibración. El gráfico muestra las comparaciones entre los resultados de los análisis de MRI del contenido en aceite de los mismos patrones de aceite de las semillas en dos días diferentes.

En la figura 11 el gráfico (referente a una correlación entre dos detectores de señal de RM diferentes medidos usando un patrón de aceite) muestra comparaciones entre los resultados de análisis de MRI del contenido en aceite de los mismos patrones de aceite de las semillas usando dos instrumentos de RMN diferentes.

La figura 12 es un mapa del porcentaje de desviación estándar con respecto a la media para cada posición de pocillo en cada una de las nueve capas de un cubo patrón de calibración.

Descripción detallada de la invención

La presente invención es una mejora con respecto a las técnicas de MRI existentes para medir características de semillas y proporciona además procedimientos para mejorar genéticamente de manera selectiva plantas con el fin de mejorar propiedades tales como el contenido en aceite de la semilla. La invención proporciona un procedimiento para usar instrumentos de MRI clínicos (o de otro gran calibre) para analizar muestras pequeñas tales como semillas. Los imanes de MRI de calidad para investigación menores tienen tamaños de calibre y diámetros de bobina de detección y RF que son significativamente menores que los de imanes de MRI de calidad para investigación mayores y calidad clínica. Esta diferencia presenta ambas, ventajas y desventajas, para determinar características de muestras pequeñas tales como semillas. Una ventaja de los instrumentos de calidad para investigación es que las bobinas de detección están más próximas a la muestra en investigación, de modo que la sensibilidad del instrumento es mayor, y en consecuencia la proporción señal-ruido es mayor. Sin embargo, una desventaja significativa es que el volumen activo es inherentemente menor en los instrumentos de calidad para investigación de calibre pequeño. Se define el volumen activo tal como se usa en el presente documento como el volumen dentro del instrumento en el que puede colocarse la muestra en investigación de modo que puede obtenerse una imagen de la muestra sin distorsiones significativas. El

volumen de formación de imágenes está limitado por, por ejemplo, la homogeneidad del campo magnético fuerte, la linealidad de los gradientes de campo y la homogeneidad de la bobina de detección de RF. Las faltas de homogeneidad de campo magnético fuerte significativas, las no linealidades de gradiente de campo y las faltas de homogeneidad de bobina de detección de RF (denominadas colectivamente en el presente documento como “defectos de campo”) en cualquiera región dentro del instrumento provocan distorsiones en las imágenes de la muestra obtenidas a partir de estas regiones. Las distorsiones pequeñas de estos tipos pueden compensarse, por ejemplo, corrigiendo los defectos de campo o por corrección de los datos tras la adquisición de imagen, pero existirán invariablemente regiones en el instrumento en las que las distorsiones son demasiado sustanciales para corregirlas, y los datos de estas regiones son inservibles.

Los instrumentos de calidad clínica tienen volúmenes activos mayores que los instrumentos de calidad para investigación. Por ejemplo, un instrumento de calidad para investigación de calibre pequeño típico (con, por ejemplo, un tamaño de calibre de 9 cm) puede tener un volumen activo definido por un cilindro de, por ejemplo, 4 cm de diámetro y 4 cm de longitud, mientras que un instrumento clínico, diseñado para alojar partes sustanciales de un cuerpo humano, puede tener un volumen activo definido por un cilindro de, por ejemplo, 25 cm de diámetro y 30 cm de longitud. El mayor volumen activo de instrumentos de calidad clínica puede alojar por tanto dispositivos de toma de muestras mucho mayores. Por ejemplo, la figura 6a muestra un cubo de muestra diseñado para un instrumento de calidad para investigación de calibre medio. Sus dimensiones son aproximadamente 15 cm X 20 cm X 12 cm, y contiene 480 semillas. La figura 6b muestra un cubo de muestra diseñado para un instrumento de calidad clínica. Sus dimensiones son aproximadamente 30 cm X 35 cm X 30 cm, y contiene 3456 semillas. Aparte de todas las otras diferencias entre los instrumentos, el volumen activo solo da una mejora de más de siete veces en el número de semillas que puede analizarse simultáneamente en el instrumento de calidad clínica.

Hay diversos obstáculos que tienen que superarse con el fin de beneficiarse del volumen activo mayor de los instrumentos de calidad clínica para analizar muestras pequeñas, tales como semillas. Un obstáculo de este tipo se supera reconociendo que las bobinas de detección y RF tienen que cargarse, o los circuitos de detección y RF tienen que volver a ajustarse para dar cuenta de la diferencia en la inductancia de las bobinas de detección entre cuando la muestra de semilla (que da una menor inductancia) y una muestra humana (que da una mayor inductancia) está en la bobina.

Hay tres cuestiones relacionadas que pueden presentar dificultades cuando se forman imágenes magnéticamente de muestras que comprenden muestras tales como semillas. La primera cuestión es que la susceptibilidad magnética del material orgánico es drásticamente diferente que la del aire. Por tanto los espacios de aire entre semillas en una muestra de muchas semillas y los espacios de aire entre las semillas y el material plástico intermedio del dispositivo de toma de muestras provocan distorsiones en el campo magnético por lo demás uniforme como resultado de las variaciones espaciales abruptas en las líneas del campo magnético. Estas distorsiones en el campo magnético fuerte provocan variaciones en la fuerza de campo magnético experimentada por las regiones diferentes de una muestra. Dado que regiones diferentes de la muestra experimentan campos magnéticos diferentes, los protones que por lo demás son equivalentes en las regiones diferentes experimentan movimiento de precesión a diferentes velocidades. Esto provoca una disminución en los tiempos de desfase, lo que da como resultado una pérdida de fuerza de señal más rápida que en ausencia de las diferencias de susceptibilidad.

La segunda cuestión que puede presentar dificultades cuando se forman imágenes magnéticamente de muestras tales como semillas son no linealidades en los gradientes de campo. Las no linealidades de gradiente de campo crean dificultades con trazar el mapa de regiones reales en la muestra para elementos de volumen dentro de una imagen de la muestra. En casos extremos, tales no linealidades pueden hacer los datos de imagen intratables. Las no linealidades de gradiente son de particular preocupación con muestras mayores porque los gradientes lineales son más difíciles de mantener a lo largo de distancias largas.

La tercera cuestión que puede presentar dificultades cuando se forman imágenes magnéticamente de muestras tales como semillas son las faltas de homogeneidad en las bobinas de detección de RF. Las faltas de homogeneidad en la bobina de RF crean dificultades en la cuantificación de regiones reales en la muestra hasta los niveles del material detectado en la muestra. En casos extremos, tales faltas de homogeneidad pueden hacer los datos de imagen intratables. Las faltas de homogeneidad en el detector de RF son de particular preocupación con muestras mayores porque los campos homogéneos son más difíciles de mantener a lo largo de distancias largas.

Procedimientos para analizar semillas usando MRI

Es un aspecto de la presente invención proporcionar un procedimiento para determinar si una semilla muestra un rasgo o si cualquier semilla dentro de una muestra de semillas muestra un rasgo. En este aspecto de la invención, se usa un dispositivo de toma de muestras para proporcionar la semilla o la muestra de semillas para su análisis mediante un instrumento de MRI. Se usa el instrumento de MRI para proporcionar una imagen de la semilla o de la muestra de semillas. Se analiza la imagen resultante y se determina la presencia o ausencia del rasgo basándose en el análisis.

Semillas

Puede utilizarse cualquier semilla en un procedimiento o dispositivo de la presente invención. En una realización preferida, la semilla se selecciona del grupo constituido por semilla de alfalfa, semilla de manzana, semilla de plátano,

semilla de cebada, semilla de judía, semilla de brócoli, semilla de ricino, semilla de cítrico, semilla de trébol, semilla de coco, semilla de café, semilla de maíz, semilla de algodón, semilla de pepino, semilla de abeto Douglas, semilla de eucalipto, semilla de pino de incienso, semilla de linaza, semilla de melón, semilla de avena, semilla de aceituna, semilla de palmera, semilla de guisante, semilla de cacahuete, semilla de pimienta, semilla de álamo, semilla de pino radiata, semilla de colza, semilla de arroz, semilla de centeno, semilla de sorgo, semilla de pino del sur, semilla de soja, semilla de fresa, semilla de remolacha azucarera, semilla de caña de azúcar, semilla de girasol, semilla de ocozotl, semilla de té, semilla de tabaco, semilla de tomate, césped, semilla de trigo y semilla de *Arabidopsis thaliana*. En una realización más preferida, la semilla se selecciona del grupo constituido por semilla de algodón, semilla de maíz, semilla de soja, semilla de colza, semilla de arroz y semilla de trigo. En una realización incluso más preferida, la semilla es una semilla de maíz.

Muestras

Pueden utilizarse semillas individuales o lotes de semillas con los procedimientos y dispositivos de la presente invención. Una “muestra” de semillas es cualquier número de semillas o una única semilla. En una realización preferida, una muestra de semillas es superior a 10 semillas, más preferiblemente superior a 20 semillas, 50 semillas, 500 semillas, 1.000 semillas o 10.000 semillas. En otra realización puede clasificarse la muestra de las semillas por su origen, tal como semillas que se derivan de una única mazorca, una única planta o un único cruce planta.

Pueden analizarse simultáneamente las semillas individuales en una muestra con un procedimiento de la presente invención. Tal como se usa en el presente documento, “simultáneamente” significa cualquier conjunto de datos que se deriva de un único análisis. Un único análisis puede ser un único experimento de MRI, o el promedio de múltiples experimentos de MRI. Tal análisis simultáneo puede ser el análisis simultáneo de un lote de semillas para uno o más rasgos. Tal análisis simultáneo también puede ser también el análisis simultáneo de una semilla para múltiples rasgos. En una realización, más de un rasgo puede analizarse simultáneamente, por ejemplo, tanto el contenido en agua como en aceite pueden analizarse simultáneamente. En una realización alternativa, más de 3 rasgos, 4 rasgos, 5 rasgos o 6 rasgos pueden analizarse simultáneamente. En otras realizaciones alternativas, entre 5 rasgos y 10 rasgos o entre 10 rasgos y 20 rasgos pueden analizarse simultáneamente. En la realización preferida, el experimento de MRI está dirigido a determinar el contenido en aceite de las semillas.

Rasgos

Pueden usarse los procedimientos de la presente invención para detectar cualquier rasgo que pueda medirse mediante resonancia magnética. En una realización preferida, el rasgo es un rasgo bioquímico. Tal como se usa en el presente documento, un rasgo bioquímico es cualquier rasgo que afecta a la composición química de la muestra agrícola. En una realización el rasgo bioquímico se selecciona del grupo constituido por contenido en aceite, contenido en proteínas, contenido en hidratos de carbono, contenido en almidón, contenido en fibras y contenido en agua. Tal como se usa en el presente documento contenido en se refiere a la cantidad de un componente, por ejemplo 5 miligramos (mg) de proteína por semilla o 5 mg de proteína por 10 gramos de peso seco de tejido. Los rasgos preferidos son el contenido relativo en aceite y el contenido relativo en agua. El rasgo más preferido es el contenido relativo en aceite.

Puede determinarse el daño a los granos provocado durante la cosecha, el secado, la elevación y el movimiento del grano a través de canales comerciales con los procedimientos de la presente invención. El uso de técnicas de cultivo modernas, tales como el uso de cosechadoras desgranadoras-recogedoras de campo, ha conducido a un contenido en humedad del grano mucho mayor en muestras que si se dejaran secar las muestras en la mazorca. Un contenido en humedad alto requiere el uso de secado artificial a temperaturas superiores a 80°C, lo que pueden conducir a grietas por estrés y rotura del grano. Los indicadores de rotura del grano pueden incluir, pero no se limitan a, la proporción de endospermo vítreo y no vítreo, densidad del grano, peso del grano medio, cantidad y calidad del pericarpio, y tamaño y forma del grano. Pueden usarse los procedimientos de la presente invención en la identificación de rotura y susceptibilidad de rotura, y en la identificación de rasgos químicos y físicos que pueden minimizar estos problemas.

