



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 289 011**

51 Int. Cl.:

**G01N 24/08** (2006.01)

**G01N 33/48** (2006.01)

**B01L 3/00** (2006.01)

**G01R 33/44** (2006.01)

**G01N 35/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01994377 .8**

86 Fecha de presentación : **19.12.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1346206**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **24.09.2003**

54 Título: **Procedimiento de RM para analizar semillas.**

30 Prioridad: **20.12.2000 US 739871**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.02.2008**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.02.2008**

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, Francisco**

ES 2 289 011 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento de RM para analizar semillas.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a procedimientos para el análisis de productos agrícolas. Más en particular, la presente invención se refiere a procedimientos para el análisis rápido, no destructivo, de las características físicas y químicas de una pluralidad de semillas.

10 **Antecedentes de la invención**

La obtención de productos agrícolas composicionalmente mejorados puede requerir al análisis de un gran número de muestras de semillas de plantas para identificar aquellas plantas con las deseadas propiedades composicionales y agronómicas para su uso o para su propagación a la siguiente generación. El análisis en lotes voluminosos de semillas de ciertas características, tales como un contenido alto en aceites o proteínas, en una planta individual o en una espiga, en conjunción con una metodología de obtención adecuada, tal como la selección recurrente, permite, a menudo, la selección e introducción de dichas características en una población comercial. Aunque el análisis de estos lotes de semillas se puede realizar mediante diversas técnicas, los procedimientos más deseables son aquellos rápidos, de bajo coste, y no destructivos.

Las imágenes por resonancia magnética nuclear (IRM) se basan en una técnica de espectroscopia no invasiva conocida como resonancia magnética nuclear (RMN). La RMN requiere que la muestra bajo estudio contenga átomos que exhiban espín nuclear, una cualidad intrínseca que convierte el núcleo atómico en magnético. El átomo más común con espín nuclear es el hidrógeno, cuyo núcleo es un protón con un espín de 1/2. Un experimento típico de RMN de protón (<sup>1</sup>H RMN) implica colocar la muestra bajo estudio en un campo magnético homogéneo fuerte. El campo magnético fuerte provoca el alineamiento preferencial de los protones en la muestra con el campo magnético, un fenómeno que es análogo al alineamiento de la aguja de una brújula con el campo magnético terrestre. En un simple experimento "RMN pulsado" moderno, se aplica otro campo magnético (el campo de radiofrecuencia o campo RF) transitoriamente a la muestra, que tiene el efecto de rotar los protones alineados hasta un estado de energía superior, que es perpendicular al campo magnético fuerte (esto se denomina un pulso a 90°). Los protones precesionan a velocidades características, según se realinean con el campo fuerte, induciendo así una corriente en una pareja de bobinas que actúan como detector. La corriente se mide en las bobinas detectoras como una función del tiempo, y a partir de esto se infieren las velocidades de precesión de los protones en la muestra. Las velocidades de precesión están determinadas, en primer lugar, por la intensidad del campo magnético fuerte (con campos magnéticos más fuertes dando lugar a velocidades de precesión mayores), pero el entorno molecular único experimentado por cada uno de los protones tiene, asimismo, un efecto en la velocidad de precesión. El entorno molecular único es el objeto de estudio de los experimentos de RMN.

En un experimento de RMN pulsado moderno ligeramente más complicado, la complejidad de las señales que resultan de entornos moleculares múltiples se puede eliminar, lo que deja tan sólo las señales procedentes de los protones en un subconjunto seleccionado de entornos moleculares. Esta aproximación, denominada experimento del "eco de espín", se puede utilizar, por ejemplo, sobre una muestra que comprende una mezcla de aceite y agua para eliminar la señal procedente de los protones en las moléculas de agua y dejar tan sólo las señales que proceden de los protones de las moléculas de aceite. Esto se puede realizar mediante la utilización de una serie de pulsos de RF de 90° y 180°, y los instrumentos comerciales vienen, típicamente, con un programa que es útil para programar el instrumento con el fin de ejecutar adecuadamente la secuencia de pulsos.

Los procedimientos de RMN de campo débil pulsado se basan en la diferenciación del aceite de otros componentes de la semilla basada en diferencias inherentes en las velocidades de relajación nuclear longitudinal y espín-espín entre el aceite y otras especies protonadas. Los procedimientos de RMN utilizados para medir aceite se han estandarizado, son no destructivos, robustos y proporcionan resultados reproducibles y precisos a la vez. El procedimiento de IRM para medir el contenido de aceite se basa en los mismos principios físicos descritos en los estudios de RMN pulsados. La diferencia está en que la IRM proporciona señales de RMN espacialmente codificadas, lo que permite la visualización de los datos en un formato de imagen, a diferencia de un espectro de RMN convencional.

Existe otra similitud entre los estudios de RMN convencionales y el procedimiento de IRM para medir los niveles de aceite en semillas individuales. Ambos procedimientos proporcionan un contenido relativo de aceite para las semillas en una base porcentual (peso/peso), mediante la comparación de los resultados experimentales con estándares de calibración de aceite, lo que se acepta generalmente como un procedimiento útil 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 números relativos ya que una pequeña porción de la intensidad de la señal de RMN se pierde durante los retrasos temporales incorporados en los esquemas de adquisición de datos. Los números relativos se pueden corregir a números absolutos normalizando los datos mediante el uso de una medición de aceite independiente para una población dada de semillas, por ejemplo, el promedio del valor medido de aceite para la población se fija al valor de aceite determinado en una medición de volumen y todas las semillas individuales se ajustan de acuerdo a esto. Los valores absolutos de aceite se pueden obtener, asimismo, con espectroscopia de RMN y procedimientos de IRM mediante la utilización de estándares de semillas en

el análisis. En este caso, el contenido de aceite de una semilla se determina de modo absoluto ya que el estándar de semilla se corresponde más fielmente con el contenido en ceras y la relajación nuclear de la semilla experimental. Sin embargo, los valores absolutos de aceite han mostrado ser menos precisos para comparar niveles relativos de aceite 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).

Aunque los mejores instrumentos de RMN requieren campos magnéticos extremadamente homogéneos, las máquinas de IRM introducen deliberadamente gradientes de campo (variaciones en la intensidad del campo magnético con relación a la posición) mediante el uso de tres imanes gradientes. Los imanes gradientes son mucho más débiles que el imán fuerte, pero son suficientes para provocar velocidades de precesión del protón distinguibles en diferentes partes de la muestra. Las máquinas de IRM modernas usan no sólo el campo de RF sino, asimismo, los campos gradientes con el fin de rotar selectivamente y detectar selectivamente protones en regiones particulares de la muestra. La medición de la intensidad de la señal de las diversas componentes de frecuencia (velocidades de precesión) indica la densidad y los tiempos de relajación (el tiempo que le lleva a un protón particular volver a su estado de baja energía original y realinearse con el campo magnético fuerte, el tiempo de relajación longitudinal, y precesionar fuera de fase, o desfasarse debido a relajaciones espín-espín, con relación a los otros protones) de protones en diversas posiciones en la muestra.

Los procedimientos de IRM proporcionan mediciones directas de características tales como los niveles de aceite, proporcionando así un primer análisis independiente de un modelo quimiométrico. Así pues, se puede construir una imagen tridimensional en la que las intensidades en diversos puntos de la imagen se corresponden con densidades y tiempos de relajación de protones en esos puntos de la muestra. Adicionalmente, como distintos entornos moleculares dan como resultado distintas frecuencias de precesión, se puede determinar el entorno molecular en cada punto de la muestra. Tal aproximación se denomina "obtención de imagen por desplazamiento químico" (CSI).

Una alternativa a la CSI es la "obtención de imagen por eco de espín" (SEI). En este experimento se puede aislar un tipo de protones (en base a sus velocidades de desfase) y se pueden suprimir las señales procedentes de todos los otros protones. Por ejemplo, si una muestra contiene agua y aceite espacialmente separados, un experimento SEI se dirige a detectar el aceite, con lo que la imagen resultante mostrará sólo aquellas regiones de la muestra en las que se encuentre aceite.

La IRM es una técnica radiológica no invasiva bien conocida, utilizada habitualmente en las ciencias médicas. La radiación de longitud de onda larga (onda de radio) es considerada universalmente como menos dañina que las formas de radiación utilizadas en otros tipos de técnicas radiológicas no invasivas, tales como el escáner tac (tomografía axial computerizada) de rayos X. Ya en 1988, empezaron a aplicarse técnicas de IRM al estudio de plantas. Véase la sección introductoria de "Spatial distribution of oil in groundnut and sunflower seeds by nuclear magnetic resonance imaging", *J. Biosci.* 17(1): 87-93 (Marzo 1992), de Lakshminarayana *et al.* (de aquí en adelante, Lakshminarayana *et al.*) (que describe una historia hasta 1992 de la utilización de la IRM en el estudio de plantas, semillas y tejidos de plantas). Lakshminarayana *et al.* describen un experimento en el cual se utilizó la IRM en semillas individuales para determinar la distribución espacial de aceite y agua en muestras de semillas individuales. Utilizaron una secuencia de pulsos de eco de espín para detectar selectivamente sólo los protones que formaban parte de las moléculas de aceite. La IRM se utilizó, asimismo, para el estudio por Heil *et al.* de la absorción de agua en alubias comunes secas, "Magnetic resonance imaging and modeling of water up-take into dry beans", *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 25:280 (1992).

Tanto la IRM SEI como CSI se utilizaron para obtener imágenes de lípidos en embriones de pacanas por Halloin *et al.*, "Proton magnetic resonance imaging of lipid in pecan embryos", *J. Am. Oil Chemists' Soc.* 70:1259 (1993). Estos experimentos estudiaban la diferencia en las imágenes de embriones de nueces pecan normales, infectados por hongos y dañados por insectos. Los experimentos de IRM CSI mostraba la distribución de lípidos y agua dentro de los embriones de pacanas.

Otras técnicas de IRM son conocidas para aquellos expertos en la técnica. Un ejemplo es la "relajografía", o mapa de tiempos de relajación. En esta técnica, regiones diferentes de una muestra de la que se ha obtenido una imagen se distinguen en base a las diferencias en tiempos de relajación de los protones de las diferentes regiones.

Los experimentos de IRM en semillas se han llevado a cabo, tradicionalmente, utilizando instrumentos IRM de investigación, por ejemplo, el instrumento Bruker AMX-400 de 9,4 teslas con un orificio de 8,9 cm de diámetro (Bruker Instrument Inc., Billerica, MA), o el instrumento GE Omega system de 7,1 teslas, con un orificio de 15 cm de diámetro (General Electric, Milwaukee, WI). Estos instrumentos tienen, típicamente, un diámetro de orificio de unos pocos centímetros y, como consecuencia, sólo pueden utilizarse para estudiar muestras que sean más pequeñas que el tamaño del orificio. La ventaja de la pequeña escala de estos instrumentos es que las bobinas de detección están próximas a la muestra bajo investigación y, por lo tanto, su sensibilidad es muy alta. Existen, asimismo, instrumentos de IRM de investigación mayores con tamaños de orificio y bobinas de detección con diámetros de 20-50 cm, por ejemplo, el Bruker Biospec II de 4,7 tesla, de 40 cm de diámetro de orificio (Bruker Instrument Inc., Billerica, MA). Estos instrumentos son útiles para obtener imágenes de ratones y otros animales pequeños. Los instrumentos de IRM clínicos, por otro lado, deben tener un tamaño de orificio y unas bobinas de detección lo suficientemente grandes para alojar un cuerpo humano. Por ejemplo, Siemens (Siemens AG, Erlangen, Alemania) y GE Medical Systems (Milwaukee, WI) fabrican una amplia gama de instrumentos clínicos que pueden alojar objetos de 50 cm de diámetro y mayores. Algunos de los sistemas más nuevos con imanes permanentes con campos magnéticos tan bajos como 0,2

teslas no están limitados por el tamaño de orificio sino por el diámetro de las bobinas. Sin embargo, las bobinas de detección de mayor diámetro de los instrumentos superconductores tradicionales, así como de los sistemas de imanes permanentes más novedosos, hacen que estos instrumentos clínicos estén mal adaptados para obtener imágenes de pequeñas muestras tales como semillas. La gran distancia desde las bobinas de detección a una muestra pequeña y la señal inherentemente débil que emana de una muestra pequeña conspiran para hacer impracticables las aproximaciones convencionales a la obtención cuantitativa de imágenes de muestras pequeñas utilizando instrumentos de IRM clínicos. Sin embargo, el volumen pequeño de los instrumentos de IRM de investigación de pequeño tamaño de orificio no permite la obtención simultánea de imágenes de tantas semillas como un instrumento de IRM clínico permitiría si los instrumentos de IRM más grandes fueran capaces de detectar señales procedentes de muestras pequeñas.

Las técnicas intensivas en tiempo para encontrar características deseables son especialmente desventajosas para los programas de obtención selectiva de plantas, en los cuales se necesita cribar rápidamente muchas semillas individuales con el fin de permitir la selección de semillas antes de la siguiente generación de plantación. Los retrasos en suministrar al obtentor los resultados analíticos pueden provocar una pérdida de un ciclo completo de obtención.

Las técnicas que no generan imágenes, tales como la espectroscopia infrarroja, adolecen de la desventaja adicional de que recogen información de tan sólo un subconjunto de una muestra total mediante la toma de muestras localizada únicamente en porciones de tan sólo unas pocas semillas de los cientos de semillas en la muestra a granel. Además, como la toma de muestras localizada interroga a porciones arbitrarias de la semilla, los diferentes tejidos de las semillas en las muestras pueden estar mal representados por los datos analíticos. Dado que características como el contenido en aceite están presentes, a menudo, en diferentes cantidades en diferentes tejidos, las técnicas que no generan imágenes desprecian la información espacial y, por lo tanto, no proporcionan información al obtentor sobre el tamaño, forma, daño mecánico, infestación por insectos o daño por hongos.

Las técnicas convencionales de análisis de semillas fallan también a la hora de proporcionar un procedimiento eficiente para el análisis de semillas individuales, que pueda acelerar enormemente la velocidad de desarrollo de variedades. El análisis de las semillas individuales es necesario para diferenciar y seleccionar semillas individuales de entre la población de semillas heterogénea que se encuentra, a menudo, en las poblaciones de obtención. El análisis de semillas individuales puede reducir el número de generaciones que se requieren para la producción de una planta con la característica deseada. La selección de semillas individuales reduce, asimismo, el número de plantas individuales requeridas. En el maíz, por ejemplo, la capacidad de identificar las semillas individuales con las características deseadas a nivel de semilla individual, a diferencia de a nivel de mazorca completa, puede reducir el requerimiento de vivero en un factor 100. Esto hace posible llevar a cabo un número de proyectos de obtención bastante más grande con los mismos recursos.

Asimismo, otras técnicas analíticas convencionales, tales como la cromatografía de gases, fracasan a menudo en proporcionar un procedimiento eficiente para el análisis de semillas individuales. Por ejemplo, el procedimiento convencional para el análisis de semillas individuales de colza requiere el corte manual de una 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 muestras y al bajo rendimiento de esta técnica analítica, sólo se pueden analizar un pequeño número de muestras por hora utilizando este procedimiento. Además, esta técnica toma en consideración la posibilidad de destruir el potencial para convertirse en plantas maduras portadoras de semillas de las semillas analizadas.

