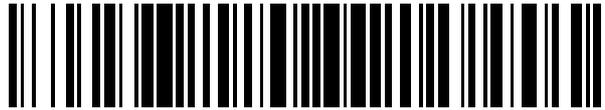


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 485 892**

51 Int. Cl.:

A01C 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.08.2005 E 05792743 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.04.2014 EP 1786261**

54 Título: **Muestreador de semilla automatizado y métodos de muestrear, ensayar y aumentar semillas**

30 Prioridad:

26.08.2004 US 604604 P
15.06.2005 US 691100 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.08.2014

73 Titular/es:

MONSANTO TECHNOLOGY, LLC (100.0%)
800 NORTH LINDBERGH BOULEVARD
ST. LOUIS, MO 63167, US

72 Inventor/es:

DEPPERMANN, KEVIN, L.;
ZHANG, QIANG y
HINCHEY, TERRI, B.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 485 892 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

Muestreador de semilla automatizado y métodos de muestrear, ensayar y aumentar semillas

5 Antecedentes de la invención

Esta invención se refiere a un sistema y un método para tomar muestras de materiales biológicos tales como semillas.

10 En el desarrollo y la mejora de las plantas, se hacen mejoras genéticas en la planta, ya sea a través del cultivo selectivo o la manipulación genética, y cuando se logra una mejora deseable, se desarrolla una cantidad comercial plantando y cosechando semillas durante varias generaciones. No todas las semillas manifiestan los rasgos deseados, y así estas semillas necesitan ser seleccionadas de la población. Para acelerar el proceso de aumentar la población, se toman y se ensayan muestras estadísticas para seleccionar semillas de la población que no manifiestan el rasgo deseado. Sin embargo, este muestreo estadístico permite necesariamente que algunas semillas
15 sin el rasgo deseable permanezcan en la población, y también pueden excluir inadvertidamente de la población deseada algunas semillas con el rasgo deseado.

20 El documento DE 2002,2666 U1 divulga un muestreador automatizado que comprende una estación de muestreo y un muestreador para retirar muestras de material de plantas en la estación de muestreo. Una porción cortada del material de planta es transferida a un pocillo de una placa de microtitulación.

25 El documento WO 03/100381 A1 divulga un método para muestrear semillas que comprende alimentar una semilla a una estación de muestreo, sujetar la semilla en la estación de muestreo, retirar una muestra de la semilla que está siendo sujeta en la estación de muestreo y recibir la muestra en un compartimento en una bandeja de muestras.

Sumario de la invención

30 La presente invención se refiere a un sistema y a un método de muestrear de forma no destructiva material de semillas. El método se adapta particularmente para la automatización, que permite mayor muestreo que lo que previamente fue práctico. Con muestreo automatizado no destructivo permitido por al menos algunas de las realizaciones de esta invención, es posible ensayar cada semilla en la población, y seleccionar aquellas semillas que no manifiestan el rasgo deseado. Esto acelera enormemente el proceso de aumentar una población de semillas dada, y puede resultar en una población final mejorada.

35 Realizaciones de esta invención facilitan el ensayo de la mayoría o todas las semillas en una población antes de plantar, de manera que el tiempo y los recursos no son malgastados en cultivar plantas sin los rasgos deseados.

40 El sistema de muestreador de semillas automatizado de esta invención comprende una estación de muestreo, un muestreador para retirar material de una semilla en la estación de muestreo, un transportador de semilla para transportar la semilla de la estación de muestreo a un compartimento en una bandeja de semilla, y un transportador de muestras para transportar el material retirado de la semilla a un compartimento correspondiente en una bandeja de muestras, y el muestreador es accionable para retirar el material de la semilla en la estación de muestreo mientras se mantiene la viabilidad de germinación de la semilla.

45 La invención también se refiere a un método para muestrear semillas de acuerdo con la reivindicación 6.

50 Este sistema y método de esta invención facilitan el muestreo automatizado no destructivo de semillas. Permiten el ensayo y la clasificación de grandes volúmenes de semillas, facilitando por ello el aumento de poblaciones de semillas con rasgos deseables. Estas y otras características y ventajas serán evidentes en parte, y en parte señaladas aquí.