En cualquiera de las realizaciones de análisis de una única semilla y múltiples semillas dadas anteriormente, la semilla puede analizarse para más de un rasgo al mismo tiempo. Por ejemplo, los rasgos que corresponden a diferentes desplazamientos químicos o tasas de desfase, o intervalos de desplazamientos químicos y tasas de desfase y los rasgos que tienen un efecto acumulativo dentro del mismo intervalo pueden investigarse simultáneamente. Además, pueden analizarse tejidos diferentes de una semilla individual por separado. Usando modelado espectral para diferenciar entre los dos tejidos, pueden asociarse regiones de elementos de volumen de imagen contiguos con cualquier porción de un tejido de planta o semilla, tal como, por ejemplo, el germen y el endospermo. Entonces pueden usarse los datos espectrales para las porciones diferentes para analizar diferencialmente diferentes tejidos de la semilla. En la realización preferida, se analizan las semillas para determinar su contenido relativo en aceite.

Dispositivos de toma de muestras

Los dispositivos de toma de muestras se usan para proporcionar muestras. Tal como se usa en el presente documento, “proporcionar” significa cualquier procedimiento usado para colocar una muestra en un instrumento de MRI o cualquier procedimiento usado para contener una muestra mientras está en un instrumento de MRI.

En un ejemplo que no es una realización de la invención, se proporcionan las semillas de una única fuente juntas en el dispositivo de toma de muestras. La única fuente puede ser cualquier fuente que proporcione semillas que tengan un antecedente genético común, tal como una mazorca de maíz, una única planta o el producto de un único cruce. Usando este procedimiento, se proporcionan las semillas del lote como un grupo proporcionado al azar en el dispositivo de toma de muestras. Tal como se usa en el presente documento, “proporcionar al azar” un lote de semillas en un dispositivo de toma de muestras es un modo particular de proporcionar las semillas disponiéndolas en el dispositivo de toma de muestras sin tener en cuenta la orientación o separación de semillas en un momento posterior. Por ejemplo, un lote de 100 semillas que se vierte en una única placa de plexiglás grande, para su análisis se dice que se “proporciona al azar”.

Cualquier dispositivo de toma de muestras puede usarse si el dispositivo de toma de muestras no interfiere significativamente con las mediciones de resonancia magnética. Los dispositivos de toma de muestras incluyen, pero no se limitan a, dispositivos tales como envases fabricados de plexiglás que tienen, por ejemplo, 12 pocillos, 24 pocillos, 96 pocillos o 384 pocillos dentro de los cuales pueden cargarse muestras de semilla para su análisis. Otros materiales que pueden usarse para la construcción de dispositivos de toma de muestras son conocidos por los expertos en la técnica de formación de imágenes por resonancia magnética. Los dispositivos de toma de muestras particularmente preferidos son placas que contienen múltiples pocillos que se apilan en múltiples capas para proporcionar una matriz tridimensional de muestras que han de analizarse con el fin de maximizar el número de muestras analizadas en un experimento de formación de imágenes.

Según la invención, se proporcionan semillas en un lote en un dispositivo de toma de muestras que puede mantener cada semilla en su propio compartimento individual. Un “compartimento individual” tal como se usa en el presente documento puede ser cualquiera que puede colocar cada semilla de modo de pueda identificarse la semilla como correspondiente a un elemento de volumen particular dentro de la imagen tal como se mide mediante MRI. En una realización el dispositivo de toma de muestras comprende una superficie plana y está dispuesto horizontalmente, y los compartimentos individuales (“pocillos”) son porciones designadas de la superficie plana. En otra realización, el dispositivo de toma de muestras comprende compartimentos individuales que tienen un suelo y cuatro paredes dispuestos en un patrón cuadrado dentro de los cuales pueden proporcionarse las semillas individuales. En aún otra realización, el dispositivo de toma de muestras es una superficie plana sobre la que se colocan de manera desmontable compartimentos individuales que tienen solamente cuatro paredes. En esta realización, puede desmontarse la superficie plana o bien los compartimentos individuales para permitir la clasificación de las semillas. En una realización preferida, el dispositivo de toma de muestras comprende placas de múltiples pocillos apiladas de manera desmontable con alta densidad de pocillos para proporcionar un número mayor de posiciones identificables en un volumen menor.

Adquisición de datos y análisis

Se coloca una muestra que contiene muchas semillas en un instrumento de MRI y se realiza un experimento de formación de imágenes usando técnicas de adquisición de datos convencionales. Puede usarse cualquier instrumento para la formación de imágenes por resonancia magnética en esta invención, y puede usarse cualquier experimento de MRI que sea sensible a la característica o rasgo de interés, tal como CSI, SEI o relaxometría. Los instrumentos de MRI preferidos son los que tienen campos magnéticos fuertes, homogéneos superiores a aproximadamente 0,2 teslas. También se prefieren particularmente los instrumentos de MRI clínicos con la bobina de detección construida en la inserción de gradiente de modo que la bobina de detección es mucho mayor que en instrumentos de calidad para investigación, y por consiguiente puede alojar volúmenes de muestra mucho mayores. Los instrumentos de MRI particularmente preferidos son los que tienen un campo magnético fuerte superior a aproximadamente 1 tesla.

Usando un sistema de MRI con un imán de gran calibre, por ejemplo, un instrumento de MRI de investigación mayor o clínico, es posible la discriminación espacial de señales de MRI para semillas individuales. Este enfoque permite analizar grandes números de semillas en un único experimento de MRI. Específicamente, los procedimientos descritos en el presente documento posibilitan que se midan simultáneamente 3456 granos de maíz en menos de 30 minutos. Las semillas oleaginosas preferidas, tales como de soja y colza también pueden examinarse usando procedimientos de MRI de alto rendimiento similares. En cualquiera de las realizaciones anteriores para análisis de muestras, el tiempo para realizar el procedimiento para todo el lote puede ser inferior a 30 minutos, preferiblemente inferior a 20 minutos. Este tiempo de toma de muestras corto da como resultado un rápido rendimiento de muestras con respecto a la técnica anterior y permite un mayor examen de muestras de cosecha dentro de un ciclo de mejora genética. Los tamaños de calibre preferidos son superiores a 20 cm, 30 cm, 40 cm o 50 cm.

En general, el tamaño de la muestra (o número de semillas por cubo de muestra) para análisis de MRI se establece por limitaciones físicas y características de rendimiento del escáner de MRI y el dispositivo de detección de MRI (bobina de RF). Los siguientes factores controlan la sensibilidad en el experimento y consecuentemente tienen un impacto sobre el rendimiento de la muestra: (a) el tamaño de calibre, homogeneidad y fuerza de campo magnético principal, (b) características de respuesta, tamaño y calidad del detector de señales de MRI de RF, y (c) linealidad, homogeneidad y fuerza del gradiente de formación de imágenes.

En una realización preferida, la secuencia de pulsos para el experimento de MRI es una secuencia de eco de espín que permite la detección preferencial de protones en moléculas de hidrocarburo (aceite). En esta realización, la intensidad de señal está relacionada con la cantidad de aceite. Por tanto una imagen particularmente fuerte de una semilla es indicativa de un alto contenido en aceite en esa semilla, mientras que una imagen más débil es indicativa de

un menor contenido en aceite. En una realización alternativa, la secuencia de pulsos para el experimento de MRI es una secuencia de formación de imágenes por desplazamiento químico que permite la detección de todo el espectro RMN de protones en moléculas de hidrocarburo (aceite). En esta realización, el espectro de señales permite deducir el tipo de aceite. Por tanto, puede determinarse la presencia de tipos particulares de aceite tales como aceites poliinsaturados.

Se construye una imagen de la muestra a partir de los datos usando un programa disponible, tal como el programa Varian Imagen-Browser™ (Varian, Inc., Palo Alto, CA). Una imagen de este tipo contiene intensidades de señal de MRI para cada una de las semillas individuales (en un experimento que estudia múltiples semillas). Entonces los datos de imagen pueden procesarse adicionalmente con el fin de cuantificar el rasgo o los rasgos que está(n) estudiándose usando técnicas de análisis de datos conocidas por los expertos en la técnica. Los resultados de todo el análisis pueden visualizarse de un modo de fácil uso, mostrando el análisis de cuantificación del rasgo o de los rasgos que está(n) estudiándose para cada semilla individual en un lote de semillas que está estudiándose.

Dispositivos para analizar semillas

Es un aspecto de la presente invención proporcionar un procedimiento para usar instrumentos de MRI de mayor calibre en el análisis de muestras de baja inductancia, tales como muestras que comprenden semillas. Tal como se detalló anteriormente, los instrumentos de MRI de calidad clínica tienen circuitos de bobina de RF y detección que se ajustan a las muestras que tienen inductancias mayores que las muestras de semillas. En consecuencia, las bobinas deben cargarse o los circuitos deben ajustarse otra vez para que correspondan a las inductancias menores de las muestras de semilla. La etapa de carga puede ser tan simple como colocar una muestra fantasma dentro de la bobina de detección, pero fuera del volumen para el que se forma una imagen. Una muestra fantasma de este tipo puede ser, por ejemplo, un volumen de agua para simular el tejido humano para el que está diseñado el instrumento clínico para formar una imagen. Las muestras fantasma están disponibles de fabricantes de instrumentos clínicos de MRI (por ejemplo, Siemens AG, Erlangen, Alemania; GE Medical Systems, Milwaukee, WI). La alternativa a la carga de la bobina es volver a ajustar el instrumento de detección y los circuitos de RF de modo que las bobinas se vuelvan sensibles a la muestra dada su menor inductancia. Si no se cargan las bobinas, o alternativamente, si no vuelve a ajustarse el circuito, entonces habrá una pérdida drástica de señal provocada tanto por la rotación de magnetización ineficaz por la bobina de RF (es decir, un supuesto pulso de 90° girará la magnetización de la muestra en menos de 90°), como por la detección ineficaz. Si la diferencia entre la inductancia a la que se ajusta el instrumento clínico y la inductancia real dada una muestra tal como diversas semillas es suficientemente grande, no se observará ninguna señal.

Es un aspecto de la presente invención superar las dificultades asociadas con la formación de imágenes de muestras tales como colecciones de semillas usando instrumentos de MRI de calidad clínica y de investigación de mayor calibre. En este aspecto de la invención, se fija la fuerza de campo de gradiente de modo que: (1) el campo de visión (el volumen activo) cubra toda la muestra para la que va a formarse una imagen; (2) se fija el número de capas de imagen bidimensional (horizontal) de modo que el número de capas de imagen multiplicado por el espesor (vertical) de los cortes de la muestra es aproximadamente igual a la altura (vertical) de la muestra; (3) el número de píxeles dentro de cada capa de imagen es suficiente para resolver las semillas con suficientes píxeles para evitar interferencia entre píxeles. Estos tres criterios son determinantes del gradiente de campo a usarse para una muestra arbitraria dentro de un instrumento de MRI arbitrario. Sin embargo, estos deben escogerse particularmente para instrumentos de MRI clínicos y de investigación de mayor calibre, cuyos gradientes de campo no están ajustados de manera apropiada ajustados para formar imágenes de muestras que comprenden muestras tales como semillas. Cada uno de estos tres criterios se discute en más detalle a continuación.