Aunque el análisis de semillas individuales es deseable, las aproximaciones convencionales y los procedimientos de muestreo no permiten el procesado eficiente de semillas individuales. Las técnicas convencionales requieren una entrada manual extensiva, lo que limita la velocidad de desarrollo de plantas con características mejoradas.

El documento norteamericano US-A-3.530.372 divulga un procedimiento para determinar si una muestra que comprende una pluralidad de semillas comprende semillas que exhiban una característica, el procedimiento comprende suministrar dicha muestra en un dispositivo de muestreo, realizar el análisis NHK de la muestra para buscar información que indique la presencia de la característica, determinar si cada semilla individual en dicha muestra exhibe dicha característica en base a dicho análisis, y clasificar individualmente las semillas para separar aquellas semillas individuales que exhiban la característica. El procedimiento se basa en un análisis NHK consecutivo de las semillas individuales.

Las técnicas convencionales de análisis por espectroscopia no permiten la localización de niveles de componentes químicos dentro de los diferentes tejidos de las semillas. Las aproximaciones convencionales, tales como la disección manual de la semilla seguida de análisis químico por técnicas analíticas tradicionales, no son sólo laboriosas y destructivas sino que, además, dan como resultado una resolución pobre de los componentes y una cuantificación pobre, ya que el tamaño de muestra resultante de la disección de semillas individuales está por debajo del tamaño de muestra con el cual 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 modo eficiente y no destructivo las características morfológicas y/o químicas de semillas individuales, y que se puedan integrar en una máquina de procesamiento agrícola. La presente invención proporciona tales procedimientos.

## Resumen 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 una característica en un espécimen dentro de la muestra, mediante el uso de técnicas de imagen por resonancia magnética, en una pluralidad de especímenes, y por el uso de la información obtenida mediante el análisis de IRM para seleccionar individuos que exhiba la característica de entre un grupo de candidatos que exhiban potencialmente la característica. Las características de la invención se establecen en las reivindicaciones 1 y 19, respectivamente. El resto de las reivindicaciones definen rasgos adicionales.

## 10 Descripción de los dibujos

La figura 1 muestra imágenes de IRM 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) presenta un contenido en aceite superior al grano B (7,8% de aceite en peso), que tiene un contenido en aceite superior al grano C (5,7% de aceite en peso), el cual presenta un contenido en aceite superior del grado D (2,8% de aceite en peso). Estas imágenes utilizaron las secuencias de pulsos de eco de espín que generó imágenes tan sólo de los protones que formaban parte de las moléculas de aceite. Así pues, las regiones más oscuras indican un contenido en aceite mayor, mientras que las regiones más claras indica un contenido en aceite menor.

La figura 2 es un diagrama de bloques que detalla los pasos desde la recogida de datos inicial de un cubo de muestra que contiene múltiples capas de semillas hasta la producción de una matriz que detalla el contenido porcentual de aceite en peso de cada una de las semillas de la muestra. Este diagrama de bloques muestra los pasos que se pueden aplicar a los datos brutos, obtenidos mediante un experimento de IRM, para producir la matriz de datos finales de las semillas en forma de contenido porcentual de aceite en peso para cada semilla dentro del cubo de muestra. En primer lugar, se recoge un conjunto de datos tridimensionales del cubo de muestra para producir un cubo de datos de imagen 101 tridimensional (véase la figura 3 como ejemplo de un cubo de datos de imagen). Se utiliza un programa de análisis de imágenes tal como IDL (lenguaje de datos interactivo) para combinar las rodajas 102 que comprenden el cubo de datos en un conjunto de imágenes bidimensionales 103, en el 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 de tales imágenes de capa). Se pueden utilizar otros programas de análisis de imágenes, y aquellos expertos en la técnica de análisis de imágenes conocerán muchos ejemplos de tales programas. El programa de análisis de imágenes se utiliza para aplicar un filtro umbral 104 a cada una de las imágenes de capa, basado en la razón señal-ruido calculada utilizando la primera imagen de capa para producir una imagen de capa "limpia". (Véase figura 4b para una representación de una imagen de capa resultante de la aplicación del filtro umbral). Otros filtros útiles para este paso son conocidos por aquellos expertos en la técnica del análisis de imágenes. El programa de análisis de imágenes se utiliza a continuación para localizar las fronteras de las semillas individuales dentro de cada capa de imagen 106, utilizando un filtro de detección del borde u otro filtro conocido por aquellos expertos en la técnica de análisis de imágenes para localizar objetos dentro de una imagen, con el fin de producir imágenes bidimensionales limpias de cada semilla dentro de cada capa del cubo de muestra 107. A continuación, el programa de análisis de imágenes se utiliza para integrar la intensidad de la imagen IRM para cada semilla dentro de cada capa del cubo de muestra 108. Las intensidades integradas se almacenan como una matriz de datos brutos, en la que cada elemento de la matriz de datos brutos es la intensidad integrada que corresponde a cada semilla en el cubo de muestra 109. Finalmente, la información almacenada en la matriz de datos brutos se combina con la información sobre los pesos de cada semilla dentro del cubo de muestra 110 para calcular el porcentaje relativo de aceite en peso de cada semilla dentro del cubo de muestra. El resultado de este cálculo se almacena en una matriz de datos procesados, en la que cada elemento de la matriz de datos procesados corresponde al porcentaje relativo de aceite en peso de cada semilla dentro del cubo de muestra 111, que no ha sido corregido para imperfecciones en el campo magnético principal, gradiente del campo pulsado, y falta de homogeneidad en la bobina de detección RF, colectivamente denominados defectos de campo. Estos datos se procesan adicionalmente mediante la incorporación de la intensidad IRM medida de una semilla estándar con un contenido en aceite conocido, con el fin de corregir los defectos de campo y producir una matriz de datos que contenga el contenido relativo en aceite de cada semilla dentro del cubo de muestra.

La figura 3 muestra los datos brutos de un cubo de muestra de 12 capas de semillas de maíz, en la cual cada capa está compuesta por 12 placas, y cada placa presenta 24 pozos, para un total de 3456 semillas.

La figura 4a presenta los datos combinados de varias rodajas del cubo de datos que corresponden a una capa del cubo de muestra y que muestra los datos de 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 los pasos requeridos para poner en marcha el experimento de IRM de cribado de la invención. Se muestran los pasos fundamentales de la preparación de la muestra previa al análisis de la muestra para un experimento IRM de alta resolución. En primer lugar, las placas con múltiples pozos individuales se cargan con las semillas de interés. En los dos ejemplos mostrados, se cargan semillas de maíz en una placa de 48 pozos, y se cargan semillas de soja en una placa de 96 pozos. Los especímenes más pequeños se pueden cargar en placas de pozos mucho más densas, por ejemplo, las semillas de colza se pueden cargar en placas de 960 pozos. A continuación, las placas se apilan en capas para construir un cubo de muestra. En esta figura, hay dos conjuntos de cuatro capas para un total de ocho placas de pozos. Son posibles muestras cúbicas mucho más grandes (por ejemplo son posibles 12 capas o más),

pero el tamaño de la bobina de detección es un factor limitante en este ejemplo en particular. El cubo de muestra se empaqueta en la bobina RF, que se carga a continuación en el imán de IRM. El experimento está entonces listo para su ejecución.

5 La figura 6 es una comparación del experimento de cribado IRM de alta resolución de la invención (figura 6a) y del experimento de cribado IRM de alto rendimiento de la invención (figura 6b). Esto ilustra claramente cómo el instrumento de IRM clínico es más flexible en relación a muestras cúbicas grandes que el instrumento de IRM de investigación. En la figura 6a, la bobina RF del instrumento de investigación limita el tamaño del cubo de muestra, en este caso a 2 apilamientos de 5 capas de placas de 48 pozos, para un total de 480 semillas. La intensidad mayor de campo magnético del imán de investigación (4,7 T) permite unas imágenes de mayor resolución, pero estas imágenes de mayor resolución requieren, asimismo, tiempos de adquisición más largos (3 horas) y tamaños de muestra más pequeños. Los instrumentos clínicos, tales como el mostrado en la figura 6b, por otro lado, pueden alojar muestras cúbicas mucho más grandes. En el ejemplo hay 12 apilamientos de 12 capas de placas de 24 pozos, para un total de 3456 semillas. Aunque el instrumento clínico no es el mejor sistema para obtener las imágenes de más alta resolución, comparado con el imán de investigación, se adapta mejor para la obtención de imágenes de alto rendimiento. No sólo se obtienen simultáneamente imágenes de siete veces más semillas, en comparación con el instrumento de investigación, sino que el experimento de obtención de imágenes de baja resolución se lleva a cabo en tan sólo 18 minutos, una décima parte del tiempo requerido para el experimento de obtención de imágenes de alta resolución. Así pues, en este ejemplo se pueden analizar con el instrumento clínico más de 70 veces más semillas en un período de tiempo dado que utilizando el instrumento de investigación. Alterando los parámetros de adquisición de datos, se pueden obtener imágenes de alta resolución utilizando el instrumento clínico. Este cambio incrementará considerablemente la cantidad de tiempo que lleva la adquisición de datos.

25 La figura 7 muestra dos diseños de un dispositivo de muestreo. Éstos diseños son tan sólo dos de los posibles diseños diferentes para los cubos de muestras de mayor cantidad, cada una de los cuales se utiliza preferiblemente en un instrumento de IRM clínico.

30 La figura 8 (que se refiere a una comparación del contenido en aceite IRM promedio respecto al contenido en aceite del volumen) es una gráfica que muestra la correlación entre las medidas de contenido de aceite utilizando IRM y utilizando espectroscopia infrarroja (IR).

35 La figura 9 (que se refiere a una comparación intradía de la intensidad de la señal de RM medida utilizando un estándar de calibración) es una gráfica que muestra la comparación entre los resultados de análisis de IRM del contenido en aceite de los mismos estándares de aceite de semillas en dos momentos diferentes del mismo día.

40 La figura 10 (que se refiere a una comparación entre días de la intensidad de la señal de RM medida utilizando un estándar de calibración) es una gráfica que muestra la comparación entre los resultados de análisis de IRM del contenido en aceite de los mismos estándares de aceite de semillas en dos días diferentes.

La figura 11 es una gráfica que muestra las comparaciones entre los resultados de análisis de IRM del contenido en aceite de los mismos estándares de aceite de semillas utilizando dos instrumentos de IRM distintos.

45 La figura 12 es un mapa de la desviación estándar porcentual relativa al promedio para cada posición del pozo en cada una de las nueve capas de un cubo estándar de calibración.

### Descripción detallada de la invención

50 La presente invención es una mejora de las técnicas de IRM existentes para medir características de semillas, y proporciona, adicionalmente, procedimientos para obtener plantas selectivamente con el fin de mejorar propiedades tales como el contenido en aceite de las semillas. La invención proporciona un procedimiento para utilizar instrumentos de IRM clínicos (u otros de orificio grande) para analizar muestras pequeñas tales como semillas. Los imanes de IRM de investigación más pequeños tienen tamaños de orificio y diámetros de la bobina de detección y RF que son significativamente menores que los de aquellos imanes de IRM clínicos y de los imanes de investigación mayores. Esta diferencia proporciona tanto ventajas como inconvenientes para determinar características de especímenes pequeños tales como semillas. Una ventaja de los instrumentos de investigación es que las bobinas de detección están más próximas a la muestra bajo estudio, por lo que la sensibilidad del instrumento es superior y, consecuentemente, la razón señal-ruido es mayor. Sin embargo, una desventaja significativa es que el volumen activo es inherentemente menor en los instrumentos de investigación de orificio pequeño. La definición de volumen activo, tal como se utiliza aquí, es aquel volumen dentro del instrumento en el que se puede situar la muestra bajo estudio, de tal manera que se pueda obtener una imagen de la muestra sin distorsiones significativas. El volumen de obtención de imágenes se encuentra 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. Una falta de homogeneidad del campo magnético fuerte significativa, no linealidades del gradiente de campo y falta de homogeneidad en las bobinas de detección de RF (denominados colectivamente aquí como "defectos de campo") en cualquier región dentro del instrumento provoca distorsiones en las imágenes de la muestra obtenidas de esas regiones. Las pequeñas distorsiones de esos tipos se puede compensar mediante, por ejemplo, la corrección de los defectos de campo o mediante la corrección de datos posterior

a la adquisición de la imagen, pero existirán invariablemente regiones en el instrumento en las cuales las distorsiones serán demasiado sustanciales para ser corregidas, y los datos procedentes de esas regiones son inutilizables.

Los instrumentos clínicos presentan volúmenes activos mayores que los instrumentos de investigación. Por ejemplo, un instrumento de investigación de orificio pequeño típico (con un tamaño de orificio de 9 cm, por ejemplo) puede tener un volumen activo definido por un cilindro de, digamos, 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, digamos, 25 cm de diámetro y 30 cm de longitud. El mayor volumen activo de los instrumentos clínicos permite alojar, por lo tanto, dispositivos de muestreo mucho más grandes. Por ejemplo, la figura 6a presenta un cubo de muestra diseñado para un instrumento de investigación de orificio medio. Sus dimensiones son, aproximadamente, 15 cm x 20 cm x 12 cm, y alberga 480 semillas. La figura 6b presenta un cubo de muestra diseñado para un instrumento clínico. Sus dimensiones son, aproximadamente, 30 cm x 35 cm x 30 cm, y alberga 3456 semillas. Dejando a un lado todas las otras diferencias entre instrumentos, el volumen activo por sí mismo otorga una mejora siete veces superior en el número de semillas que pueden ser analizadas simultáneamente en el instrumento clínico.

Existen varios obstáculos que deben superarse con el fin de obtener beneficio del volumen activo mayor de los instrumentos clínicos para el análisis de pequeños especímenes tales como semillas. Uno de tales obstáculos se supera reconociendo que las bobinas de RF y de detección deben ser cargadas, o los circuitos de RF y de detección deben ser resintonizados, para tener en cuenta las diferencias en la inductancia de las bobinas de detección cuando la muestra de semillas (que da menor inductancia) y la muestra humana (que da mayor inductancia) se encuentran en la bobina.

Existen tres cuestiones relacionadas que pueden plantear dificultades en la obtención magnética de imágenes de muestras que comprenden especímenes tales como semillas. El primer aspecto es que la susceptibilidad magnética de un material orgánico es drásticamente diferente de la del aire. Así pues, los espacios aéreos entre semillas en una muestra de muchas semillas y los espacios aéreos entre las semillas y el material plástico que interviene en el dispositivo de muestreo pueden causar distorsiones en el campo o magnético, de otro modo uniforme, como resultado de variaciones espaciales abruptas en las líneas de campo magnético. Estas distorsiones en el campo magnético fuerte provocan variaciones en la intensidad del campo magnético experimentado por las distintas regiones de una muestra. Debido a que las diferentes regiones de una muestra experimentan campos magnéticos diferentes, protones que de otro modo serían equivalentes precesionan a distintas velocidades en aquellas regiones distintas. Esto provoca una disminución en los tiempos de desfase, lo que da como resultado una pérdida más rápida de intensidad de la señal que en ausencia de diferencias en susceptibilidad.

La segunda cuestión que puede plantear dificultades en la obtención magnética de imágenes de muestras tales como semillas es la no linealidad de los gradientes de campo. La no linealidad del gradiente de campo crea dificultades en la correlación entre regiones reales en la muestra y los elementos de volumen en una imagen de la muestra. En casos extremos, tales no linealidades pueden hacer intratables los datos de la imagen. Las no linealidades del gradiente son particularmente problemáticas con muestras grandes, ya que los gradientes lineales son más difíciles de mantener en largas distancias.

La tercera cuestión que puede plantear dificultades en la obtención magnética de imágenes de muestras tales como semillas es la falta de homogeneidad en las bobinas de detección de RF. La falta de homogeneidad en las bobinas de RF provocan dificultades para correlacionar cuantitativamente regiones reales de la muestra con niveles del material de detección en la muestra. En casos extremos, tales faltas de homogeneidad pueden hacer intratables los datos de las imágenes. Las faltas de homogeneidad en el detector de RF son particularmente problemáticas con muestras grandes ya que los campos homogéneos son más difíciles de mantener en largas distancias.

#### *Procedimientos para analizar semillas utilizando IRM*

Es un aspecto de la presente invención proporcionar un procedimiento para determinar si una semilla muestra una característica o si cualquier semilla dentro de una muestra de semillas muestra una característica. En este aspecto de la invención, se utiliza un dispositivo de muestreo para proporcionar la semilla o la muestra de semillas para su análisis mediante un instrumento de IRM. El instrumento de IRM se utiliza para proporcionar una imagen de la semilla o de la muestra de semillas. La imagen resultante se analiza y la presencia o ausencia de la características se determina en base a ese análisis.

#### *Semillas*

Se puede utilizar cualquier semilla en un procedimiento de la presente invención. En una realización preferida, la semilla se selecciona de entre un grupo que consiste en semillas de alfalfa, de manzana, de plátano, de perejil, de alubia, de brécol, de ricino, de cítricos, de clavo, de coco, de café, de maíz, de algodón, de pepino, de pino de Oregón, de eucalipto, de pino rígido, de lino, de melón, de avena, de olivo, de palma, de guisante, de cacahuete, de pimienta, de álamo, de pino insigne, de colza, de arroz, de centeno, de sorgo, de tea, de soja, de fresa, de remolacha, de caña de azúcar, de girasol, de árbol del ámbar, de té, de tabaco, de tomate, de césped, de trigo y de *Arabidopsis thaliana*. En una realización más preferida, la semilla se selecciona de entre un grupo que consiste en semillas de algodón, de maíz, de soja, de colza, de arroz y de trigo. En una realización todavía más preferida, la semilla es una semilla de maíz.

*Muestras*

Con los procedimientos de la presente invención se pueden utilizar semillas individuales o lotes de semillas. Una “muestra” de semillas es cualquier cantidad de semillas o una semilla individual. En una realización preferida, una muestra de semillas consiste en más de 10 semillas, mas preferiblemente más de 20, 50, 500, 1000 o 10.000 semillas. En otra realización, la muestra de semillas se puede clasificar por su origen, tal como semillas derivadas de una espiga individual, una planta individual o un cruce de plantas individual. Como se utiliza aquí, “muestra” es un objeto o una colección de objetos que van a ser estudiados utilizando una técnica analítica tal como IRM. Una muestra comprende uno o más “especímenes”, que son el objeto de estudio en esa muestra. Los especímenes preferidos de la invención son semillas.

Las semillas individuales en una muestra se pueden analizar simultáneamente con un procedimiento de la presente invención. Como se utiliza aquí, “simultáneamente” significa cualquier conjunto de datos derivados de un análisis individual. Un análisis individual puede ser un experimento de IRM individual, o el promedio de múltiples experimentos de IRM. Tal análisis simultáneo puede ser el análisis simultáneo de un lote de semillas para una o más características. Tal análisis simultáneo puede ser, asimismo, el análisis simultáneo de una semilla para múltiples características. En una realización, se puede analizar más de una característica simultáneamente, por ejemplo el contenido de agua y aceite se puede analizar simultáneamente. En una realización alternativa, se pueden analizar simultáneamente más de 3, 4, 5 o 6 características. En otras realizaciones alternativas, se pueden analizar simultáneamente entre 5 y 10 características, o entre 10 y 20. En la realización preferida, el experimento de IRM está dirigido a determinar el contenido en aceite de las semillas.

*Características*

Los procedimientos de la presente invención se pueden utilizar para detectar cualquier característica que se pueda medir mediante resonancia magnética. En una realización preferida, la característica es una característica bioquímica. Como se utiliza aquí, una característica bioquímica es cualquier característica que afecta a la composición química de la muestra agrícola. En una realización, la característica bioquímica se selecciona de entre un grupo que consiste en el contenido en aceite, el contenido en proteínas, el contenido en carbohidratos, el contenido en almidón, el contenido en fibra y el contenido en agua. Como se utiliza aquí, contenido se refiere a la cantidad de un componente, por ejemplo, 5 miligramos (mg) de proteína por semilla o 5 mg de proteína por cada 10 g de peso en seco de tejido. Las características preferidas son las referidas al contenido en aceite y al contenido en agua relativos. La característica más preferida es el contenido relativo en aceite.

Los daños a los granos provocados durante la recolección, secado, elevación y movimiento de granos a través de los canales comerciales se pueden determinar con los procedimientos de la presente invención. El uso de técnicas agrícolas modernas, tales como la utilización de cosechadoras, ha conducido a un contenido de humedad de los granos en las muestras mucho más alto que si se hubiera permitido el secado de las muestras en la espiga. El alto contenido humedad requiere la utilización de secado artificial a temperaturas superiores a 80°C, lo que provoca grietas de estrés y rotura de los granos. Los indicadores de rotura de los granos pueden incluir, aunque no están limitados a, el cociente entre el endospermo vítreo y no vítreo, la densidad del grano, el peso promedio del grano, la calidad y cantidad de pericarpio, y la forma y tamaño del grano. Los procedimientos de la presente invención se puede utilizar para identificar roturas y susceptibilidad a la rotura, y en la identificación de características químicas y físicas que puedan minimizar estos problemas.

En cualquiera de las realizaciones de análisis de semillas múltiples y semillas individuales mostradas anteriormente, se puede analizar más de una característica cada vez. Por ejemplo, características que corresponden a distintos desplazamientos químicos o tasas de desfase, o intervalos de desplazamientos químicos y de tasas de desfase, y características que tienen un efecto acumulativo dentro del mismo rango se pueden investigar simultáneamente. Asimismo, se pueden analizar separadamente diferentes tejidos de una semilla individual. Mediante el uso de modelos espectrales para diferenciar entre los dos tejidos, regiones de elementos de volumen de imagen contiguos se pueden asociar con cualquier porción de una semilla o tejido vegetal, tales como, por ejemplo, el germen y el endospermo. Los datos espectrales de porciones diferentes se pueden utilizar entonces para el análisis diferencial de diferentes tejidos en la semilla. En la realización preferida, se analiza el contenido relativo en aceite de la semilla.

*Dispositivos de muestreo*

Se utilizan dispositivos de muestreo para suministrar muestras. Como se utiliza aquí, “suministrar” significa cualquier procedimiento utilizado para situar una muestra en un instrumento de IRM o cualquier procedimiento utilizado para sostener una muestra mientras se encuentra en un instrumento de IRM.

En una realización, las semillas de una fuente individual se suministran juntas en dispositivo de muestreo. La fuente individual puede ser cualquier fuente que proporcione semillas que tengan unos antecedentes genéticos comunes, tales como una mazorca de maíz, una planta individual, o el producto de un cruce individual. Utilizando este procedimiento, las semillas del lote se proporcionan como un grupo suministrado al azar en dispositivo de muestreo. Como se utiliza aquí, “suministrar al azar” un lote de semillas en un dispositivo de muestreo es un modo particular de suministrar las semillas disponiéndolas en el dispositivo de muestreo sin prestar atención a la orientación o a la separación de

## ES 2 289 011 T3

las semillas en un momento posterior. Por ejemplo, un lote de 100 semillas que se vuelca en una placa de plexiglás individual grande para su análisis se define como “suministrada al azar”.

5 Cualquier dispositivo de muestreo se puede utilizar si el dispositivo de muestreo no interfiere significativamente con las mediciones de resonancia magnética. Los dispositivos de muestreo incluyen, aunque no están limitados a, dispositivos tales como contenedores fabricados en plexiglás que tienen, por ejemplo, 12, 24, 96 o 384 pozos en los cuales las muestras de semillas se pueden cargar para su análisis. Otros materiales que pueden ser útiles para la construcción de dispositivos de muestreo son conocidos por aquellos expertos en la técnica de la obtención de imágenes por resonancia magnética. Los dispositivos de muestreo particularmente preferidos son placas que contienen múltiples pozos que se apilan en múltiples capas para proporcionar un conjunto tridimensional de especímenes para su análisis, con el fin de maximizar el número de especímenes analizados en un experimento de obtención de imágenes.

15 En una realización preferida, las semillas en un lote se suministran en un dispositivo de muestreo que es capaz de mantener cada semilla en su propio compartimiento individual. Un “compartimiento individual”, como se utiliza aquí, puede ser cualquier cosa que pueda posicionar cada semilla de modo que la semilla se puede identificar como correspondiente a un elemento de volumen particular de la imagen medida por IRM. En una realización, el dispositivo de muestreo comprende una superficie plana dispuesta horizontalmente, y los compartimientos individuales (“pozos”) son porciones designadas de la superficie plana. En otra realización, el dispositivo de muestreo comprende compartimientos individuales que tienen un suelo y cuatro paredes dispuestas en un patrón cuadrado dentro del cual se pueden disponer las semillas individuales. Todavía en otra realización, el dispositivo de muestreo es una superficie plana sobre la cual se sitúan de modo removible compartimientos individuales que tienen tan sólo cuatro paredes. En esta realización, bien la superficie plana o los compartimientos individuales se pueden retirar para permitir la clasificación de las semillas. En una realización preferida, el dispositivo de muestreo comprende placas de pozos múltiples apiladas de modo removible con una alta densidad de pozos para proporcionar un mayor número de posiciones identificables en un menor volumen.

### *Adquisición y análisis de datos*

30 Una muestra que contiene una o muchas semillas se sitúa en un instrumento de IRM, y se realiza un experimento de obtención de imágenes utilizando técnicas de adquisición de datos estándar. Cualquier instrumento de obtención de imágenes por resonancia magnética se puede utilizar en esta invención, y se puede utilizar cualquier experimento de IRM que sea sensible a la característica o rasgo de interés, tales como CSI, SEI, o “relajometría”. Los instrumentos de IRM preferidos serán aquellos que dispongan de campos magnéticos fuertes, homogéneos, superiores a, aproximadamente, 0,2 teslas. Asimismo, se prefieren particularmente los instrumentos de IRM clínicos con la bobina de detección incorporada en el inserto de gradiente, de tal manera que la bobina de detección es mucho más grande que en los instrumentos de investigación y, por lo tanto, puede alojar volúmenes de muestra mucho más grandes. Los instrumentos de IRM preferidos particularmente son aquellos que disponen de un campo magnético fuerte, superior a, aproximadamente, 1 tesla.

40 Mediante el uso de un sistema de IRM con un imán de orificio grande, por ejemplo, un instrumento de IRM clínico o de investigación grande, es posible discriminar espacialmente las señales RMN de semillas individuales. Esta aproximación permite analizar un gran número de semillas en un experimento de IRM individual. Específicamente, los procedimientos descritos aquí permiten la medición simultánea de 3456 granos de maíz en menos de 30 minutos. Las semillas oleaginosas preferidas, tales como soja y colza, se pueden examinar, asimismo, utilizando procedimientos de IRM de alto rendimiento similares. En cualquiera de las realizaciones anteriores para el análisis de muestras, el tiempo para realizar el procedimiento en el lote completo puede ser inferior a 30 minutos, preferiblemente inferior a 20 minutos. Este tiempo de muestreo corto da como resultado un rápido trasiego de muestras en relación con el estado de la técnica anterior, y permite un mayor cribado de las muestras de cultivos dentro de un ciclo de obtención. Los tamaños de orificio preferidos son superiores a 20 cm, 30 cm, 40 cm o 50 cm.

55 En general, el tamaño de muestra (o número de semillas por cubo de muestra) para el análisis de IRM está dictado por las limitaciones físicas y las prestaciones del escáner de IRM y del dispositivo de detección de IRM (bobina RF). Los siguientes factores controlan la sensibilidad en el experimento y, consecuentemente, tiene impacto en el trasiego de muestras: (a) la intensidad, homogeneidad y el tamaño de orificio del campo magnético principal, (b) la calidad, el tamaño, y las características de respuesta del detector de RF de señal de IRM, y (c) la intensidad, homogeneidad y linealidad del gradiente de adquisición de imágenes.

60 En una realización preferida, la secuencia de pulsos para el experimento de IRM es una secuencia de eco de espín, que permite la detección preferencial de protones de moléculas de hidrocarburos (aceite). En esta realización, la intensidad de la señal está relacionada con la cantidad de aceite. Así pues, una imagen particularmente fuerte de una semilla indica un alto contenido en aceite en esa semilla, mientras que una imagen débil es indicativa de un menor contenido en aceite. En una realización alternativa, la secuencia de pulsos para el experimento de IRM es una secuencia de obtención de imágenes por desplazamiento químico, que permite la detección de la totalidad del espectro de RMN de protones en moléculas de hidrocarburos (aceite). En esta realización, el espectro de la señal permite inferir el tipo de aceite. Así pues, se puede determinar la presencia de tipos particulares de aceite, tales como los aceites poliinsaturados.

Una imagen de la muestra se construye a partir de los datos utilizando los programas disponibles, tales como el programa Varian Image Browser™ (Varian, Inc. Palo Alto, CA). Tal imagen contiene las intensidades de señal de IRM para cada una de las semillas individuales (en un experimento que estudia múltiples semillas). Los datos de la imagen se pueden procesar adicionalmente, a continuación, con el fin de cuantificar la característica o características bajo estudio, utilizando técnicas de análisis de datos conocidas por aquellos expertos en la técnica. Los resultados del análisis se pueden mostrar de modo amigable, mostrando el análisis cuantitativo de la característica o características bajo estudio para cada semilla individual en un lote de semillas bajo estudio.