Un primer criterio para determinar los gradientes de campo apropiados es que el campo instrumental de visión debe cubrir toda la muestra para la que va a formarse una imagen. El fin de este criterio es simplemente garantizar que se forman imágenes para todas las semillas en la muestra. También determina las dimensiones en las que los gradientes de campo deben ser sustancialmente lineales.

Un segundo criterio para determinar los gradientes de campo apropiados es que se fija el número de capas de imagen bidimensional de modo que el número de capas de imagen multiplicado por el espesor de los cortes de la muestra es aproximadamente igual a la altura de la muestra. Esto garantiza que se forme una imagen de toda la altura de la muestra. Sorprendentemente, el espesor óptimo de la capas de imagen en general no corresponde al espesor de las semillas para las que va a formarse una imagen. Menos cortes (lo que corresponde a espesores mayores) requieren menos tiempo de formación de imagen y menos tiempo de procesamiento de datos para una cantidad equivalente de información. El mayor espesor práctico debe ser el espesor de una muestra individual para la que va a formarse una imagen, es decir, el espesor de una semilla. Pero éste no es el caso; en vez de esto, el espesor óptimo de las capas de imagen es inferior al espesor de una única semilla. Cuando el espesor de una capa de imagen se fija para ser igual al espesor de una única semilla, los resultados de la formación de imagen son frecuentemente anómalos e impredecibles. En un ejemplo, una muestra de semillas con contenidos en aceite equivalentes dio resultados que oscilan entre ninguna señal en absoluto de algunas de las semillas y una intensidad de señal detectable máxima de otras. Se encontró una solución inesperada para este problema aumentando la fuerza del gradiente de campo, provocando así una disminución en el espesor de corte y un aumento en el número de cortes requeridos para formar una imagen de toda la altura de la muestra. Esta solución estaba en contra del razonamiento porque: (1) es de conocimiento común que la formación de imagen de un volumen menor (tal como se hace mediante la formación de imagen de un corte más fino) da como resultado señales más débiles porque hay menos material contribuyendo a la señal, y (2) la formación de imagen de

cortes más finos requiere la formación de imagen de más cortes con el fin de obtener datos de imagen del mismo volumen, y por tanto el experimento podría llevar más tiempo.

El espesor de corte de imagen óptimo puede determinarse rápida y fácilmente por un experto en la técnica siguiendo estas etapas: (1) obtener una muestra de semillas con contenido en aceite conocido; (2) seleccionar un espesor de corte de imagen de partida; (3) obtener datos de MRI para la muestra de semillas con ese espesor de corte de imagen; (4) comparar el contenido relativo en aceite tal como se mide mediante MRI con respecto al contenido relativo en aceite conocido de las semillas; y (5) si el contenido relativo en aceite de la semilla medido no se corresponde con el contenido relativo en aceite conocido de la semilla, reducir el espesor de corte de imagen y repetir las etapas (3) - (5) hasta que el contenido relativo en aceite tal como se mide mediante MRI se corresponda con el contenido relativo en aceite conocido de las semillas.

Un ejemplo de cómo el espesor de corte de imagen se fija a menos que el espesor de la semilla se muestra en la figura 3. En esa figura, se muestran cortes de imagen posteriores. Los recuadros cuarto, quinto y sexto de la fila superior muestran datos adquiridos de una única capa de semillas. En el análisis final, se combinan estos recuadros en una única imagen (véase la figura 4a). Los datos analizados a partir de la imagen combinada reflejan de manera precisa el contenido relativo en aceite de las semillas en la misma, mientras que un experimento análogo que recoge los datos de toda la capa de semillas en una imagen no lo refleja. En la figura 3, se fijó el espesor de corte a aproximadamente 5 mm. Aunque el espesor de corte óptimo en general depende del espesor de las semillas para las que se forma una imagen, se considera en general que el espesor de corte óptimo es inferior a aproximadamente 1 cm, de manera preferible aproximadamente 5 mm. El espesor de corte óptimo es inferior a aproximadamente el 95% del espesor de las semillas para las que va a formarse una imagen, preferiblemente inferior a aproximadamente el 80% del espesor de semilla y lo más preferiblemente de manera aproximada el 75% del espesor de semilla. El espesor de corte tendría que determinarse independientemente basándose en los tamaños de las semillas para las que va a formarse una imagen. Puede determinarse un límite inferior en el que una reducción adicional en el espesor de corte no es necesaria.

Un tercer criterio para determinar los gradientes de campo apropiados es que el número de píxeles dentro de cada capa de imagen debe ser suficiente para resolver las semillas en píxeles suficientes para evitar interferencia entre píxeles. La interferencia entre píxeles se produce cuando un píxel de imagen contiene datos derivados de señales de más de una semilla. Los objetivos conflictivos para este criterio son minimizar el número de píxeles requeridos para formar una imagen de una capa, minimizando así la cantidad de tiempo requerido para adquirir datos de una capa, pero tener un número suficiente de píxeles para evitar interferencia entre píxeles. Si el número de píxeles es insuficiente para evitar la interferencia entre píxeles, entonces los datos para cualquier semilla particular se contaminarán con los datos correspondientes a las semillas adyacentes, y por tanto se reduce la exactitud para mediciones de características tales como contenido relativo en aceite. El número de píxeles óptimo requerido para formar una imagen de una capa depende de la densidad de semillas en la capa y el tamaño de las semillas, requiriendo las densidades mayores y semillas menores más píxeles, y de un parámetro relacionado, la separación de las semillas. Si la distancia entre semillas es aproximadamente igual al tamaño de las semillas, entonces un número de píxeles óptimo proporcionaría aproximadamente cuatro píxeles entre las semillas, y por tanto dos píxeles para representar una dimensión de la semilla en el plano de la imagen (para un total de dos píxeles para cada dimensión, o cuatro píxeles). El número de píxeles por capa de imagen debe ser suficiente para representar una única semilla entre 1 píxel y 40 píxeles, preferiblemente entre 1 píxel y 20 píxeles, y lo más preferiblemente entre 4 píxeles y 10 píxeles.

Procedimientos para analizar y clasificar semillas

El análisis de semillas descrito anteriormente puede coordinarse con un dispositivo de clasificación que clasifica y/o pesa cada semilla individualmente. En esta realización, el dispositivo de toma de muestras tiene particiones para separar las semillas individuales en celdas. El fondo del dispositivo de toma de muestras comprende puertas que pueden abrirse de manera diferencial para liberar cualquiera de o todas las semillas, dependiendo de los criterios de selección programados. Como alternativa, el dispositivo de clasificación puede comprender paletas móviles controlables de manera diferencial para cada celda en el dispositivo de toma de muestras, permitiendo de esta manera la descarga simultánea de las semillas en el dispositivo de clasificación.

Procedimientos para analizar múltiples rasgos

Puede extraerse la información química cuantitativa para la muestra de los datos espectrales recogidos en un experimento de MRI. Se conoce bien que los protones en las moléculas orgánicas poliatómicas contenidas en los materiales biológicos muestran desdoblamientos y desplazamientos químicos característicos basados en sus grupos funcionales locales y en los protones cercanos. Mediante el uso de la formación de imágenes del desplazamiento químico, puede medirse un espectro de RMN completo para cada elemento de volumen dentro de la muestra. Tales mediciones proporcionan enormes cantidades de información acerca de cada semilla dentro de la muestra. Cuando se usa como un sistema de formación de imágenes espectral, la presente invención proporciona muchas ventajas. Dado que los datos espectrales pueden recogerse de cada unidad de la muestra, pueden obtenerse datos más precisos para las muestras de cereales a granel.

Aunque las realizaciones ilustradas de la presente invención incluyen la resonancia magnética nuclear en la región espectral de radiofrecuencia, podrían usarse otras regiones espectrales, tales como las regiones de microondas, por ejemplo, en un experimento de resonancia de espín electrónico. Además, tal como conocen los expertos en la técnica,

pueden usarse otros núcleos además de los protones en los experimentos de resonancia magnética incluyendo los experimentos de formación de imágenes por resonancia magnética. Tales núcleos incluyen ^{13}C , ^{14}N , ^{15}N , ^{17}O , ^{19}F , ^{31}P y ^{35}Cl .

En una realización alternativa de la invención, pueden usarse múltiples técnicas de formación de imágenes por pulsos o procedimientos de retroproyección conocidos por los expertos en la técnica de resonancia magnética de estado sólido en un experimento de MRI para cuantificar características distintas al contenido en aceite o agua. En esta realización, pueden medirse los componentes de los tejidos vegetales, incluyendo, pero sin limitarse a, proteínas, hidratos de carbono, lignina, celulosa, fibra detergente ácida, fibra detergente neutra y almidón hidratado.

Los procedimientos de la presente invención pueden usarse para detectar cualquier rasgo que pueda medirse mediante resonancia magnética. En una realización preferida, el rasgo es un rasgo bioquímico. Tal como se usa en el presente documento, un rasgo bioquímico es cualquier rasgo que afecta a la composición química de la muestra agrícola. En una realización, el rasgo bioquímico se selecciona del grupo constituido por contenido en aceite, contenido en proteínas, contenido en hidratos de carbono, contenido en almidón, contenido en fibras y contenido en agua. Tal como se usa en el presente documento, contenido se refiere a la cantidad de un componente, por ejemplo 5 miligramos (mg) por semilla de proteína o 5 mg de proteína por 10 gramos de peso seco de tejido. En otra realización preferida, el rasgo bioquímico se selecciona del grupo constituido por composición de aceite, composición de proteínas, composición de hidratos de carbono y composición de fibras. Tal como se usa en el presente documento, composición se refiere a los constituyentes bioquímicos de una muestra agrícola, por ejemplo, la proporción de proteínas de alto peso molecular a proteínas de bajo peso molecular o la proporción de aceites saturados a aceites no saturados. Pueden determinarse características específicas tales como la composición de aceite en la presente invención mediante el uso del experimento de formación de imágenes por desplazamiento químico (CSI), en el que cada vóxel de la imagen tridimensional contiene un espectro de resonancia magnética nuclear de la materia en la región de la muestra que corresponde a ese vóxel. Por tanto, basándose en el espectro de RMN, puede determinarse el tipo particular de aceite. El rasgo más preferido que va a analizarse mediante los procedimientos de la invención es el contenido relativo en aceite de las semillas.

En una realización, se usan los procedimientos de la presente invención para diferenciar muestras de almidón con fenotipos deseables. El almidón del maíz duro o dentado normal está compuesto de aproximadamente el 73% de amilopectina (la fracción del almidón con moléculas ramificadas) y el 27% de amilosa (la fracción con moléculas lineales). El maíz céreo (que tiene el gen *wx*) se encontró por primera vez en China, pero también se han encontrado mutaciones *waxy* en cepas dentadas americanas. El almidón de este mutante es un 100% de amilopectina. El extendedor de amilosa (*ae*) mutante del endospermo aumenta la fracción de amilosa del almidón hasta el 50% y superior. El grano de este maíz se caracteriza por un aspecto sin lustre, translúcido y parcialmente lleno. Otros genes mutantes diversos, solos o bien en combinación, afectan a la composición del almidón cambiando la proporción de amilosa-amilopectina. El gel de almidón opaco firme característico producido por el maíz común se atribuye a la fracción de amilosa. Las propiedades del almidón del maíz céreo son el resultado de los soles de amilopectina producidos que tienen una forma de pasta translúcida blanda característica. Estas diferencias en las características del gel de almidón natural se mantienen a través de los procesos de modificación del almidón y son deseables en ciertas aplicaciones. Los procedimientos de la presente invención pueden distinguir fácilmente los tipos de mutantes diferentes y puede usarse como una técnica de examen no destructiva, de alto rendimiento, para ellos.