#### *Dispositivos para el análisis de semillas*

Es un aspecto de la presente invención proporcionar un procedimiento para utilizar un instrumento de IRM de orificio grande en el análisis de muestras de baja inductancia, tales como muestras que comprenden semillas. Como se detalló anteriormente, los instrumentos de IRM de grado clínico tienen circuitos de bobinas de RF y de detección que están sintonizados para muestras que tienen inductancias mayores que las muestras de semillas. Como consecuencia, las bobinas se deben cargar, o los circuitos deben ser resintonizados, para adaptarse a las inductancias menores de las muestras de semillas. El paso de carga puede consistir simplemente en situar una muestra fantasma dentro de las bobinas de detección, aunque fuera del volumen del que se va a obtener la imagen. Tal muestra fantasma puede ser, por ejemplo, un volumen de agua para simular el tejido humano para el que está diseñado el instrumento de IRM. Las muestras fantasma se obtienen de los fabricantes de instrumentos clínicos IRM (por ejemplo, Siemens AG, Erlangen, Alemania; GE Medical Systems, Milwaukee, WI). La alternativa a cargar las bobinas es resintonizar los circuitos de RF y de detección del instrumento para que las bobinas se vuelvan sensibles a la muestra, dada su menor inductancia. Si las bobinas no están cargadas o, alternativamente, si el circuito no se resintoniza, ocurrirá entonces una pérdida dramática de señal provocada tanto por la rotación de la magnetización ineficiente por la bobina de RF (esto es, un pulso a 90° putativo girará la magnetización de la muestra menos de 90°) como por la detección ineficiente. Si la diferencia entre la inductancia a la que el instrumento clínico está sintonizado y la inductancia real, dada una muestra tal como varias semillas, es lo suficientemente grande, no será observable ninguna señal.

Es un aspecto de la presente invención superar las dificultades asociadas con la obtención de imágenes de muestras tales como colecciones de semillas mediante el uso de instrumentos de IRM clínicos y de investigación de orificio grande. En este aspecto de la invención, la intensidad del campo gradiente se ajusta de tal manera que: (1) el campo de visión (el volumen activo) cubre la totalidad de la muestra de la que se van a obtener imágenes; (2) el número de capas de imagen bidimensionales (horizontal) se ajusta de tal manera que el número de capas de imágenes multiplicado por el grosor (vertical) de las rodajas de la muestra es igual, aproximadamente, a la altura (vertical) de la muestra; (3) el número de píxeles dentro de cada capa de imagen es suficiente para resolver las semillas mediante píxeles suficientes para evitar la diafonía entre píxeles. Estos tres criterios son determinantes del gradiente de campo que se va a utilizar en una muestra arbitraria dentro de un instrumento de IRM arbitrario. Sin embargo, éstos deben elegirse particularmente para instrumentos de IRM clínicos y de investigación de orificio grande, cuyos gradientes de campo no están ajustados apropiadamente para la obtención de imágenes de muestras que comprendan especímenes 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 de visión del instrumento debería cubrir la totalidad de la muestra de la que se van a obtener imágenes. El propósito de este criterio es asegurar, simplemente, que se obtienen imágenes de todas las semillas en la muestra. Esto determina, asimismo, las dimensiones sobre las que los gradientes de campo deberían ser sustancialmente lineales.

Un segundo criterio para determinar los gradientes de campo apropiados es que el número de capas de imagen bidimensionales se fije de tal manera que el número de capas de imagen multiplicado por el grosor de las rodajas de la muestra sea igual, aproximadamente, a la altura de la muestra. Esto asegura que se obtienen imágenes de la totalidad de la altura de la muestra. Sorprendentemente, el grosor óptimo de las capas de imagen no corresponde, generalmente, con el grosor de las semillas de las que se van a obtener imágenes. Un número menor de rodajas (lo que corresponde a un grosor mayor) requiere un menor tiempo de adquisición de imágenes y un menor tiempo de procesamiento de datos para una cantidad de información equivalente. El mayor grosor práctico debería ser el grosor de un espécimen individual del que se van a obtener imágenes, esto es, el grosor de una semilla. Pero éste no es el caso; en su lugar, el grosor óptimo de las capas de imagen es menor que el grosor de una semilla individual. Cuando el grosor de una capa de imagen se fija para que sea igual al grosor de una semilla individual, el resultado de la obtención de imágenes es, frecuentemente, anómalo e impredecible. En un ejemplo, una muestra de semillas con contenidos en aceite equivalentes dio resultados que abarcaban desde ninguna señal en absoluto procedente de alguna de las semillas hasta una intensidad de señal detectable máxima procedente de otras. Una solución inesperada a este problema se encontró incrementando la intensidad de gradiente de campo provocando, así, una disminución en el grosor de la rodaja y un incremento en el número de rodajas requeridas para obtener imágenes de la totalidad de la altura de la muestra. Esta solución fue no intuitiva ya que: (1) es conocido comúnmente que obtener imágenes de un volumen menor (como ocurre cuando se obtienen imágenes de una rodaja más delgada) da como resultado señales más débiles, ya que hay menos material que contribuya a la señal, y (2) obtener imágenes de rodajas más delgadas requiere obtener imágenes de más rodajas, con el fin de obtener datos de imagen procedentes del mismo volumen y, por lo tanto, el experimento podría durar más.

El grosor óptimo de la rodaja de imagen se puede determinar rápida y fácilmente por alguien con los conocimientos ordinarios de la técnica siguiendo estos pasos: (1) obtener una muestra de semillas con un contenido en aceite

conocido; (2) seleccionar un grosor de rodaja de imagen inicial; (3) obtener datos IRM de la muestra de semillas con ese grosor de rodaja de imagen; (4) comparar el contenido relativo en aceite, medido mediante IRM, con el contenido relativo en aceite de las semillas conocido; y (5) si el contenido relativo en aceite de la semilla medido no se corresponde con el contenido relativo en aceite de la semilla conocido, reducir el grosor de la rodaja de imagen y repetir los pasos (3)-(5) hasta que el contenido relativo en aceite medido mediante IRM se corresponda con el contenido relativo en aceite de las semillas.

Un ejemplo de cómo el grosor de la rodaja de imagen se ajusta a un grosor inferior al grosor de la semilla se muestra en la figura 3. En esta figura, se muestran rodajas de imagen subsecuentes. La cuarta, quinta y sexta tramas de la línea superior muestran datos adquiridos a partir de una capa individual de semillas. En el análisis final, estas tramas se combinan en una imagen individual (véase la figura 4a). Los datos analizados de la imagen combinada reflejan de modo preciso el contenido relativo en aceite de las semillas, mientras que un experimento análogo que recoge datos de la capa completa de semillas en una imagen no lo hace. En la figura 3, el grosor de la rodaja se fijó en 5 mm, aproximadamente. Aunque el grosor de rodaja óptimo depende, generalmente, del grosor de las semillas de la que se van a obtener imágenes, se contempla de modo general que el grosor de rodaja óptimo es inferior a, aproximadamente, 1 cm, preferiblemente 5 mm, aproximadamente. El grosor de rodaja óptimo es aproximadamente inferior al 95% del grosor de las semillas de las que se van a obtener imágenes, preferiblemente inferior al 80%, aproximadamente, del grosor de la semilla, y más preferiblemente, el 75% del grosor de la semilla, aproximadamente. El grosor de la rodaja tendría que determinarse independientemente en base a los tamaños de las semillas de las que se van a obtener imágenes. Se podría determinar un límite inferior por debajo del cual una reducción adicional del grosor de la rodaja no sería necesaria.

Un tercer criterio para determinar los gradientes de campo apropiados es que el número de píxeles en cada capa de imagen debería ser suficiente para resolver las semillas mediante suficientes píxeles para evitar la diafonía entre píxeles. La diafonía entre píxeles ocurre cuando un píxel de imagen contiene datos derivados de señales procedentes de más de una semilla. Los objetivos en competencia para este criterio son minimizar el número de píxeles requeridos para obtener la imagen de una capa, minimizando así el tiempo requerido para adquirir los datos de una capa, pero tener un número de píxeles suficiente para evitar la diafonía entre píxeles. Si el número de píxeles es insuficiente para evitar la diafonía entre píxeles, entonces los datos para una semilla particular estarán contaminados con datos correspondientes a las semillas contiguas y, por lo tanto, se reduce la precisión para mediciones de características tales como el contenido relativo en aceite. El número óptimo de píxeles requerido para obtener la imagen de una capa depende de la densidad de semillas en la capa y del tamaño de las semillas, requiriéndose más píxeles para densidades mayores y semillas más pequeñas, y de un parámetro relacionado, el espaciado entre 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 lo 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 debería ser suficiente para representar una semilla individual mediante entre 1 y 40 píxeles, preferiblemente entre 1 y 20 píxeles, y más preferiblemente entre 4 y 10 píxeles.

#### *Procedimientos para analizar y clasificar las semillas*

El análisis de semillas descrito anteriormente se puede coordinar con un dispositivo de clasificación que clasifica y/o pesa cada semilla individualmente. En esta realización, el dispositivo de muestreo tiene particiones para separar las semillas individuales en celdas. El fondo del dispositivo de muestreo comprende trampillas que se pueden abrir diferencialmente para liberar cualquiera o todas las semillas, dependiendo del criterio de selección programado. Alternativamente, el dispositivo de clasificación puede comprender paletas móviles controlables diferencialmente para cada celda en el dispositivo de muestreo, permitiendo por ello la descarga simultánea de semillas al dispositivo de clasificación.

#### *Procedimientos para analizar múltiples características*

Se puede extraer información química cuantitativa para la muestra de los datos espectrales recogidos en un experimento IRM. Es bien conocido que los protones de moléculas orgánicas poliatómicas contenidas en materiales biológicos exhiben desplazamientos químicos y dispersiones característicos basadas en sus grupos funcionales locales y en los protones próximos. Utilizando espectroscopia de multivolumen o multivoxel, se puede medir un espectro completo RMN para cada elemento de volumen dentro de la muestra. Tales mediciones proporcionan tremendas cantidades de información acerca de cada semilla dentro de la muestra. Cuando se utiliza como un sistema de obtención de imágenes espectrales, la presente invención proporciona muchas ventajas. Debido a que los datos espectrales se pueden recoger de cada unidad de la muestra, se pueden obtener datos más precisos para muestras de granos a granel.

Aunque las realizaciones ilustradas de la presente invención incluyen la obtención de imágenes por resonancia magnética en la región espectral de radiofrecuencia, se podrían utilizar otras regiones espectrales, tales como la región de microondas, por ejemplo, en un experimento de resonancia de espín de electrón. Además, como es sabido por aquellos expertos en la técnica, en los experimentos de resonancia magnética, que incluyen los experimentos de obtención de imágenes por resonancia magnética, se pueden utilizar otros núcleos, además de protones. Tales núcleos incluyen  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{N}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$  y  $^{35}\text{Cl}$ .

## ES 2 289 011 T3

En una realización alternativa de la invención se pueden utilizar técnicas de obtención de imágenes de pulsos múltiples o procedimientos de retroproyección, conocidos por aquellos expertos en la técnica de la resonancia magnética de estado sólido, en un experimento IRM para cuantificar características distintas al contenido en agua o en aceite. En esta realización, se pueden medir componentes de tejidos vegetales que incluyen, aunque no se limitan a, proteínas, 5 carbohidratos, lignina, celulosa, fibra detergente ácida, fibra detergente neutra y almidón hidratado.

Los procedimientos de la presente invención se puede utilizar para detectar cualquier característica que se pueda medir mediante resonancia magnética. En una realización preferida, la característica es una característica bioquímica. Como se utiliza aquí, una característica bioquímica es cualquier característica que afecta a la composición química de la muestra agrícola. En una realización, la característica bioquímica se selecciona de entre un grupo que consiste en el contenido en aceite, el contenido en proteínas, el contenido en carbohidratos, el contenido almidón, el contenido en fibra y el contenido en agua. Como se utiliza aquí, contenido se refiere a la cantidad de un componente, por ejemplo, 10 5 miligramos (mg) de proteína por semilla o 5 mg de proteína por 10 g de peso en seco de tejido. En otra realización preferida, la característica bioquímica se selecciona de entre un grupo que consiste en la composición de aceite, la composición de proteínas, la composición de carbohidratos, y la composición de fibra. Como se utiliza aquí, composición se refiere a los constituyentes bioquímicos de una muestra agrícola, por ejemplo, la razón de proteínas de alto peso molecular a proteínas de bajo peso molecular o la razón de aceites saturados a aceites no saturados. Características específicas, tales como la composición de aceite, se pueden determinar en la presente invención mediante el uso del experimento de espectroscopia de multivolumen o multivóxel (CSI), en el cual 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. Así pues, el tipo particular de aceite se puede determinar en base al espectro de RMN. La característica más preferida para su análisis por los procedimientos de la invención es el contenido relativo en aceite de las semillas.

En una realización, los procedimientos de la presente invención se utilizan para distinguir muestras de almidón con fenotipos deseables. El almidón procedente del maíz dentado o duro normal está compuesto de, aproximadamente, un 73% de amilopectina (la fracción de almidón con moléculas ramificadas) y un 27% de amilosa (la fracción con moléculas lineales). El maíz céreo (que tiene el gen wx) se encontró por primera vez en China, pero se han encontrado mutaciones céreas, asimismo, en las cepas dentadas americanas. El almidón de esta mutación es 100% amilopectina. El mutante de endospermo propagador de la amilosa (ae) incrementa la fracción de amilosa del almidón hasta el 50% y más. El grano de este maíz se caracteriza por un aspecto manchado, translúcido y parcialmente lleno. Otros varios genes mutantes, ya sean solos o en combinación, afectan a la composición del almidón, cambiando la razón amilosa-amilopectina. La firma característica de gel de almidón opaco producida por el maíz común se atribuye a la fracción de amilosa. Las propiedades del almidón de maíz céreo son el resultado de los coloides líquidos de amilopectina producidos, que tienen una forma pastosa translúcida blanda característica. Estas diferencias en las características del gel de almidón nativo se arrastran a través de los procesos de modificación del almidón y son deseables en ciertas aplicaciones. Los procedimientos de la presente invención pueden discernir rápidamente los diferentes tipos mutantes y se pueden utilizar como una técnica de cribado de los mismos de alto rendimiento, no destructiva.

En otra realización, por ejemplo, los procedimientos de la presente invención se utilizan para identificar muestras que tenga las características de endospermo deseadas. Por ejemplo, se han identificado muchos mutantes de endospermo que alteran el balance de aminoácidos. Ha sido demostrado que las líneas mutantes opaco-2 (o2), harinoso-2 (fl2), y opaco-7 (o7) presentan una reducción de ceínas (la proteína del maíz que carece de aminoácidos esenciales tales como la lisina y el triptófano) en el endospermo y un incremento en lisina. Los granos con el gen opaco-2 se caracterizan por una apariencia no transparente, calcárea, blanda, con muy poco endospermo vítreo duro. Los procedimientos de la presente invención se puede utilizar para discernir los diferentes tipos mutantes y los niveles de lisina y, por lo tanto, se pueden utilizar como una técnica de cribado para esta característica de alto rendimiento, no destructiva.

En otra realización, la característica es una característica morfológica. Como se utiliza aquí, una característica morfológica es cualquier característica estructural. Las características morfológicas preferidas son el tamaño de endospermo, el tamaño de 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 se puede correlacionar con la resistencia o la susceptibilidad a las enfermedades. La presencia de agujeros en la cubierta de una semilla es, a menudo, un indicativo de infestación por insectos.

La correlación entre el estado de enfermedad con cambios estructurales tales como agujeros se puede establecer demandando que las muestras de las semillas sean probadas con el organismo. Como se utiliza aquí, una "muestra" se refiere una pluralidad de semillas.