En otra realización, por ejemplo, se usan los procedimientos de la presente invención para identificar muestras que tienen los rasgos de endospermo deseados. Por ejemplo, se han identificado varios mutantes de endospermo que alteran el equilibrio de los aminoácidos. Se ha mostrado que las líneas mutantes opaque-2 (*o2*), floury-2 (*fl2*) y opaque-7 (*o7*) tienen zeínas reducidas (la proteína en el maíz que carece de aminoácidos esenciales tales como lisina y triptófano) en el endospermo y lisina aumentada. Los granos con el gen opaque-2 se caracterizan por un aspecto blando, terroso, no transparente, con muy poco endospermo vítreo duro. Los procedimientos de la presente invención pueden usarse para distinguir los diferentes tipos de mutantes y los niveles de lisina, y por tanto pueden usarse como una técnica de examen no destructiva, de alto rendimiento, para este rasgo.

En otra realización, el rasgo es un rasgo morfológico. Tal como se usa en el presente documento, un rasgo morfológico es cualquier rasgo estructural. Los rasgos morfológicos preferidos son el tamaño del endospermo, el tamaño del germen, la forma de la semilla, el tamaño de la semilla, el color de la semilla, la textura superficial de la semilla, el peso de la semilla, la densidad de la semilla y la integridad de la semilla. La integridad de la semilla puede estar correlacionada con la resistencia o la propensión a la enfermedad. La presencia de orificios dentro de una cubierta de semilla a menudo es indicativa de infección por insectos.

Puede establecerse la correlación de un estado patológico con un cambio estructural, tal como orificios, exponiendo muestras de la semilla para someterlas a prueba con el organismo. Tal como se usa en el presente documento, una "muestra" se refiere a una pluralidad de semillas. Los controles pueden incluir semillas que se sabe que son propensas y resistentes. Puede establecerse la correlación de la enfermedad con un cambio estructural particular mediante un análisis estadístico apropiado. Se entiende que no es necesario controlar de nuevo una semilla particular o un lote de semillas una vez que se ha establecido una correlación.

Pueden analizarse simultáneamente uno o más de los rasgos descritos anteriormente o cualquier otro rasgo que puede detectarse usando la formación de imágenes por resonancia magnética usando los procedimientos de la presente

invención. En una realización, se analizan simultáneamente dos o más de los rasgos anteriores u otros rasgos. En otra realización, se analizan simultáneamente tres, cuatro, cinco o más de los rasgos anteriores u otros rasgos que pueden medirse mediante MRI.

5 *Sistemas analíticos*

Puede prepararse una muestra para análisis con un sistema de formación de imágenes espectroscópicas con un dispositivo de procesamiento. Tal como se usa en el presente documento, un “dispositivo de procesamiento” es cualquier dispositivo que puede separar la porción deseada de una planta del resto de la planta o parte de la planta. En una
10 realización preferida, el dispositivo de procesamiento es una desgranadora, una trilladora o una cosechadora-trilladora. La desgranadora puede ser, por ejemplo, una desgranadora de mazorca individual modificada de Almaco (Almaco, 99 M Avenue, P. O. Box 296, Nevada, IA 50201). Tal como se usa en el presente documento, “producir una muestra” se refiere a cualquier procedimiento en el que podría usarse un dispositivo de procesamiento para separar la porción deseada de una planta del resto de la planta o parte de la planta.

15 Una vez preparada la muestra con el dispositivo de procesamiento, se analiza mediante formación de imágenes por resonancia magnética. Tras el análisis de MRI, la muestra puede clasificarse automáticamente con un dispositivo de clasificación.

20 Tal como se usa en el presente documento, un “dispositivo de clasificación” es cualquier dispositivo que puede separar la muestra en al menos dos silos diferentes dependiendo de los resultados del análisis. Un dispositivo de clasificación puede ser, por ejemplo, una única paleta móvil que dirige la muestra en una de dos direcciones. En una realización preferida, un dispositivo de clasificación puede clasificar independientemente 10, 20, 50 ó 100 semillas individuales. Tal como se usa en el presente documento, un “silo” es cualquier dispositivo que puede contener una
25 porción de una muestra separada de otras porciones.

En una realización preferida, el dispositivo de clasificación puede clasificar un único lote de semillas en uno de una multiplicidad de silos. Este tipo de clasificación es el más útil si se está examinando más de un único rasgo durante el análisis.

30 En una realización preferida, un dispositivo de procesamiento y un dispositivo de clasificación están acoplados a un dispositivo de toma de muestras y un sistema de formación de imágenes espectroscópicas para proporcionar un dispositivo para proporcionar automáticamente una muestra, analizar una muestra y clasificar una muestra. En una realización preferida, puede proporcionarse, analizarse y clasificarse una muestra más rápido de una vez cada 5 minutos, más preferiblemente más rápido de una vez cada minuto.

Procedimientos de mejora genética selectiva basados en los rasgos analizados

La presente invención proporciona procedimientos analíticos para analizar semillas que tiene un rasgo deseado.
40 En un aspecto de la invención, los procedimientos analíticos permiten analizar porciones o atributos diferenciados de una única semilla. Además, en otro aspecto de la presente invención, los procedimientos analíticos permiten analizar semillas individuales que están presentes en un lote o una muestra a granel, de manera que puede determinarse una distribución de una característica. De particular interés es el uso de la presente invención para analizar el contenido en aceite de las semillas.

45 El procedimiento de la introgresión de un rasgo en una planta según la presente invención puede usarse en combinación con cualquier metodología de mejora genética y puede usarse para seleccionar una única generación o para seleccionar múltiples generaciones. La elección del procedimiento de mejora genética depende del modo de reproducción de la planta, de la heredabilidad del/de los rasgo(s) que está(n) mejorándose y del tipo de variedad hortícola usada comercialmente (por ejemplo, variedad hortícola híbrida F1, variedad hortícola de línea pura, etc.). A continuación se exponen enfoques seleccionados, no limitantes, para la mejora genética plantas. Se entiende además que puede utilizarse cualquier variedad hortícola comercial y no comercial en un programa de mejora genética. Los factores tales como, por ejemplo, el vigor en la emergencia, el vigor vegetativo, la tolerancia al estrés, la resistencia a la enfermedad, la ramificación, la floración, el arraigo de la semilla, el tamaño de la semilla, la densidad de la semilla, la capacidad
50 para mantenerse erguida y la facilidad de trillado, etc. dictarán generalmente la elección. Para los rasgos altamente heredables, será eficaz una elección de plantas individuales superiores evaluadas en una única ubicación, mientras que para los rasgos con baja heredabilidad, la selección debe basarse en los valores medios obtenidos de evaluaciones repetidas de familias de plantas relacionadas. Los procedimientos de selección populares incluyen comúnmente, pero sin limitarse a, selección genealógica, selección genealógica modificada, selección de masa y selección recurrente. En
55 una realización preferida, se acomete un programa de mejora genética recurrente o de retrocruzamiento.

La complejidad de la herencia influye en la elección del procedimiento de mejora genética. Puede usarse la mejora genética por retrocruzamiento para transferir uno o algunos genes favorables para un rasgo altamente heredable en una variedad hortícola deseable. Este enfoque se ha usado ampliamente para mejorar genéticamente variedades hortícolas resistentes a enfermedades. Se usan diversas técnicas de selección recurrente para mejorar los rasgos heredados cuantitativamente controlados por numerosos genes. El uso de la selección recurrente en cosechas de autopolinización depende de la facilidad de la polinización, de la frecuencia de híbridos satisfactorios a partir de cada polinización y del número de descendientes híbridos a partir de cada cruce satisfactorio.

Las líneas de mejora genética pueden someterse a prueba y compararse con patrones apropiados en entornos representativos de la(s) zona(s) objetivo comercial/comerciales para dos o más generaciones. Las mejores líneas son candidatas para nuevas variedades hortícolas comerciales; las que todavía son deficientes en los rasgos puede usarse como progenitoras para producir nuevas poblaciones para la selección adicional.

Un procedimiento de identificación de una planta superior es observar su rendimiento con respecto a otras plantas experimentales y a una variedad hortícola patrón que se ha hecho crecer ampliamente. Si una única observación no es concluyente, las observaciones repetidas pueden proporcionar una mejor estimación de su valor genético. Un fitotecnista puede seleccionar y cruzar dos o más líneas parentales, seguido por autofecundación y selección repetidas, produciendo muchas combinaciones genéticas nuevas.

El desarrollo de nuevas variedades hortícolas de soja conlleva el desarrollo y la selección de variedades de soja, el cruzamiento de estas variedades y la selección de los cruces híbridos superiores. La semilla híbrida puede producirse mediante cruces manuales entre progenitores fértiles machos seleccionados o mediante el uso de sistemas de esterilidad en machos. Se seleccionan los híbridos para ciertos rasgos genéticos únicos tales como color de la vaina, color de la flor, producción de semillas, color de la pubescencia o resistencia a los herbicidas que indican que la semilla es verdaderamente un híbrido. Otros datos sobre las líneas parentales, así como el fenotipo del híbrido, influyen en la decisión del fitotecnista sobre si continuar con el cruce híbrido específico.

Los procedimientos de mejora genética por selección recurrente y mejora genética por selección genealógica pueden usarse para desarrollar variedades hortícolas de las poblaciones de mejora genética. Los programas de mejora genética combinan los rasgos deseables de dos o más variedades hortícolas o diversas fuentes generales en conjuntos de mejora genética a partir de los cuales se desarrollan variedades hortícolas mediante autofecundación y selección de los fenotipos deseados. Pueden evaluarse las variedades hortícolas nuevas para determinar cuáles tienen potencial comercial.

La mejora genética por selección genealógica se usa comúnmente para la mejora de cosechas de autopolinización. Se cruzan dos progenitores que poseen rasgos complementarios favorables, para producir una F1. Se produce una población F2 mediante la autofecundación de una o varias F1. Se realiza la selección de los mejores individuos en las mejores familias. Las pruebas repetidas de las familias pueden comenzar en la generación F4 para mejorar la eficacia de la selección para los rasgos con baja heredabilidad. En una fase avanzada de endogamia (es decir, F6 y F7), se someten a prueba las mejores líneas o mezclas de líneas fenotípicamente similares para la liberación potencial de nuevas variedades hortícolas.

Se ha usado la mejora genética por retrocruzamiento para transferir genes para un rasgo altamente heredable, heredado simplemente, en una línea endogámica o variedad hortícola homocigótica deseable, que es el progenitor recurrente. La fuente del rasgo que va a transferirse se denomina el progenitor donante. Se espera que la planta resultante tenga los atributos del progenitor recurrente (por ejemplo, variedad hortícola) y el rasgo deseable transferido desde el progenitor donante. Tras el cruzamiento inicial, se seleccionan los individuos que poseen el fenotipo del progenitor donante y se cruzan repetidamente (se someten a retrocruzamiento) con el progenitor recurrente. Se espera que el progenitor resultante tenga los atributos del progenitor recurrente (por ejemplo, variedad hortícola) y el rasgo deseable transferido desde el progenitor donante.

El procedimiento de descendencia por semilla única se refiere a plantar una población segregante, recolectar una muestra de una semilla por planta y usar la muestra de una semilla para plantar la siguiente generación. Cuando se ha hecho avanzar a la población desde F2 hasta el nivel deseado de endogamia, se realizará en cada caso un seguimiento de las plantas de las que provienen las líneas hasta los diferentes individuos F2. El número de plantas en una población disminuye cada generación debido al fallo de algunas semillas al germinar o de algunas plantas para producir al menos una semilla. Como resultado, no todas las plantas F2 tomadas como muestra originalmente en la población estarán representadas por una progeñie cuando se complete el avance de la generación.