Los controles pueden incluir semillas conocidas por ser resistentes y susceptibles. La correlación entre la enfermedad y un cambio estructural particular se puede establecer mediante un análisis estadístico adecuado. Se entiende que no se necesitan realizar controles frente una semilla o lote de semillas particular una vez que se establecido una correlación.

Se pueden analizar simultáneamente una o más de las características descritas anteriormente o cualquier otra característica que sea detectable utilizando obtención de imágenes por resonancia magnética mediante los procedimientos de la presente invención. En una realización, se analizan simultáneamente dos o más de las características anteriores u otras características. En otra realización, se analizan simultáneamente tres, cuatro, cinco o más de las características anteriores u otras características medibles mediante IRM.

*Sistemas analíticos*

Se puede preparar una muestra para su análisis con un sistema de obtención de imágenes de espectroscopia con un dispositivo de procesamiento. Como se utiliza aquí, un “dispositivo de procesamiento” es cualquier dispositivo que es capaz de separar las porciones deseadas de una planta del resto de la planta o parte de la planta. En una realización preferida, el dispositivo de procesamiento es una descascaradora, una trilladora, o una combinación. La descascaradora puede ser, por ejemplo, una descascaradora de mazorcas de maíz individuales modificada Almaco (Almaco, 99 M Avenue, PO Box 296, Nevada, IA 50201). Como se utiliza aquí, “producir una muestra” se refiere a cualquier procedimiento que un dispositivo de procesamiento pueda utilizar para separar la porción deseada de la planta del resto de la planta o parte de la planta.

Tras la preparación de la muestra con el dispositivo de procesamiento, ésta se analiza mediante obtención de imágenes por resonancia magnética. Tras el análisis de IRM, la muestra se puede clasificar automáticamente con un dispositivo de clasificación.

Como se utiliza aquí, un “dispositivo de clasificación” es cualquier dispositivo que sea capaz de separar la muestra en al menos dos casilleros diferentes dependiendo de los resultados del análisis. Un dispositivo de clasificación puede ser, por ejemplo, una paleta móvil individual que dirige la muestra en una de dos direcciones. En una realización preferida, un dispositivo de clasificación es capaz de clasificar independientemente 10, 20, 50 o 100 semillas individuales. Como se utiliza aquí, un “casillero” es cualquier dispositivo que puede albergar una porción de la muestra separadamente de otras porciones.

En una realización preferida, el dispositivo de clasificación es capaz de clasificar un lote individual de semillas en una de una multiplicidad de casilleros. Este tipo de clasificación es el más útil si durante el análisis se está examinando más de una característica individual.

En una realización preferida, un dispositivo de procesamiento y un dispositivo de clasificación se acoplan a un dispositivo de muestreo y a un sistema de obtención de imágenes por espectroscopia para proporcionar un dispositivo para suministrar automáticamente una muestra, analizar una muestra y clasificar una muestra. En una realización preferida, una muestra se puede suministrar, analizar y clasificar a una velocidad superior a una cada cinco minutos, más preferiblemente superior a una cada minuto.

*Procedimientos de obtención selectiva basados en características analizadas*

La presente invención proporciona procedimientos analíticos para el análisis de semillas que tienen una característica deseada. En un aspecto de la invención, el procedimiento analítico permite el análisis de porciones o atributos discretos de una semilla individual. Además, en otro aspecto de la presente invención, los procedimientos analíticos permiten el análisis de semillas individuales que están presentes en un lote o en una muestra a granel, de tal manera que se puede determinar la distribución de una característica. La utilización de la presente invención para analizar el contenido de aceite en las semillas es de particular interés.

Los procedimientos de la presente invención se pueden utilizar en un programa de obtención para seleccionar plantas o semillas que tengan una característica deseada.

La presente invención se puede utilizar en un procedimiento de introgresión de una característica en una planta.

Los procedimientos de introgresión y selección se pueden utilizar en combinación con cualquier metodología de obtención y se pueden utilizar para seleccionar una generación individual o para seleccionar múltiples generaciones. La elección del procedimiento de obtención depende del mecanismo de reproducción de la planta, la heredabilidad de la(s) característica(s) que se va(n) modificar, y el tipo de cultivo utilizado comercialmente (por ejemplo, un cultivo híbrido F1, una línea de cultivo pura, etc.). A continuación, se indican aproximaciones seleccionadas, no limitativas, para obtener plantas. Se entiende además que cualquier cultivo, comercial y no comercial, se puede utilizar en un programa de obtención. Factores tales como, por ejemplo, el vigor de emergencia, el vigor vegetativo, la tolerancia al estrés, la resistencia las enfermedades, la ramificación, el florecimiento, los óvulos producidos por carpelo, el tamaño de semilla, la densidad de las semillas, la erectabilidad, la capacidad de trillado, etcétera, dictarán por lo general la elección. Para características altamente heredables, una elección de plantas individuales superiores, evaluadas en una localización única será efectiva, mientras que para características con baja heredabilidad, la selección debería basarse en valores medios obtenidos de evaluaciones replicadas de familias de plantas relacionadas. Los procedimientos de selección de poblaciones populares incluyen habitualmente la selección del linaje, la selección del linaje modificado, la selección masiva, y la selección recurrente, aunque no se limitan a éstos. En una realización preferida, se lleva a cabo un programa de obtención recurrente o retrocruzada.

La complejidad de la herencia influye en la elección del procedimiento de obtención. La selección retrocruzada se puede utilizar para transferir uno o unos cuantos genes favorables para una característica altamente heredable a un cultivo deseable. Esta aproximación se usó extensivamente para obtener cultivos resistentes a las enfermedades. Varias técnicas de selección recurrente se utilizan para mejorar cuantitativamente las características heredadas controladas por numerosos genes. El uso de la selección recurrente en cultivos autopolinizantes depende de la facilidad de polinización, la frecuencia de híbridos exitosos de cada polinización, y la cantidad de descendencia híbrida de cada cruce exitoso.

Las líneas de obtención se pueden probar y comparar con los estándares apropiados en entornos representativos del(de las) área(s) comercial(es) objetivo para dos o más generaciones. Las mejores líneas son candidatas para nuevos cultivos comerciales; aquéllas aún deficientes en características se pueden utilizar como progenitores para producir nuevas poblaciones para una selección posterior.

Un procedimiento para identificar una planta superior es observar su rendimiento en relación a otras plantas experimentales y a cultivos estándar ampliamente cultivados. Si una observación individual no es concluyente, observaciones replicadas pueden suministrar una mejor estimación de su valor genético. Un obtentor puede seleccionar y cruzar dos o más líneas de parentesco, seguido por una autofecundación y selección repetidas, que producen muchas combinaciones genéticas nuevas.

El desarrollo de nuevos cultivos de soja supone el desarrollo y selección de variedades de soja, el cruce de estas variedades y la selección de los cruces híbridos superiores. La semilla híbrida se puede producir mediante cruces manuales entre progenitores fértiles masculinos seleccionados o mediante el uso de sistemas de esterilización masculinos. Los híbridos se selecciona para ciertas características de genes individuales, tales como el color de la vaina, el color de la flor, el rendimiento de la semilla, el color pubescente o la resistencia a los herbicidas, que indican que la semilla es verdaderamente un híbrido. Datos adicionales sobre las líneas de parentesco, así como el fenotipo del híbrido, influyen en la decisión del obtentor sobre si continuar con un cruce híbrido específico.

Los procedimientos de obtención de selección recurrente y de obtención por linaje se pueden utilizar para desarrollar cultivos a partir de poblaciones obtenidas. Los programas de obtención combinan características deseables de dos o más cultivos o de varias fuentes de base amplia en estanques reproductores, a partir de los cuales se desarrollan los cultivos mediante autofecundación y selección de los fenotipo deseados. Se pueden evaluar nuevos cultivos para determinar los que tienen potencial comercial.

La obtención por linaje se utiliza habitualmente para mejorar los cultivos autopolinizantes. Dos progenitores que posean características complementarias favorables se cruzan para producir una población F1. Una población F2 se produce mediante autofecundación de uno o varios F1s. Se seleccionan los mejores individuos de las mejores familias. La prueba replicada de familias puede comenzar en la generación F4 para mejorar la efectividad de la selección de características con baja heredabilidad. En una etapa avanzada de reproducción consanguínea (esto es, F6 y F7), las mejores líneas o mezclas de líneas fenotípicamente similares se prueban para su liberación potencial como nuevos cultivos.

La obtención retrocruzada ha sido utilizada para transferir genes de una característica altamente heredable simplemente heredada, a un cultivo homocigótico deseable o línea consanguínea, que es el progenitor recurrente. La fuente de la característica que se va transferir se denomina progenitor donante. Se espera que la planta resultante tenga los atributos del progenitor recurrente (por ejemplo, el cultivo) y la característica deseable transferida por el progenitor donante. Tras el cruzamiento inicial, los individuos que poseen el fenotipo del progenitor donante se seleccionan y se cruzan repetidamente (retrocruzan) con el progenitor recurrente. Se espera que el progenitor resultante tenga los mismos atributos que el progenitor recurrente (por ejemplo, el cultivo) y la característica deseable transferida por el progenitor donante.

El procedimiento de descendencia de semilla única se refiere al plantado de una población segregada, la recogida de una muestra de una semilla por planta, y la utilización de la muestra de una semilla para plantar la siguiente generación. Cuando la población se ha propagado desde F2 hasta el nivel deseado de consanguinidad, las plantas de las cuales se derivan líneas se remontan cada una a diferentes individuos F2. El número de plantas en una población declina cada generación, debido al fracaso de algunas semillas a la hora de germinar o de algunas plantas a la hora de producir al menos una semilla. Como resultado, no todas las plantas F2 originalmente muestreadas en la población serán representadas mediante una progenie cuando el progreso generacional se complete.

En un procedimiento de semilla múltiple, por ejemplo, los obtentores de soja recolectan, comúnmente, una o más vainas de cada planta en una población y las trillan juntas para formar un volumen. Parte del volumen se utiliza para plantar la siguiente generación y parte se reserva. El procedimiento se ha denominado como descendencia de semilla única modificada o técnica de vaina-volumen.

El procedimiento de semilla múltiple se ha utilizado para ahorrar mano de obra en la recolección. Es considerablemente más rápido trillar vainas a máquina que retirar a mano una semilla de cada una para el procedimiento de semilla individual. El procedimiento de semilla múltiple hace posible, asimismo, plantar el mismo número de semillas de una población cada generación de consanguinidad.

En una realización, la presente invención se utiliza para distinguir muestras haploides de muestras no haploides. La utilización de plantas haploides incrementa la eficacia de la selección recurrente en programas de obtención de plantas proporcionando un modo de producir líneas completamente homocigóticas a partir de líneas haploides dobles. Debido a que los haploides son hemicingóticos, esto es, sólo un alelo por locus, son útiles para los estudios de mutaciones y la selección frente a alelos recesivos no deseables. Los procedimientos de la presente invención se pueden utilizar para discriminar muestras haploides de otros tipos de muestras, tales como diploides. Cualquier característica haploide que produzca un fenotipo que produzca luz reflejada o transmitida que tenga una composición espectral diferente de la de una muestra no haploide se puede determinar con los procedimientos de la presente invención. Por ejemplo, algunas

líneas genéticas arrastran marcadores de genes tales como R-nj, que hacen posible identificar los haploides en la etapa de semillas maduras por la coloración de antocianina de la parte superior del endospermo y la ausencia de coloración en el embrión. Los procedimientos de la presente invención pueden discernir rápidamente la presencia o ausencia de estos fenotipos en la localización requerida sobre la semilla.

5

Se pueden encontrar descripciones de otros procedimientos de obtención que son de uso habitual para diferentes características y cultivos en varios libros de referencia. Véase, por ejemplo, Fehr, Principles of cultivar development Vol. 1, pp 2-3 (1987).

10

En una realización preferida, la característica de obtención de interés es el nivel de aceite o su composición. En una realización todavía más preferida, la planta sujeta al programa de obtención es una planta de maíz y la característica de interés es el nivel de aceite.

15

Los siguientes ejemplos son tan sólo ilustrativos. No se pretende que la presente invención se limite a las realizaciones ilustradas.

#### Ejemplo 1

20

Se obtienen imágenes de granos de maíz mediante un escáner Magnetom™ Vision MR (Siemens, Erlangen) de 1,5 teslas, mediante el uso de un resonador de cuerpo entero. La intensidad del gradiente se ajusta a 25 mT/m en todos los ejes. Con el impulsor de gradiente, el tiempo de rampa hasta la intensidad total fue de 312 ms. Las capacidades del gradiente total del gradiente fijado no se utilizan en la secuencia de obtención de imágenes de la semilla. Se utiliza una secuencia de eco de espín ( $tr/te = 1920/17$  ms) con un ángulo de desviación de excitación de  $90^\circ$  y un ángulo de desviación de reenfoque de  $180^\circ$ . El ancho de banda del receptor es de 130 Hz/píxel. El campo de visión se ajusta a 450 x 450 mm. La matriz de datos obtenida es de 256 x 256. Las imágenes obtenidas de cada cubo de muestra consisten en 50 rodajas coronales contiguas, adquiridas utilizando la opción de intercalamiento, posicionadas de tal manera que existe al menos una rodaja sin muestra entre cada capa de muestras en el cubo. Para los estándares de calibración de aceite de maíz, se obtienen dos barridos con la ganancia del receptor ajustada a 97,98 decibelios, y el factor de escala FFT ajustado a 0,007114.

30

Las muestras cúbicas para los análisis de IRM de semillas de maíz en estos experimentos contienen 108 placas de 24 pozos. Estas se disponen en 9 capas de 12 placas cada una. Esta disposición proporciona una capacidad analítica total de 2592 semillas de maíz individuales por cubo de muestra.

#### 35 *Análisis de errores*

La exactitud y precisión del análisis de alto rendimiento para el contenido en aceite mediante el uso de IRM se resume y se puede seguir utilizando las figuras 8-12. En general, los procedimientos de IRM son más útiles para semillas oleaginosas que contienen más de 1% de aceite en peso, aunque estos procedimientos son útiles, asimismo, para semillas oleaginosas que contengan menos del 1% de aceite en peso. Semillas con niveles de aceite inferiores generan intensidad de señal inferiores. La sensibilidad de la técnica se puede mejorar para detectar contenidos en aceite inferiores, disminuyendo, por ejemplo, el límite umbral, incrementando los tiempos de muestreo (o sensibilidad), o mejorando de otro modo el rendimiento del escáner IRM.

45

Comparación con medidas en volumen. El promedio del contenido en aceite sobre un grupo grande de semillas, determinado mediante el uso de IRM, debería correlacionar con el contenido en aceite en volumen para las semillas medidas con una técnica alternativa, por ejemplo, espectroscopia IR. Esta correlación se ilustra en la figura 8, que muestra un fuerte acuerdo entre los dos procedimientos:  $y = 1,0322x + 1,9726$ ;  $R^2 = 0,9232$ . Debido a que los resultados de aceite por IRM se publican como magnitudes relativas, estos valores son inferiores (en una constante) a los resultados obtenidos de las medidas de aceite en volumen. Las magnitudes de IRM relativas más bajas son esperables debido a las pérdidas de señal atribuidas a los procesos de relajación que se sabe que tienen lugar en el experimento de IRM.