En un procedimiento por múltiples semillas, por ejemplo, los fitotecnistas de soja recolectan comúnmente una o más vainas de cada planta en una población y las trillan juntas para formar un producto a granel. Parte del producto a granel se usa para plantar la siguiente generación y parte se deja en reserva. El procedimiento se ha denominado técnica de descendencia por semilla única modificada o de vainas a granel.

El procedimiento por múltiples semillas se ha usado para ahorrar trabajo en la recolección. Es considerablemente más rápido trillar vainas con una máquina que extraer una semilla de cada una a mano para el procedimiento por semilla única. El procedimiento por múltiples semillas también posibilita plantar el mismo número de semillas de una población en cada generación de endogamia.

En una realización, la presente invención se usa para diferenciar muestras haploides de muestras no haploides. El uso de plantas haploides aumenta la eficacia de la selección recurrente en programas de mejora genética de plantas proporcionando una forma para producir líneas completamente homocigóticas de líneas haploides dobles. Dado que los haploides son hemicigóticos, es decir, solamente un alelo por locus, son útiles para estudios de mutación y selección frente a alelos recesivos indeseables. Los procedimientos de la presente invención pueden usarse para discriminar muestras haploides de otros tipos de muestras, tales como diploides. Con los procedimientos de la presente invención puede determinarse cualquier rasgo haploide que produzca un fenotipo que produzca luz reflejada o transmitida que

tiene una composición espectral diferente a la de una muestra no haploide. Por ejemplo, algunas líneas parentales portan genes marcadores tales como R-nj, lo que permite identificar los haploides en la fase de semillas maduras mediante la coloración con antocianina de la parte superior del endospermo y la falta de coloración en el embrión. Los procedimientos de la presente invención pueden distinguir fácilmente la presencia o ausencia de estos fenotipos en la ubicación requerida en la semilla.

Pueden encontrarse descripciones de otros procedimientos de mejora genética que se usan comúnmente para diferentes rasgos y cosechas en uno de varios libros de referencia. Véase, por ejemplo, Fehr, *Principles of Cultivar Development* Vol. 1, págs. 2-3 (1987).

En una realización preferida, el rasgo de mejora genética de interés son los niveles o la composición de aceite. En una realización incluso más preferida, la planta que se somete a un programa de mejora genética es una planta de maíz y el rasgo de interés son los niveles de aceite.

Los siguientes ejemplos son solamente ilustrativos. No se pretende que la presente invención se limite a las realizaciones ilustrativas.

Ejemplo 1

Se obtienen imágenes de granos de maíz usando un escáner Magnetom™ Vision MR de 1,5 teslas (Siemens, Erlangen) usando el resonador de cuerpo completo convencional. La resistencia en gradiente se fija a 25 mT/m en todos los ejes. Con el reforzador de gradiente, el tiempo en rampa de resistencia completa fue de 312 ms. Las capacidades de gradiente completo del gradiente fijadas no se usan en la secuencia de formación de imágenes de las semillas. Se usa una secuencia de eco de espín (tr/te = 1920/17 ms) con un ángulo de giro de excitación de 90° y un ángulo de giro de reorientación de 180°. El ancho de banda del receptor es 130 Hz/píxel. El campo visual se fija a 450 x 450 mm. La matriz de datos obtenida es de 256 x 256. Las imágenes obtenidas de cada cubo de muestra están constituidas por 50 cortes coronales continuos, adquiridos usando la opción intercalada, colocados de manera que haya al menos un corte que no lleve muestra entre cada capa de muestras en el cubo. Para los patrones de calibración del aceite de maíz, se obtienen dos exploraciones, con la ganancia de receptor fijada a 97,98 dB y el factor de escala FFT fijado a 0,1. Para las muestras de semillas de maíz, se obtienen cuatro exploraciones, con la ganancia de receptor fijada a 116,98 dB y el factor de escala FFT fijado a 0,007114.

Los cubos de muestra para el análisis por MRI de las semillas de maíz en estos experimentos contienen 108 placas de 24 pocillos. Éstas están dispuestas en 9 capas de 12 placas cada una. Esta disposición proporciona una capacidad analítica total de 2592 semillas únicas de maíz por cubo de muestra.

Análisis del error

La exactitud y la precisión para el análisis de alto rendimiento del contenido en aceite usando MRI se resumen y puede seguirse usando los gráficos de las figuras 8-12. En general, los procedimientos de MRI son los más útiles para las semillas oleaginosas que contienen más del 1% de aceite en peso, aunque estos procedimientos también son útiles para las semillas oleaginosas que contienen menos del 1% de aceite en peso. Las semillas con niveles de aceite inferiores generan intensidades de señal inferiores. Puede mejorarse la sensibilidad de la técnica para detectar contenidos en aceite inferiores, por ejemplo, disminuyendo el límite umbral, aumentando los tiempos de toma de muestras de los datos (o la sensibilidad) o mejorando de otra manera el rendimiento de escáner de MRI.

Comparación con las mediciones a granel. El promedio del contenido en aceite de un gran grupo de semillas determinado usando MRI debe correlacionarse con el contenido en aceite a granel para las semillas medido usando una técnica alternativa, por ejemplo, espectroscopia IR. Esta correlación se ilustra en la figura 8, que muestra una fuerte concordancia entre los dos procedimientos: $y = 1,0322x + 1,9726$; $R^2 = 0,9232$. Dado que los resultados del aceite por RMN se notifican como índices relativos, estos valores son inferiores (en una desviación constante) a los resultados obtenidos a partir de la medición del aceite a granel. Se esperan índices de MRI relativos inferiores debido a la pérdida de señal atribuida a los procesos de relajación que se sabe que se producen en el experimento de MRI.

Comparaciones dentro de un día y entre días en las mediciones de aceite por MRI. Los datos obtenidos usando los procedimientos de MRI deben correlacionarse para diferentes pruebas de la misma muestra, ya se adquieran los datos en el mismo día o en días diferentes. Estas comparaciones del mismo día y días diferentes para un patrón de calibración de aceite de maíz se muestran en las figuras 9 y 10, respectivamente. Estos datos muestran una buena correlación para múltiples pruebas de una misma muestra en ambos casos (mismo día: $y = 1,0007x$, $R^2 = 0,9267$; días diferentes: $y = 0,9992x$; $R^2 = 0,8435$).

Variación en la medición por MRI usando instrumentación diferente. La bobina de detección de RF de la señal de MRI es el componente principal del hardware que afecta a la sensibilidad o a la proporción señal-ruido en el experimento de MRI. Cada bobina de RF posee un perfil de rendimiento que es característico de su construcción y geometría física. Pueden compararse los resultados obtenidos en dos dispositivos diferentes para confirmar la reproducibilidad entre dos disposiciones de hardware. Una comparación de este tipo se muestra en la figura 11 para una bobina de detección de MRI Varian (Varian, Inc., Palo Alto, CA) y Monsanto (Monsanto, St. Louis, MO) usando una muestra

ES 2 308 758 T3

de aceite patrón. Ambos detectores producen resultados esencialmente idénticos para la intensidad de señal de MRI integrada ($y = 1,0413x - 0,1725$; $R^2 = 0,9452$) en una cantidad de aceite de maíz medida en la muestra patrón.

Coeficiente de variación para los procedimientos de MRI. El coeficiente de variación para los datos de MRI medidos para cada capa en un cubo de muestra proporciona una estimación razonable del error en la medición de MRI. En la figura 12 se muestra un mapa para cada una de las nueve capas en uno de los cubos patrón de calibración, que representa la desviación estándar en porcentaje ($N = 8$) con respecto a la media para cada posición de pocillo en el cubo. Aproximadamente el 90% de las posiciones de los pocillos en la mayoría de las capas muestra menos de un 5% de error, y las posiciones restantes muestran un 5-10%. Un par de posiciones, por ejemplo, la esquina superior izquierda en la capa 1, muestran un error superior al 10%. Pueden esperarse errores superiores cerca de las esquinas del cubo con respecto al centro del cubo, donde la homogeneidad del campo magnético y la respuesta de la señal de MRI están degradadas.

Ejemplo 2

Se cargan bandejas de muestra de 48 pocillos con semillas oleaginosas incluyendo maíz, soja y colza. Se colocan dos pilas de 5 placas que contienen semillas individuales en portamuestras de plexiglás para obtener una matriz comprende un total de 480 semillas. Se inserta una matriz de semillas en una bobina de detección de MRI comercialmente disponible que es lo suficientemente grande como para alojar el portamuestras. Se inserta una bobina de MRI que contiene las semillas en el imán de MRI para la recogida de datos usando técnicas de adquisición de datos convencionales, no registradas. Los datos de MRI se envían a un ordenador en el que se procesan usando un macro a medida en un programa Varian Image-Browser™ (Varian, Inc., Palo Alto, CA) para obtener intensidades de señal de MRI para cada uno de los granos de maíz individuales en la muestra. Los datos resultantes se usan para calcular el porcentaje de aceite en peso en cada una de las 480 semillas dentro de la muestra.

Ejemplo 3

Se usa un escáner de MRI de calidad médica de 1,5 teslas para analizar una muestra de 3456 semillas organizadas en 12 capas de 12 bandejas de 24 pocillos. El experimento se lleva a cabo según el protocolo explicado en el ejemplo 2, anteriormente.

Ejemplo 4

Se usa el contenido en aceite de granos de maíz tal como se determina mediante el protocolo descrito anteriormente para mejorar genéticamente plantas de maíz con contenido en aceite superior. LH185(2) x BHO es el material fuente para la generación 1. Se plantó esta semilla y se usó la planta resultante como hembra en el programa de mejora genética. Esta planta se cruzó mediante reservas de inducción haploide que incluían la reserva 6 y KHI1. La semilla producida se recolecta y se seca. Con la ayuda de un sistema marcador para identificar supuestos granos haploides (sistema R-Navajo), se aíslan las semillas haploides de la semilla producida. Se analiza entonces esta semilla usando el procedimiento explicado anteriormente en el ejemplo 1 para identificar las semillas con el mayor contenido en aceite. Sólo se hacen avanzar a la siguiente generación las semillas con el mayor contenido en aceite. En la generación 2, estos granos se plantan y se tratan con un agente de duplicación de cromosoma para producir líneas endogámicas dihaploides.

Ejemplo 5

Se plantan las semillas de las plantas que resultan del ejemplo 4 y se polinizan las plantas resultantes con KHI1. Tras la recolección y el secado, se seleccionan los supuestos granos haploides usando el sistema de marcador seleccionable R-Navajo. Estos granos se colocan en placas de 24 pocillos y se analizan usando MRI tal como en el ejemplo 1 para determinar el contenido en aceite. Se seleccionan y se plantan los granos con el mayor contenido en aceite. Las plantas resultantes se tratan con un agente de duplicación y se autopolinizan para crear líneas endogámicas dihaploides.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de introgresión de un rasgo en una planta, que comprende:

- (a) obtener una muestra que comprende una pluralidad de semillas;
- (b) proporcionar cada una de dichas semillas en su propio compartimento individual de un dispositivo de toma de muestras que comprende una pluralidad de compartimentos;
- (c) generar una imagen de resonancia magnética de dicha muestra;
- (d) analizar dicha imagen de resonancia magnética para semillas que muestran dicho rasgo;
- (e) determinar si las semillas en dicha muestra muestran dicho rasgo basándose en dicho análisis;
- (f) seleccionar al menos una semilla de dicha muestra que muestra dicho rasgo;
- (g) hacer crecer una planta fértil a partir de la al menos una semilla seleccionada; y
- (h) utilizar la planta fértil como progenitor en un cruce con otra planta.

2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el rasgo es el contenido relativo en aceite.

3. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el rasgo es la composición de aceite.

4. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que se obtiene la imagen de resonancia magnética usando un instrumento de formación de imágenes por resonancia magnética que tiene un tamaño de calibre superior a 20 cm.

5. El procedimiento según la reivindicación 4, en el que el tamaño de calibre es superior a 30 cm.

6. El procedimiento según la reivindicación 5, en el que el tamaño de calibre es superior a 40 cm.

7. El procedimiento según la reivindicación 6, en el que el tamaño de calibre es superior a 50 cm.

Grano de maíz

Análisis por MRI de múltiples semillas editado para aceite

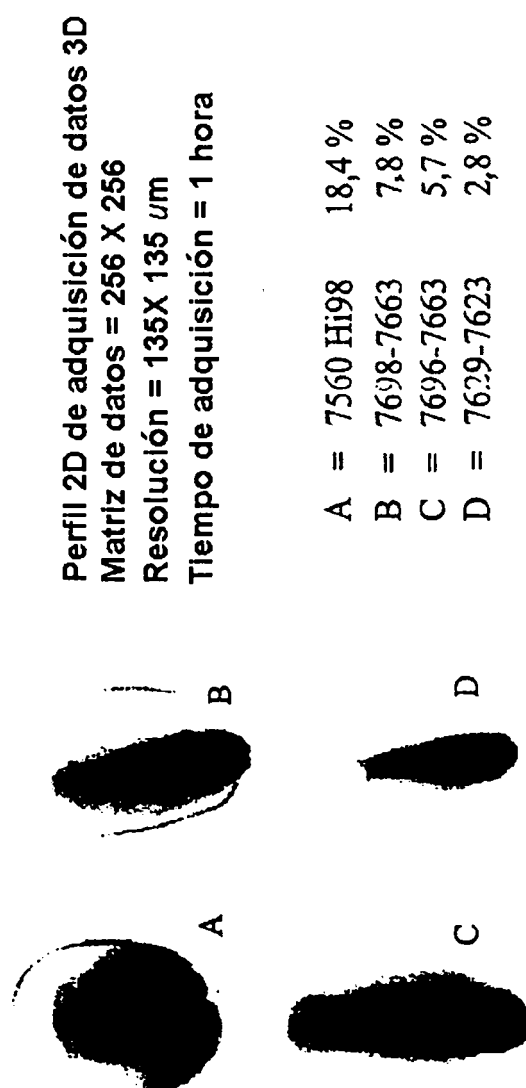


Figura 1

Análisis de datos de MRI de semillas de maíz

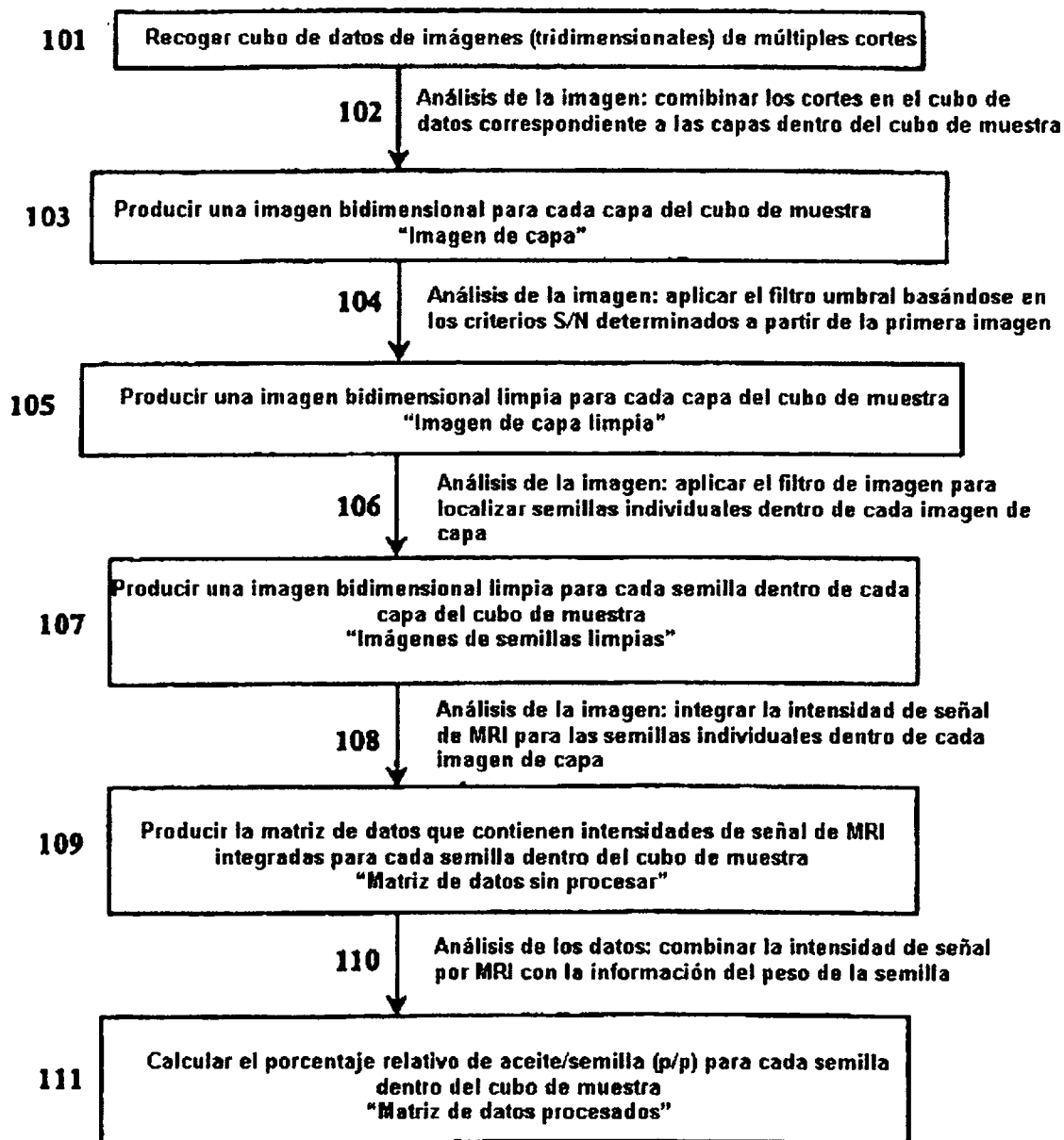


Figura 2

“Cubo de datos” de imagen de 50 cortes

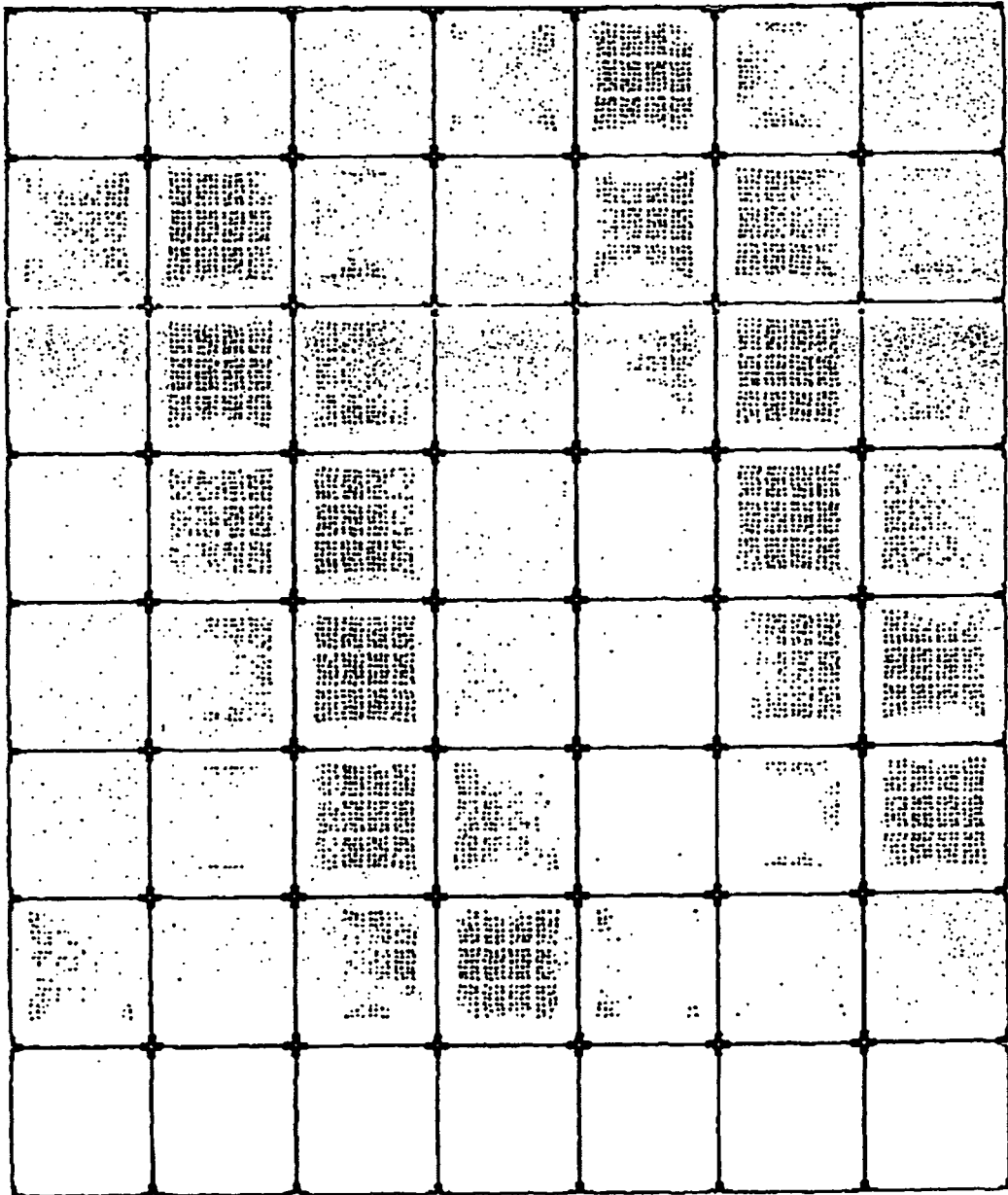


Figura 3

Imagen de capa

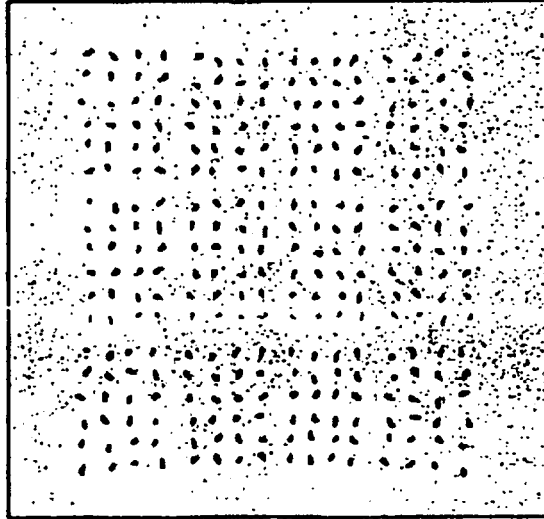


Figura 4a

Imagen de capa "limpia"