50

Comparaciones entre las mediciones de aceite con IRM intradía y entre días. Los datos obtenidos mediante el uso de procedimientos IRM deberían correlacionar para distintas ejecuciones sobre la misma muestra, ya se haya efectuado la adquisición de datos en el mismo día o en días diferentes. Estas comparaciones en el mismo día y en días diferentes para un estándar de calibración de aceite de maíz se muestran en las figuras 9 y 10, respectivamente. Estos datos muestran una buena correlación para múltiples ejecuciones sobre la misma muestra en ambos casos (mismo día:  $y = 1,0007x$ ,  $R^2 = 0,9267$ ; días diferentes:  $y = 0,9992x$ ;  $R^2 = 0,8435$ ).

60

Variación en las mediciones de IRM con diferentes instrumentos. La bobina de detección de RF de la señal de IRM es el componente principal del equipo que puede afectar a la sensibilidad de la razón señal-ruido en el experimento de IRM. Cada bobina de RF posee un perfil de rendimiento que es característico de su construcción y de su geometría física. Los resultados obtenidos en dos dispositivos diferentes se pueden comparar para confirmar la reproductibilidad entre dos montajes del equipo. Tal comparación se muestra en la figura 11 entre una bobina de detección de IRM Varian (Varian Inc, Palo Alto, CA) y una Monsanto (Monsanto, St Louis, MO), utilizando una muestra de aceite estándar. Ambos detectores dan resultados esencialmente idénticos para la intensidad de la señal de IRM sobre una cantidad medida de aceite de maíz en la muestra estándar ( $y = 1,0413x - 0,1725$ ;  $R^2 = 0,9452$ ).

65

## ES 2 289 011 T3

5 Coeficientes de variación para procedimientos de IRM. El coeficiente de variación para los datos de IRM medidos para cada capa en un cubo de muestra proporciona una estimación razonable del error en la medición de IRM. Un mapa para cada una de las nueve capas en uno de los cubos estándar de calibración se muestra en la figura 12, en la que se grafica el porcentaje de desviación estándar (N = 8) relativo al valor medio para cada posición de pozo en el cubo. Aproximadamente el 90% de las posiciones de pozo en la mayoría de las capas muestran menos de un 5% de error, y el resto de las posiciones muestran un 5-10%. Un par de posiciones, por ejemplo la esquina superior izquierda de la capa 1, muestran un error superior a 10%. Se pueden esperar errores mayores cerca de las esquinas del cubo en relación al centro del mismo, en donde la homogeneidad del campo magnético y la respuesta de la señal de IRM se degrada.

### 10 Ejemplo 2

15 Bandejas de muestras de 48 pozos se cargan con semillas oleaginosas que incluyen maíz, soja y colza. En un soporte de muestras de plexiglás se colocan dos apilamientos de 5 placas, que contiene semillas individuales, para formar un montaje que comprende un total de 480 semillas. Un montaje de semillas se inserta dentro de una bobina de detección de IRM disponible comercialmente que sea lo suficientemente grande para alojar el soporte de muestras. Una bobina de IRM, que contiene las semillas, se inserta en el imán de IRM para la recogida de datos, utilizando técnicas de adquisición de datos estándar, genéricas. Los datos IRM se envían a un ordenador, en el cual son procesados, utilizando una macro a medida, con el programa Varian Image Browser™ (Varian Inc., Palo Alto, CA) para obtener intensidades de señal de IRM para cada uno de los granos de maíz individuales en la muestra. Los datos resultantes se utilizan para calcular el porcentaje de aceite en peso en cada una de las 480 semillas dentro de la muestra.

### Ejemplo 3

25 Se utiliza un escáner de IRM clínico de 1,5 teslas para analizar una muestra de 3456 semillas, organizadas en 12 capas de 12 bandejas de 24 pozos. El experimento se lleva a cabo de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente en el ejemplo 2.

### Ejemplo 4

30 El contenido en aceite de granos de maíz, determinado mediante el protocolo descrito anteriormente, se utiliza para obtener plantas de maíz con un contenido en aceite superior. El material de partida para la generación 1 es LH185(2) x BHO. Esta semilla se plantó y la planta resultante se usa como hembra en el programa de obtención. Esta planta se cruzó con poblaciones de inducción haploide, que incluyen la Población 6 y la KHI1. La semilla producida se cosecha y se seca. Con ayuda de un sistema de marcación para identificar los granos haploides putativos (sistema R-Navajo), las semillas haploides se aíslan de las semillas producidas. Esta semilla se analiza a continuación utilizando el procedimiento establecido anteriormente en el Ejemplo 1 para identificar las semillas con el mayor contenido en aceite. Sólo las semillas con el mayor contenido en aceite se propagan a la siguiente generación. En la generación 2, estos granos se plantan y se tratan con un agente duplicador de cromosomas para producir líneas consanguíneas dihaploides.

### Ejemplo 5

45 Las semillas de las plantas resultantes del Ejemplo 4 se plantan y las plantas resultantes fueron polinizadas con KHI1. Tras la recolección y el secado, los granos haploides putativos se seleccionaron utilizando el sistema de marcación seleccionable R-Navajo. Estos granos se colocan en placas de 24 pozos y se analizan utilizando IRM como en el Ejemplo 1, para determinar el contenido en aceite. Los granos con el mayor contenido en aceite se seleccionan y plantan. Las plantas resultantes se tratan con un agente duplicador y se autopolinizan para crear líneas consanguíneas dihaploides.

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para determinar si una muestra que comprende una pluralidad de semillas contiene semillas que exhiban una característica, comprendiendo dicho procedimiento:
- (A) disponer cada una de dichas semillas en un compartimiento individual de un dispositivo de muestreo que comprende una pluralidad de compartimientos;
  - 10 (B) generar una imagen de resonancia magnética de dicha muestra;
  - (C) analizar dicha imagen de resonancia magnética para buscar información que indique la presencia de dicha característica;
  - 15 (D) determinar si cada semilla individual en dicha muestra exhibe dicha característica en base a dicho análisis, en el que dicho paso de determinación comprende asociar dichas semillas con elementos de volumen de imagen correspondientes, y
  - (E) clasificar las semillas para separar la(s) semilla(s) individual(es) que exhiban dicha característica.
- 20 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha imagen de resonancia magnética se obtiene utilizando un instrumento de obtención de imágenes por resonancia magnética con un tamaño de orificio de diámetro superior a 20 cm o, preferiblemente, superior a 30 cm.
- 25 3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el tamaño del diámetro del orificio es superior a 40 cm.
4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el tamaño del diámetro del orificio es superior a 50 cm.
- 30 5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha característica es una cantidad de contenido en aceite en cada semilla.
- 35 6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha característica es la composición del aceite de cada semilla.
7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha muestra comprende más de 10 semillas.
8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicha muestra comprende más de 20 semillas.
- 40 9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicha muestra comprende más de 50 semillas.
10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho procedimiento se completa sobre dicha muestra en menos de, aproximadamente, 30 minutos.
- 45 11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicho procedimiento se completa sobre dicha muestra en menos de, aproximadamente, 20 minutos.
12. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el paso de determinar comprende el paso de determinar una cantidad cuantificada de un componente presente en cada semilla en base a dicho análisis.
- 50 13. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la característica detectada es aceite y, adicionalmente, incluye los pasos de:
- 55 medir un peso de cada semilla en la pluralidad de semillas; y
  - calcular el porcentaje relativo de aceite por peso de semilla medido para cada semilla.
14. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, que incluye, adicionalmente, los pasos de:
- 60 procesar una muestra de semillas estándar con un contenido en aceite conocido de acuerdo con los pasos anteriores para determinar un factor de corrección; y
  - 65 utilizar el factor de corrección para corregir el porcentaje relativo calculado de la cantidad de aceite detectada por peso de semilla.

## ES 2 289 011 T3

15. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho dispositivo de muestreo comprende una bandeja de muestras que contiene una pluralidad de pozos, conteniendo cada pozo una semilla de la que se va a obtener imagen.
- 5 16. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 15, en el que la pluralidad de pozos supera la cantidad de 50.
- 10 17. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho dispositivo de muestreo comprende una pluralidad de bandejas de muestras apiladas, conteniendo cada bandeja de muestras una pluralidad de pozos, conteniendo cada pozo una semilla de la que se va a obtener imagen.
- 15 18. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 17, en el que la pluralidad de pozos en cada bandeja supera la cantidad de 50.
- 15 19. Un procedimiento para el análisis de semillas, que comprende los pasos de:
- disponer un soporte de muestras que contiene una capa de semillas;
  - generar una pluralidad de imágenes de resonancia magnética bidimensionales de dicha capa, cada una de dichas imágenes tomada de una rodaja de imagen diferente a través de dicha capa;
  - localizar cada una de la pluralidad de semillas en las imágenes de resonancia magnética bidimensionales;
  - combinar la pluralidad de imágenes de resonancia magnética bidimensionales, tomadas de diferentes rodajas de imagen, en una única imagen de resonancia magnética bidimensional compuesta;
  - procesar una intensidad de imagen de la imagen de resonancia magnética bidimensional compuesta de cada semilla localizada para detectar la presencia de una característica de interés en cada una de dichas semillas localizadas; y
  - clasificar la pluralidad de semillas para separar aquellas que presentan la característica detectada de interés.
20. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 21, en el que el paso de procesar incluye, adicionalmente, el paso de determinar a partir de la imagen de resonancia magnética bidimensional compuesta de la muestra agrícola una cantidad de la característica de interés que se detecta como presente en la semilla localizada.
- 35 21. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 20, que incluye adicionalmente los pasos de:
- medir un peso de cada una de la pluralidad de semillas; y
  - calcular un porcentaje relativo de la cantidad detectada de la característica de interés para la semilla localizada por peso medido de de la semilla.
- 40 22. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 21 que incluye, adicionalmente, los pasos de:
- procesar un estándar de semilla con una cantidad conocida de la característica de acuerdo con los pasos de las reivindicaciones 19-21 para determinar un factor de corrección; y
  - utilizar el factor de corrección para corregir el porcentaje relativo calculado de la cantidad detectada de la característica de interés en peso.
- 45 50 23. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 19, en el que:
- el paso de localizar comprende el paso de filtrar cada una de las imágenes de resonancia magnética bidimensionales para localizar una frontera de cada semilla; y
  - el paso de combinar comprende, adicionalmente, el paso de combinar los datos de intensidad de imagen de cada imagen de resonancia magnética bidimensional que se localiza dentro de las fronteras de la semilla localizada.
- 55 60 24. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 19, en el que la característica de interés comprende el aceite en la semilla, y el paso de procesar la intensidad de imagen detecta una cantidad de aceite presente en la semilla.
- 65 25. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 19, en el que la característica de interés comprende el aceite en la semilla y el paso de procesar la intensidad de imagen detecta un tipo de aceite presente en la semilla.

## ES 2 289 011 T3

26. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 19, que incluye, adicionalmente, el paso de cargar un instrumento de resonancia magnética utilizado para realizar el paso de generar con una muestra fantasma con el fin de compensar la inductancia relativamente pequeña de la semilla.

5 27. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 19, que comprende adicionalmente, el paso de resintonizar un instrumento de resonancia magnética utilizado para realizar el paso de generar con el fin de que sea más sensible y compensar la inductancia relativamente pequeña de las semillas.

10 28. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 19, que comprende, adicionalmente, el paso de ajustar una intensidad de campo gradiente de un instrumento de resonancia magnética utilizado para realizar el paso de generar, de tal manera que el número de rodajas de imagen sea elegido de modo que el número de rodajas de imagen multiplicado por el grosor de cada rodaja sea igual, aproximadamente, a un grosor de las semillas.

15 29. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 28, en el que el grosor de cada rodaja es inferior a, aproximadamente, 1 cm.

30. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 29, en el que el grosor de cada rodaja es inferior a, aproximadamente, 5 mm.

20 31. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 19, en el que el paso de generar utiliza técnicas de obtención de imágenes por resonancia magnética de eco de espín.

25 32. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 19, en el que el paso de generar utiliza técnicas de obtención de imágenes por resonancia magnética de desplazamiento químico.

30 33. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 19, en el que el soporte de muestras contiene una pluralidad de capas, incluyendo cada una de las capas una pluralidad de semillas, y en el que los pasos de la reivindicación 19 se realizan con respecto a cada una de las capas incluidas en el soporte de muestras.