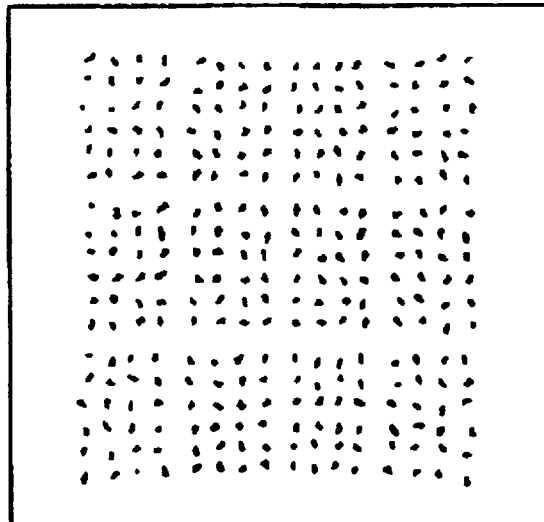


Figura 4b

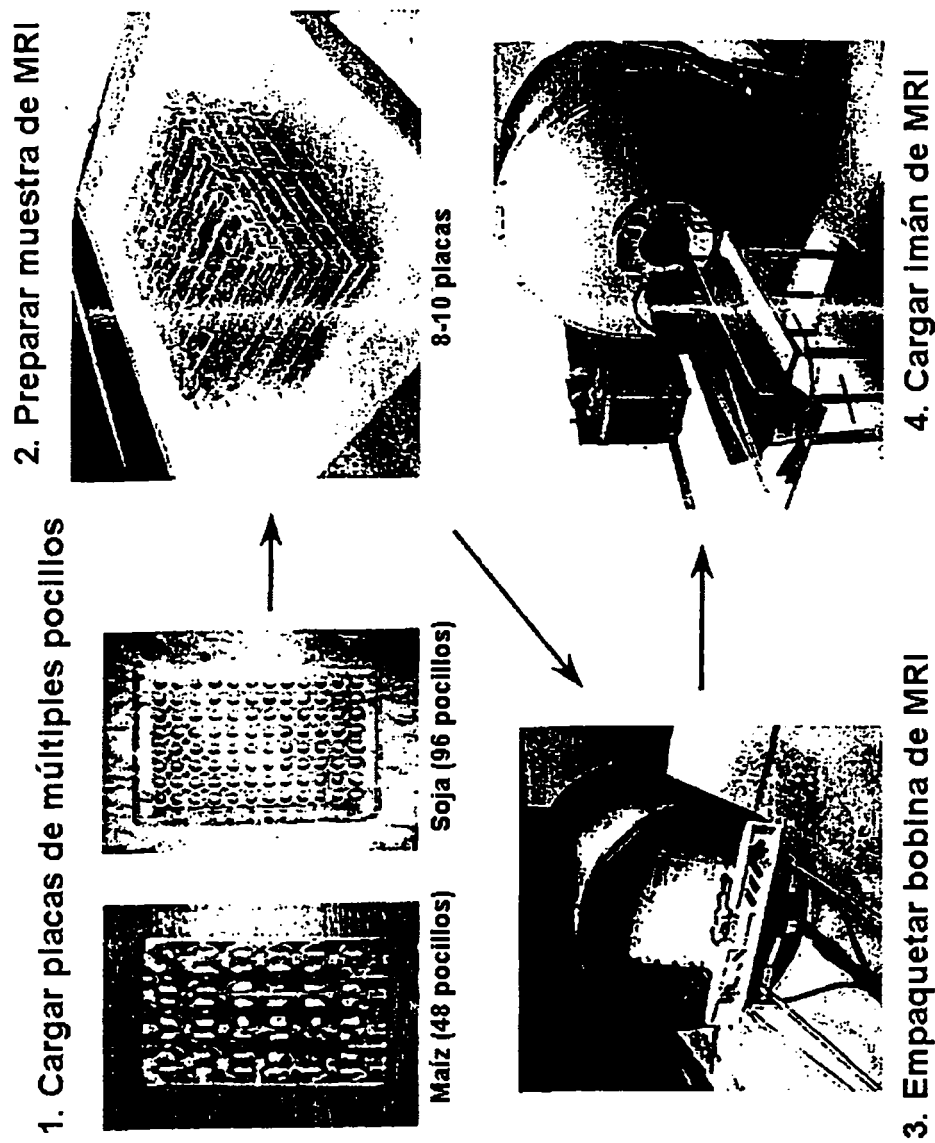
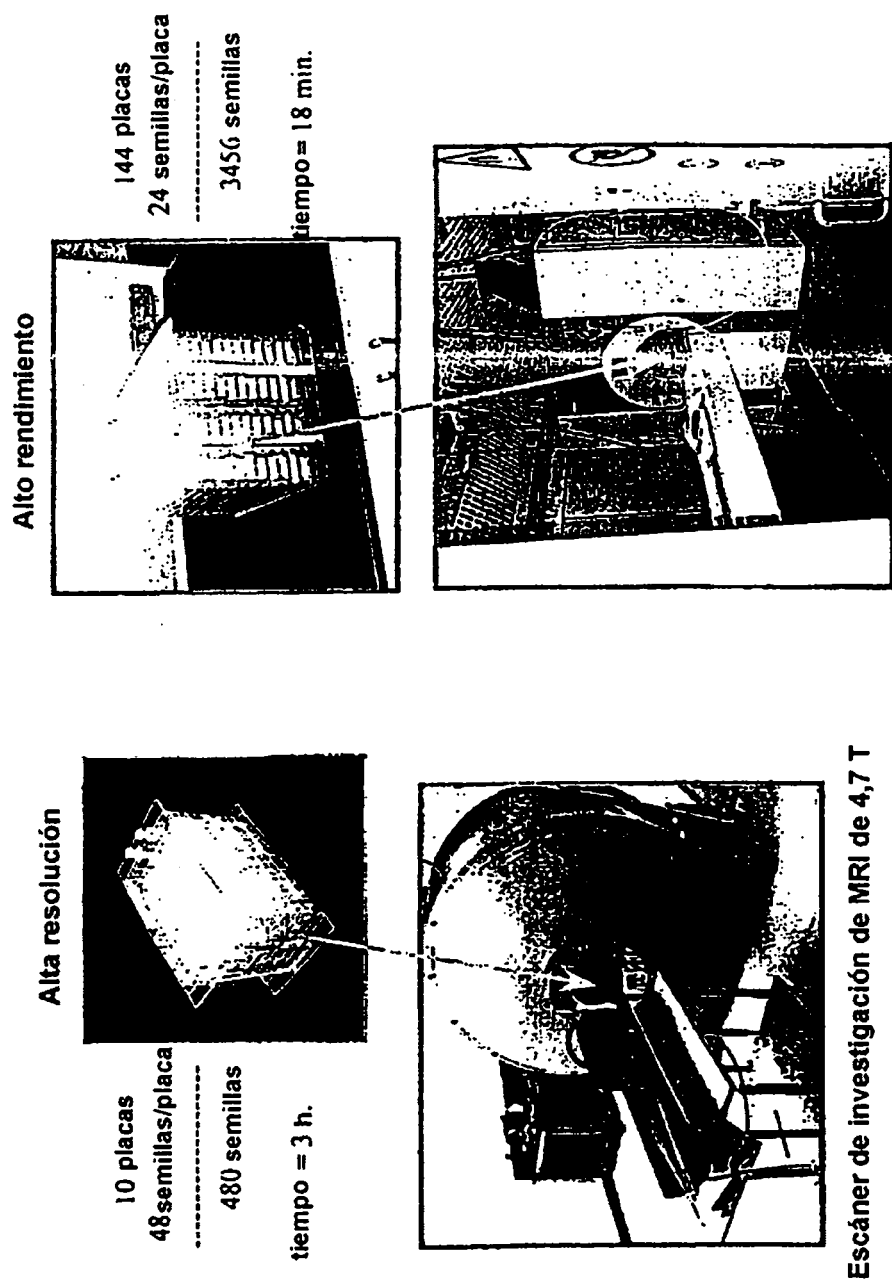