30

35

40

45

50

55

60

65

Análisis IRM de múltiples semillas con  
indicación de aceite de granos de maíz

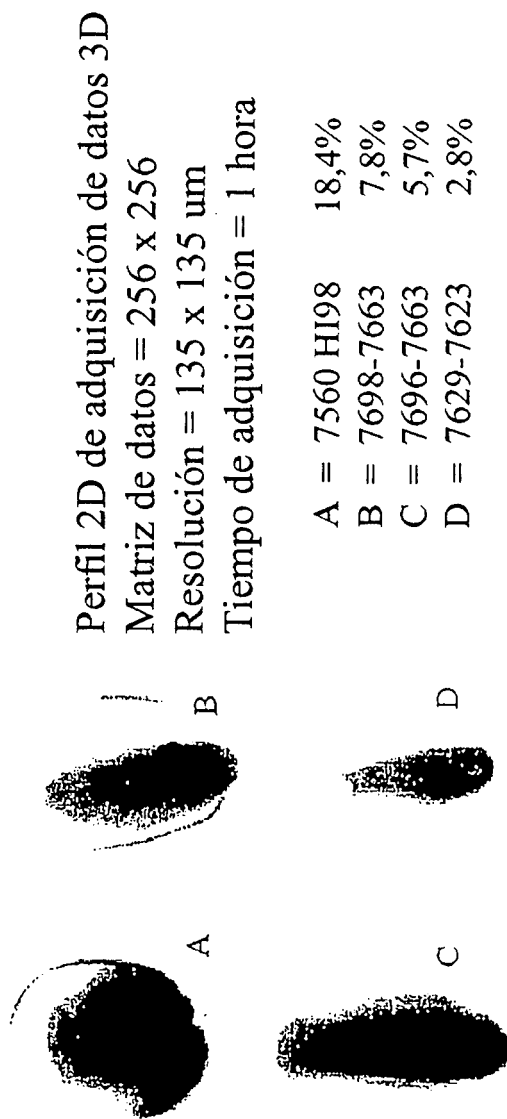


Figura 1

## Análisis de datos IRM de semillas de maíz

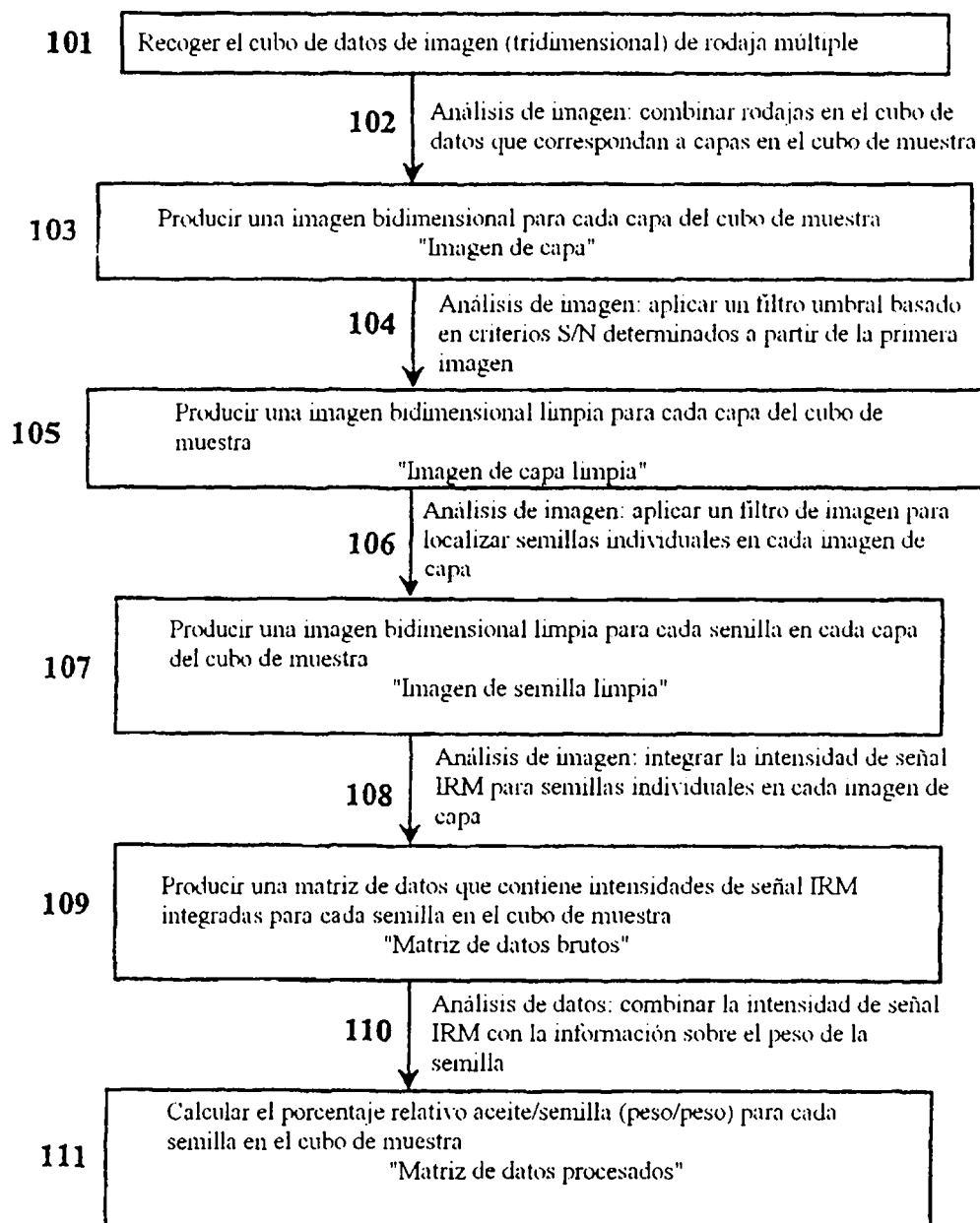


Figura 2

# “Cubo de datos” de imagen de 50 rodajas

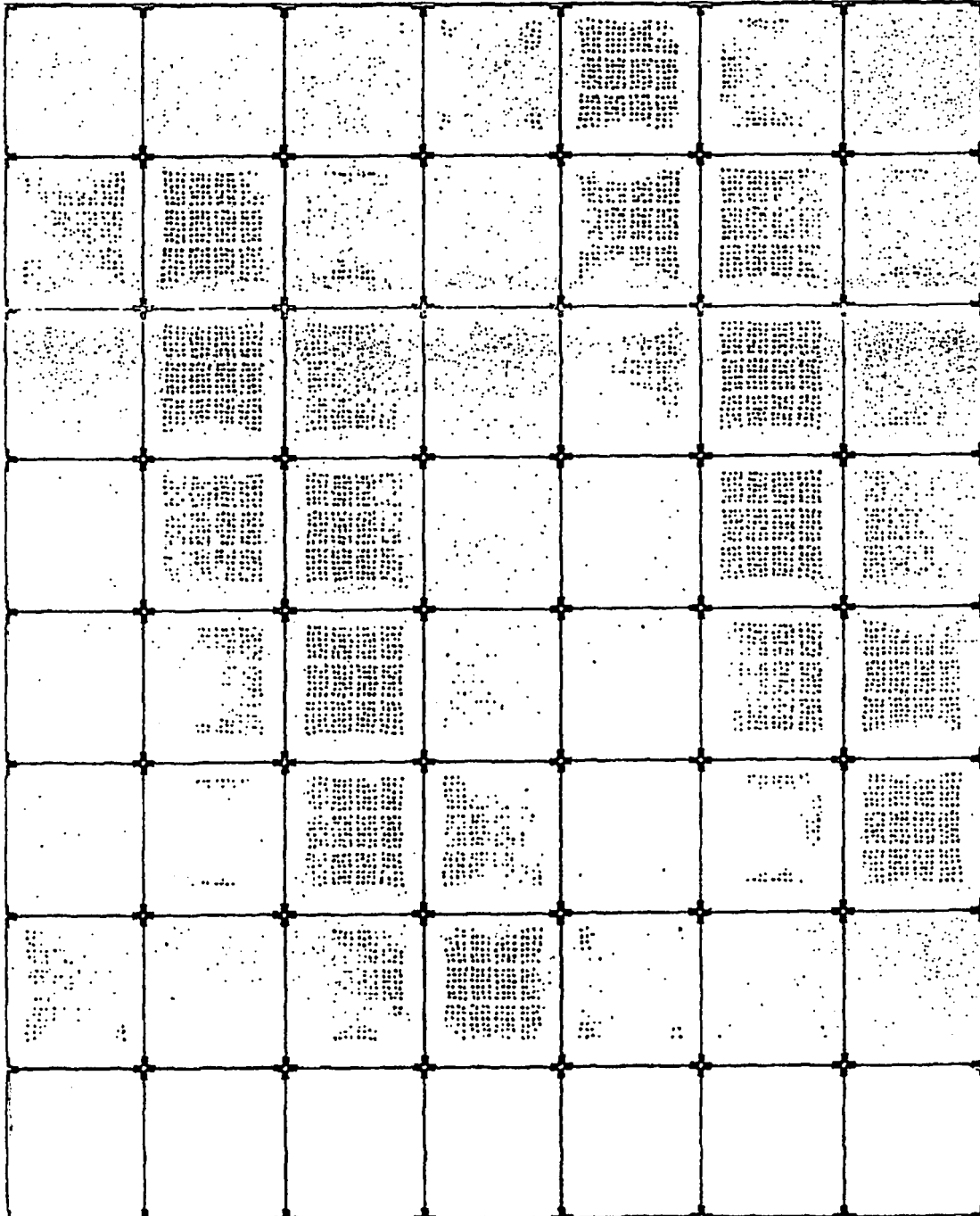


Figura 3

Imagen de la capa

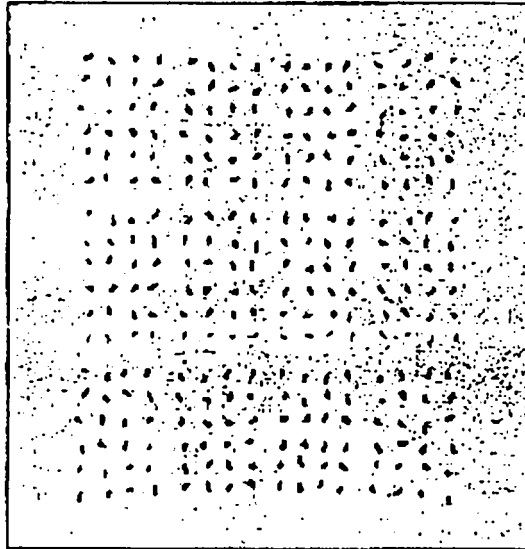


Figura 4a

Imagen de la capa "Limpia"

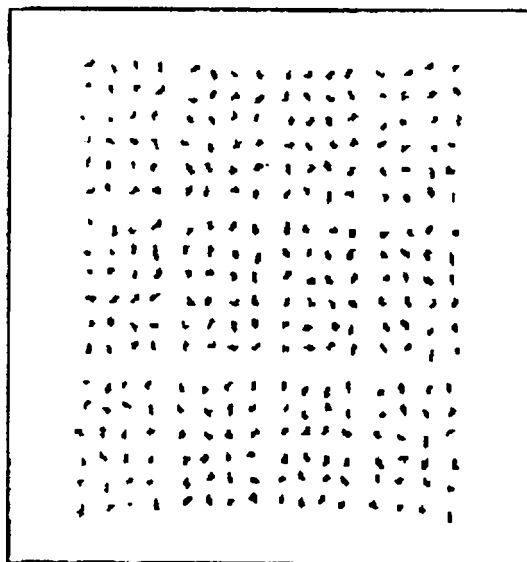


Figura 4b

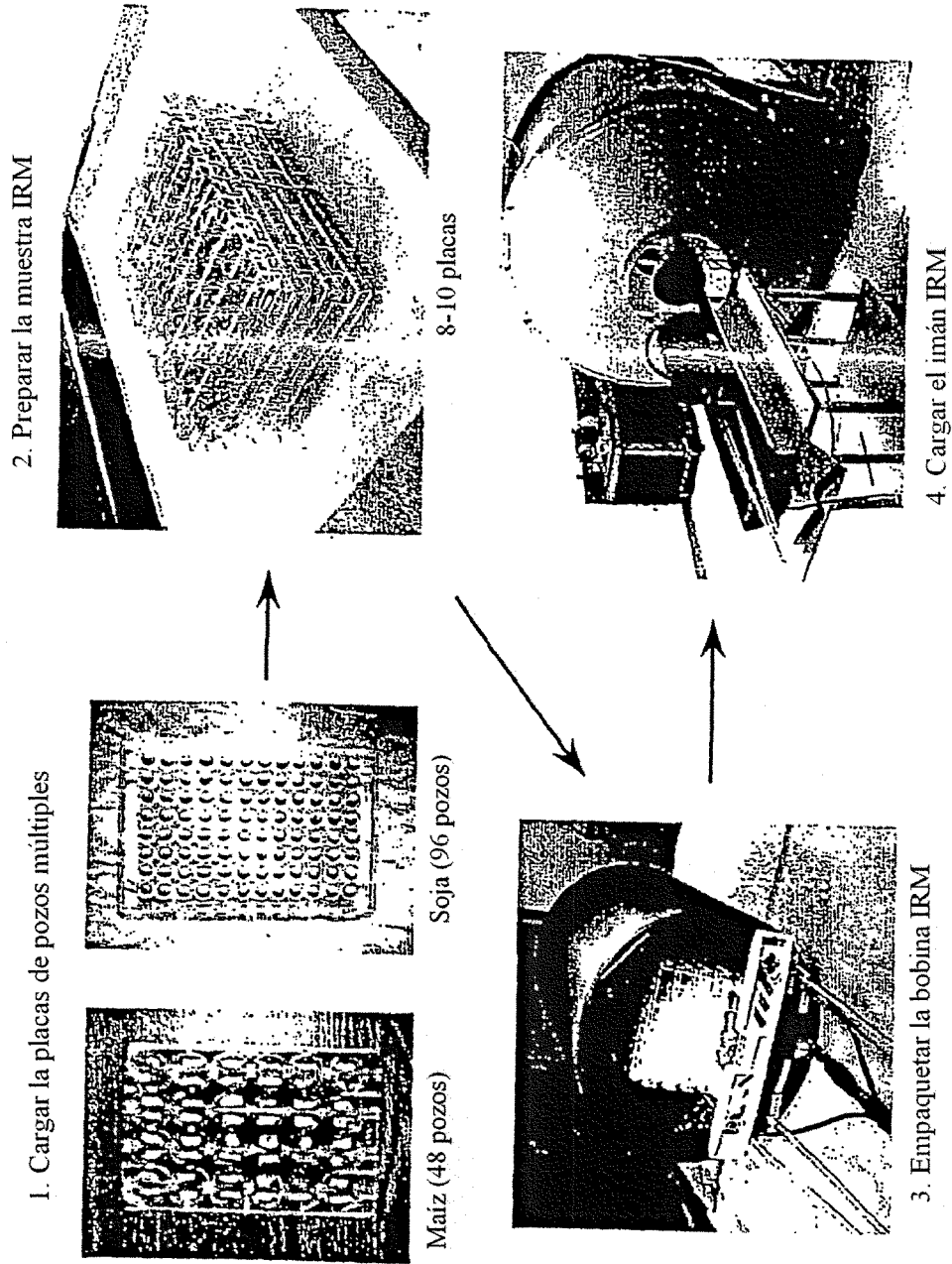


Figura 5

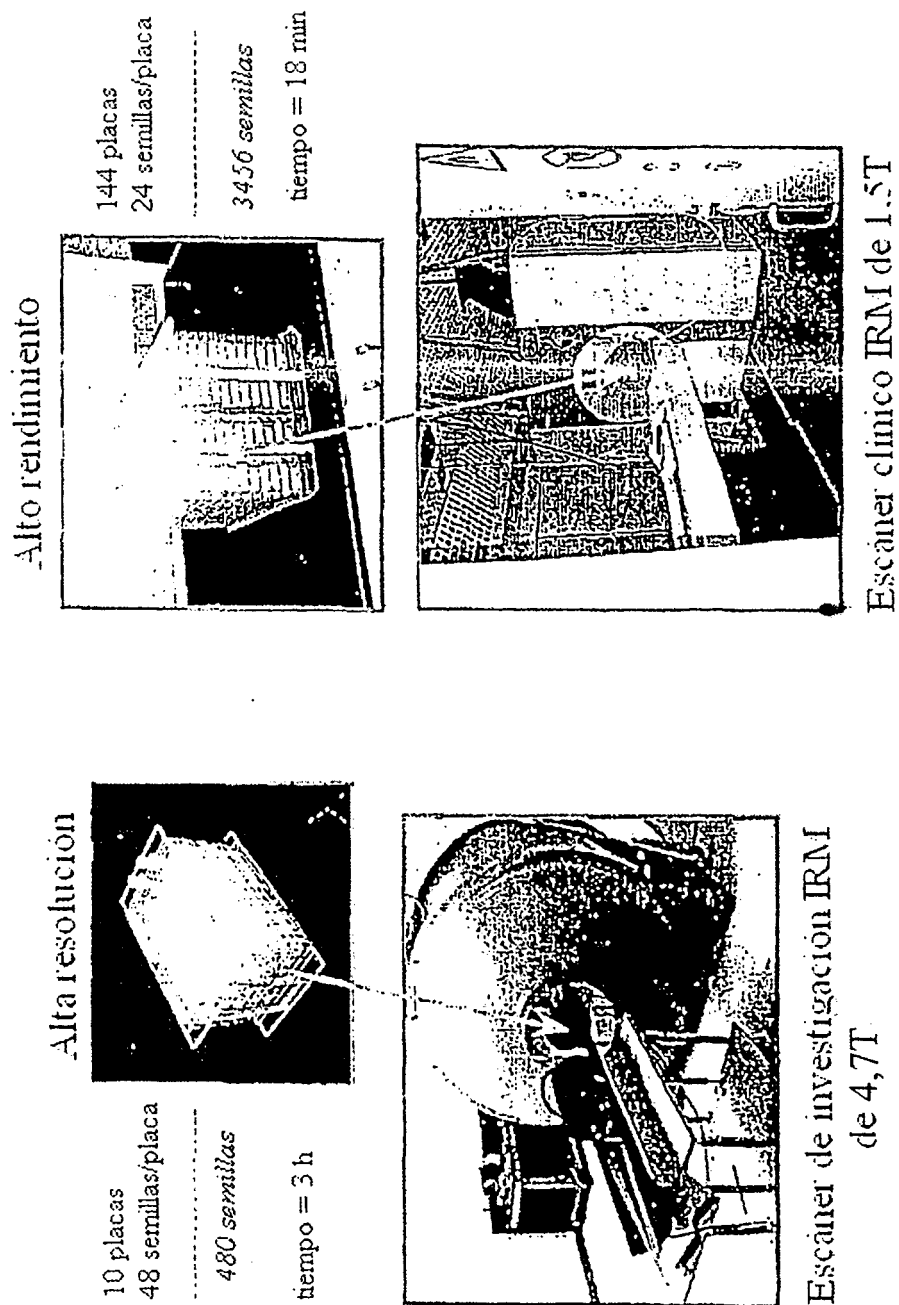
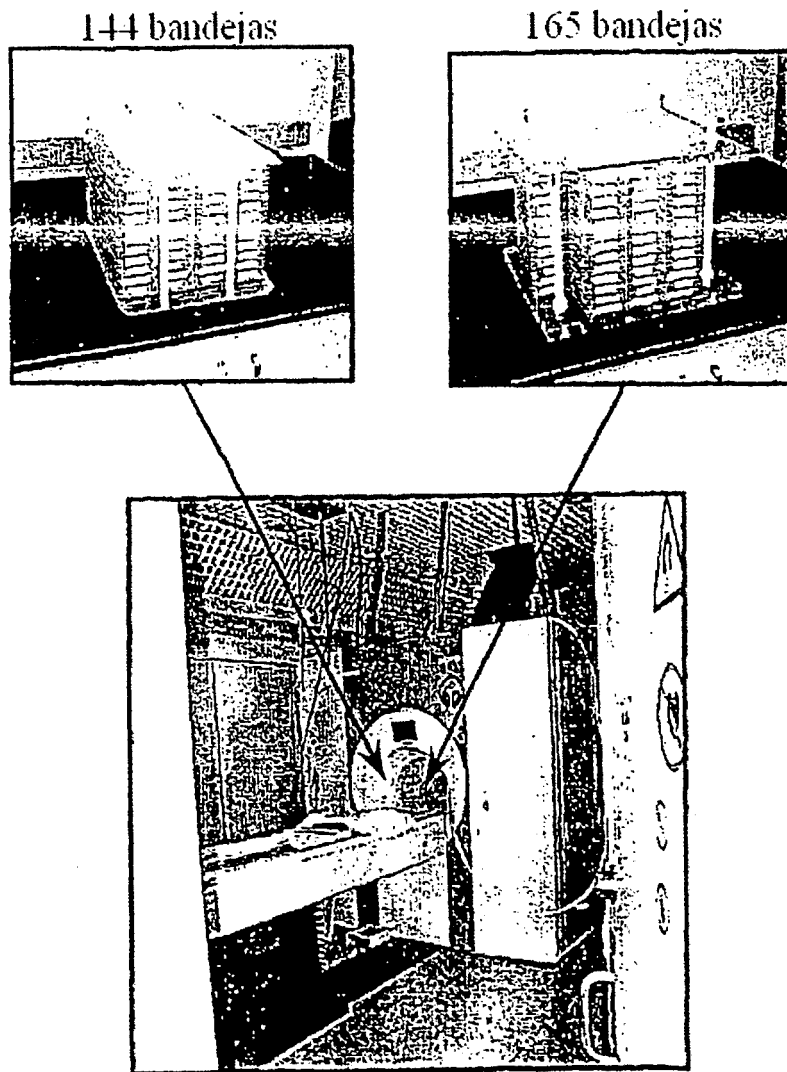


Figura 6b

Figura 6a



Escáner clínico IRM de 1,5T

Figura 7

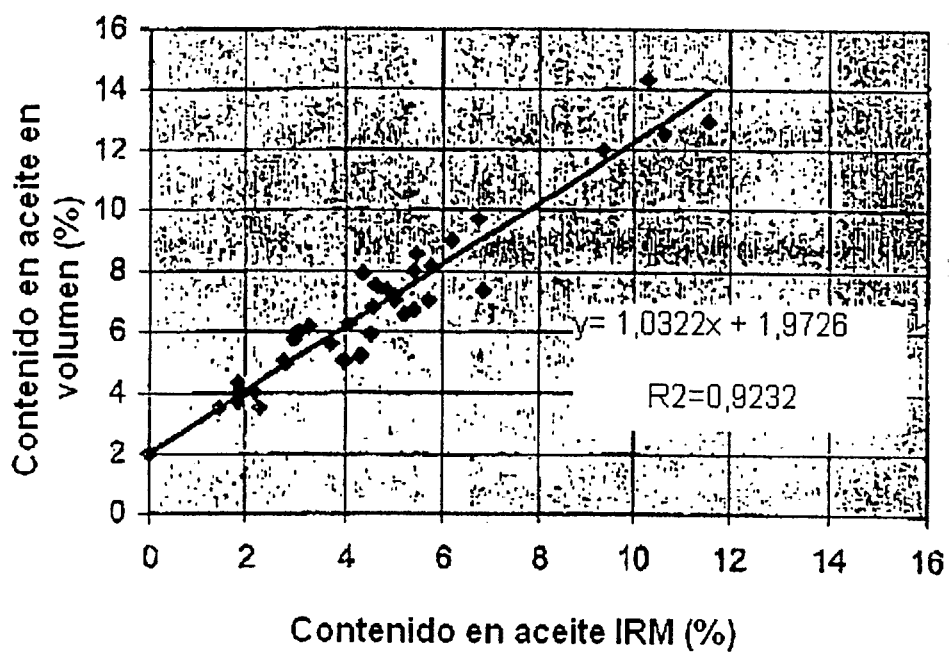


Figura 8

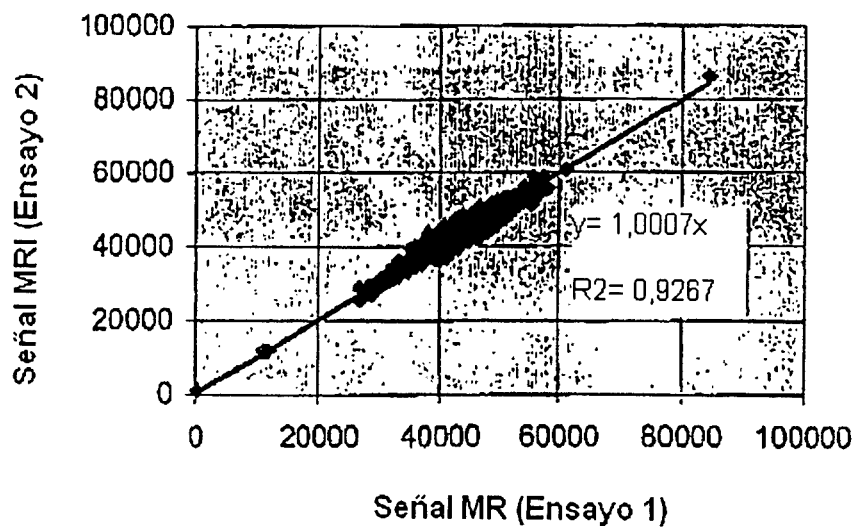


Figura 9

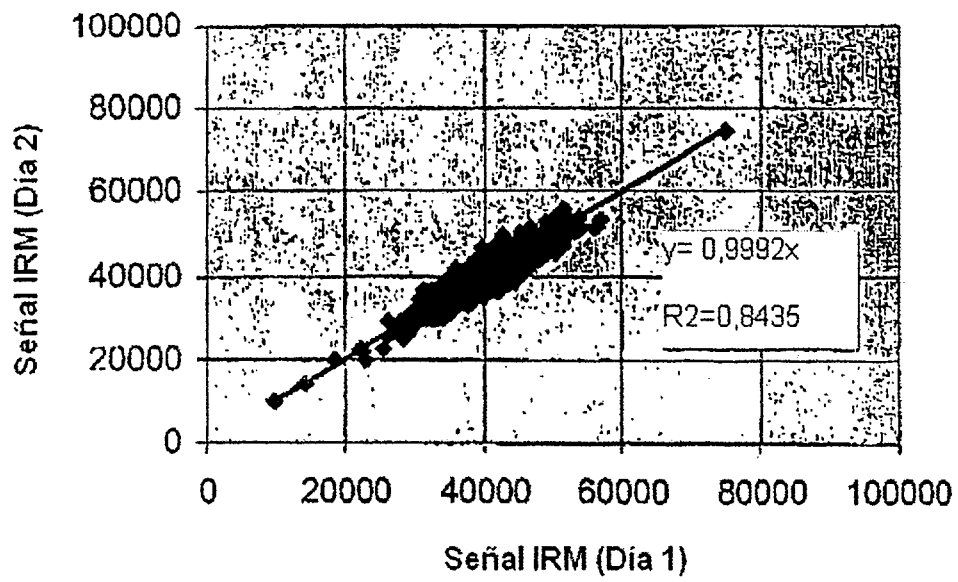


Figura 10

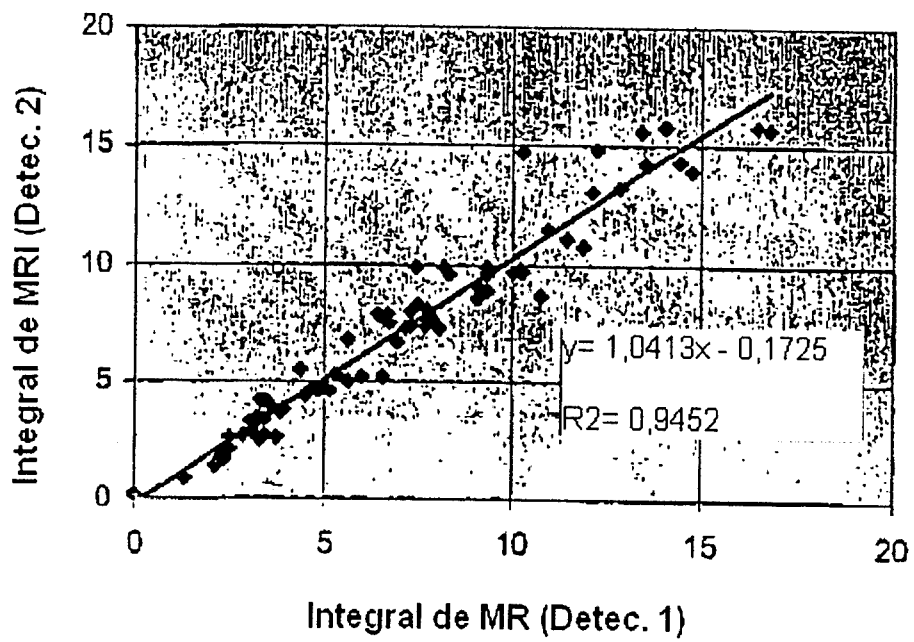


Figura 11

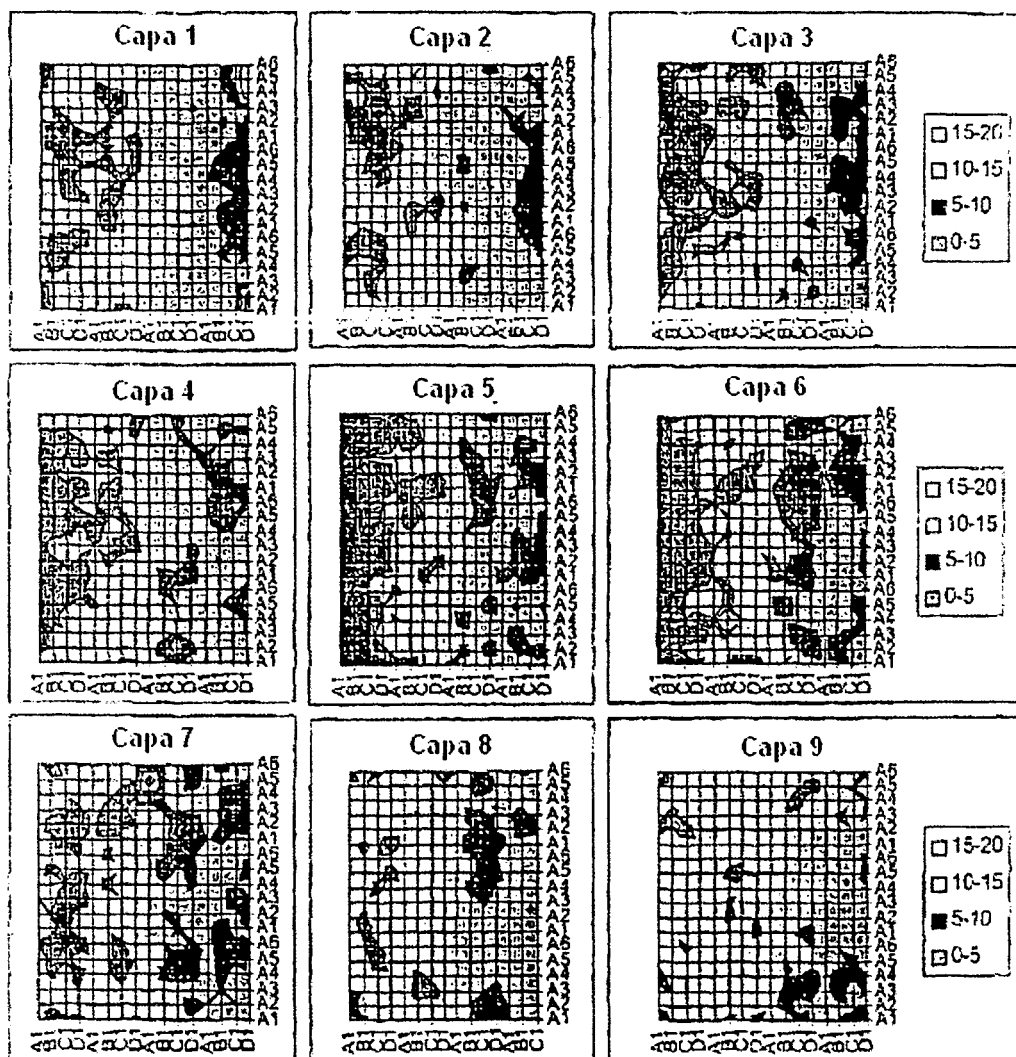


Figura 12