Figura 5



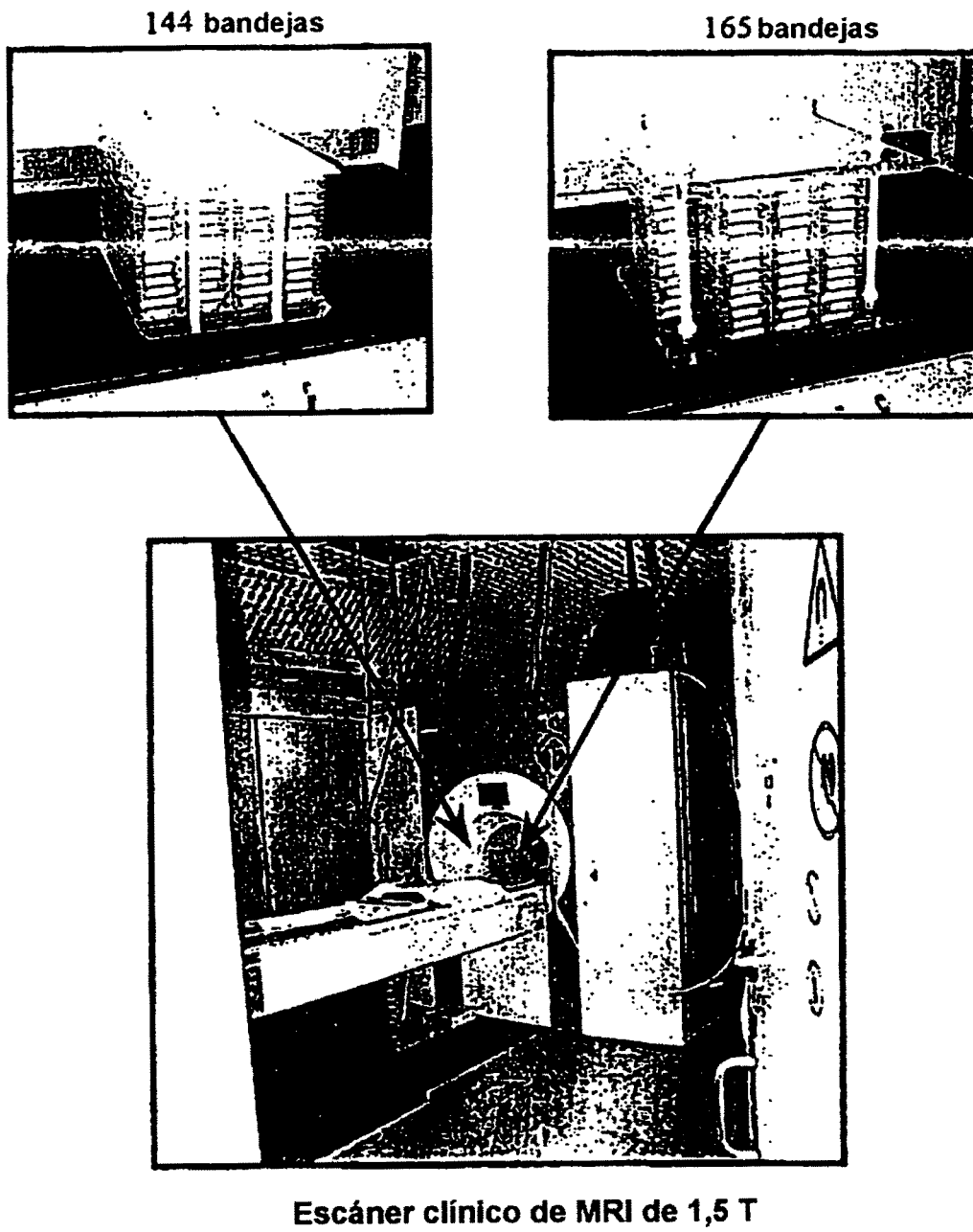


Figura 7

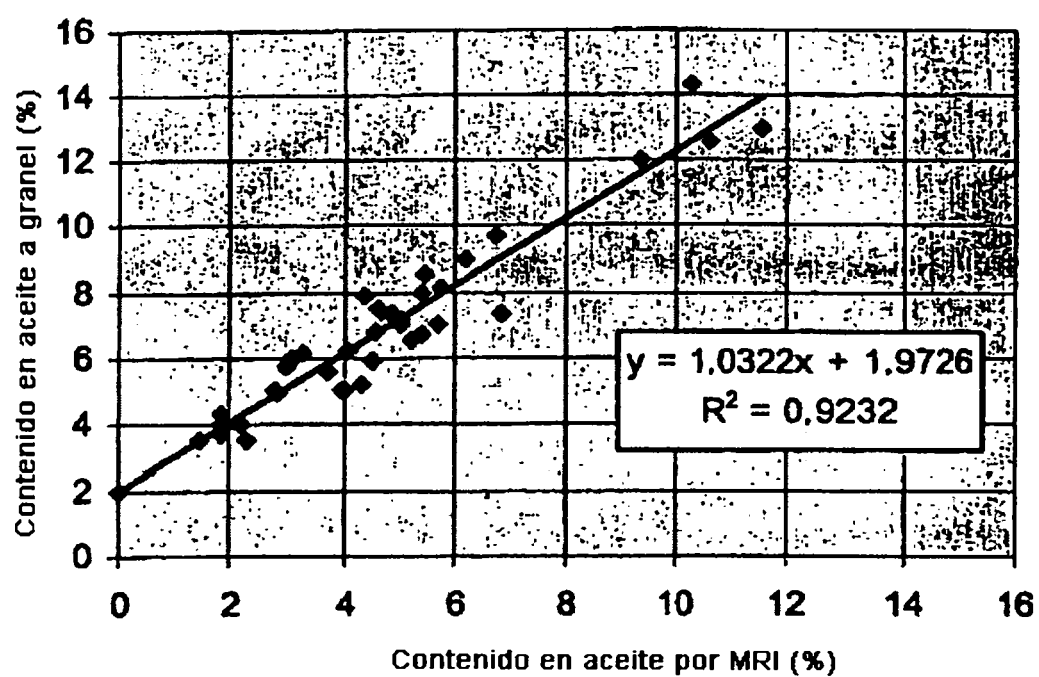


Figura 8

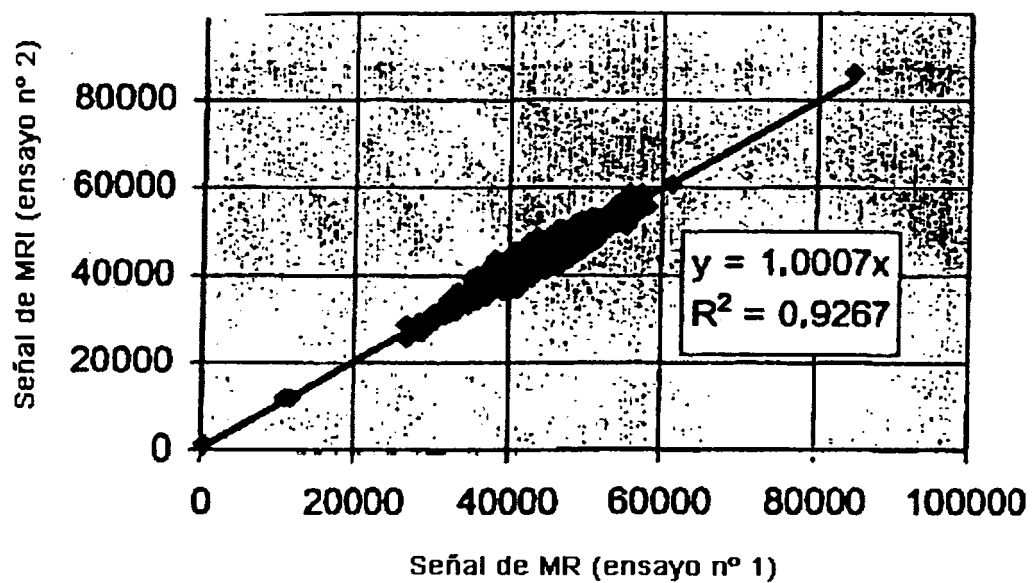


Figura 9

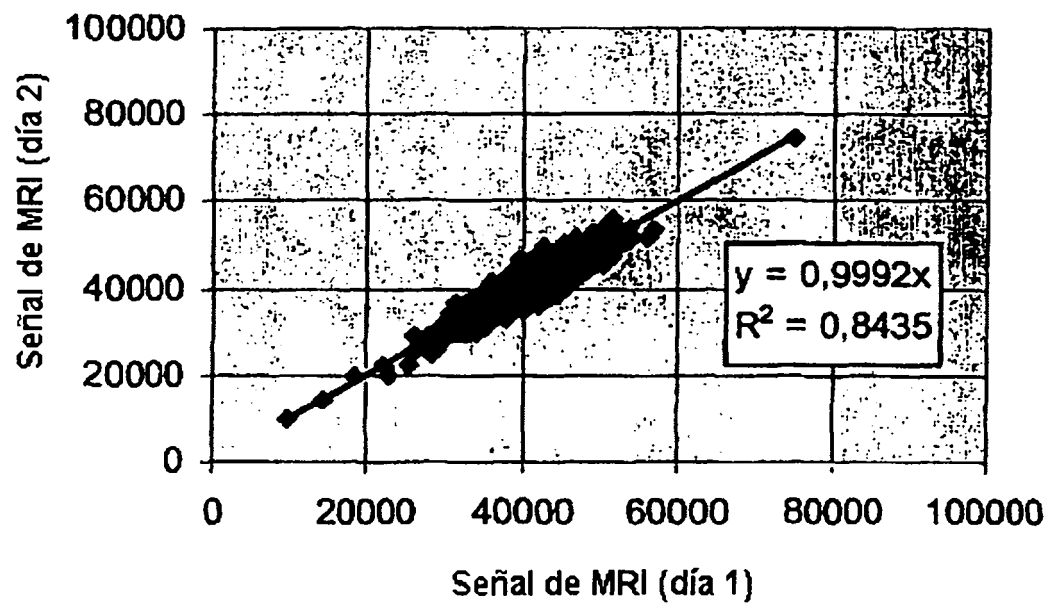


Figura 10

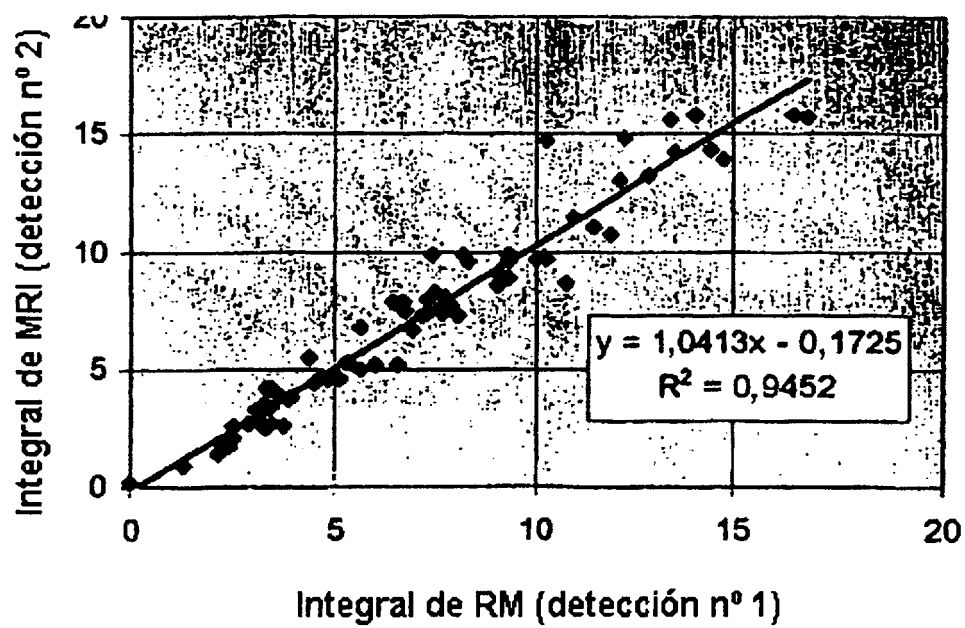


Figura 11

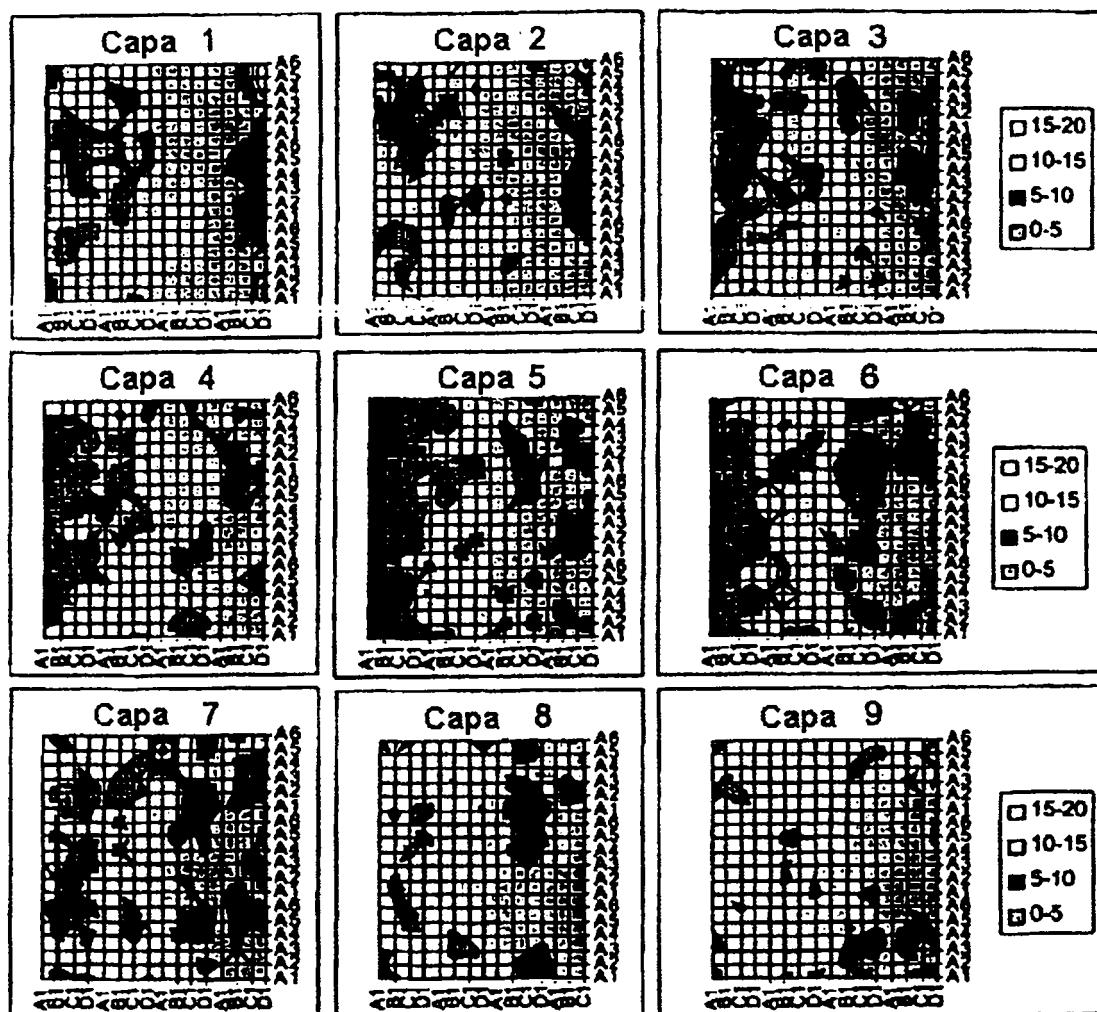


Figura 12