Breve descripción de los dibujos

55 La figura 1 es una vista en perspectiva de una primera realización de un sistema de muestreador de semillas construido de acuerdo con los principios de esta invención;

60 la figura 2 es una vista en perspectiva ampliada del ensamblaje de muestreador de semillas del sistema muestreador de semillas;

la figura 3 es una vista en perspectiva ampliada de la tolva y mecanismo de alimentación de semillas del ensamblaje de muestreador de semillas;

65 la figura 4 es una vista en perspectiva del mandril para raspar muestras de las semillas;

la figura 5 es una vista en perspectiva de la corredera para accionar el mandril;

- la figura 6 es una vista en perspectiva del pistón en el mecanismo de alimentación de la tolva;
- 5 la figura 7 es una vista en perspectiva de una etapa con una pluralidad de bandejas de semillas y bandejas de muestras montadas sobre estas;
- la figura 8 es una vista en perspectiva del mecanismo de translación bidimensional;
- 10 la figura 9 es una vista en perspectiva de la entrada del transportador de semillas;
- la figura 10 es una vista en perspectiva de la salida del transportador de semillas;
- la figura 11 es una vista en perspectiva de la salida del transportador de muestras;
- 15 la figura 12 es una vista en perspectiva del multiplicador de aire usado en los transportadores de semillas y muestras;
- la figura 13 es una vista en planta desde arriba de un sistema de muestreador de semillas de alta producción de acuerdo con los principios de esta invención;
- 20 la figura 14 es una vista en alzado lateral del sistema de muestreador de semillas de alta producción;
- la figura 15 es una vista en perspectiva frontal del sistema de muestreador de semillas;
- 25 la figura 16 es una vista en perspectiva trasera del sistema de muestreador de semillas;
- la figura 17 es una vista en perspectiva de la estación de muestreo del sistema de muestreador de semillas de alta producción;
- 30 la figura 18A es una vista en perspectiva parcial de una porción de la estación de muestreo de semillas de acuerdo con los principios de esta invención, con el mandril retraído;
- la figura 18B es una vista en perspectiva parcial de una porción de la estación de muestreo de semillas de acuerdo con los principios de esta invención, con el mandril extendido;
- 35 la figura 19A es una vista en alzado lateral de la estación de muestreo de semillas, con el mandril en su posición retraída;
- la figura 19B es una vista en alzado lateral de la estación de muestreo de semillas, con el mandril en su posición extendida;
- 40 la figura 20 es una vista en corte transversal longitudinal de la estación de muestreo de semillas;
- la figura 21 es una vista en alzado de extremo frontal de la estación de muestreo de semillas;
- 45 la figura 22 es una vista en corte transversal de la estación de muestreo de semillas;
- la figura 23A es una vista en alzado lateral de la rueda de selección de semillas;
- 50 la figura 23B es una vista en despiece ordenado de la rueda de selección de semillas;
- la figura 23C es una vista en corte transversal vertical de la rueda de selección de semillas;
- la figura 24 es una vista en alzado frontal del mecanismo de alimentación;
- 55 la figura 25 es una vista en alzado lateral del mecanismo de alimentación;
- la figura 26A es una vista en perspectiva del mecanismo de alimentación;
- 60 la figura 26B es una vista en alzado lateral del mecanismo de alimentación;
- la figura 26C es una vista en corte transversal longitudinal del mecanismo de alimentación, tomada a lo largo del plano de línea 26C-26C en la figura 26B;
- 65 la figura 26D es una vista en planta desde abajo del mecanismo de alimentación;

la figura 27A es una vista en corte transversal longitudinal vertical del mecanismo de muestreo;

la figura 27B es un vista en corte transversal vertical parcial ampliada del mecanismo de muestreo como se muestra en la figura 27A;

la figura 28A es una vista en corte transversal vertical del mecanismo de muestreo;

la figura 28B es una vista en corte transversal parcial ampliada del mecanismo de muestreo como se muestra en la figura 28A; y

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

Los números de referencia correspondientes indican partes correspondientes por varias de las vistas de los dibujos.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Una primera realización de un sistema de muestreador de semillas automatizado construido de acuerdo con los principios de la presente invención se indica generalmente como 20 en la figura 1. El sistema 20 de muestras de semillas se adapta para aislar una semilla de una tolva, alimentarlo a una estación de muestreo, rascar una muestra de la semilla, transportar la muestra a un contenedor de muestras, y transportar la semilla a un contenedor de semillas correspondiente. Como se muestra en la figura 1, el sistema de muestreador de semillas comprende un soporte 22, un bastidor 24 en el soporte; un ensamblaje 26 de muestreador, una etapa 28 montada en un mecanismo 30 de traslación bidimensional, un transportador 32 de semillas para transportar semillas desde el ensamblaje de muestreador de semillas, y un transportador 34 de muestras para transportar una muestra retirada de una semilla a un ensamblaje de muestreador de semillas.

Como se muestra en la figura 1, en la realización preferida primera el soporte 22 comprende un carro 40 de ruedas, que tiene cuatro postes verticales 42 conectados por miembros longitudinales superior e inferior 44 y 46, en la parte delantera y trasera, y miembros transversales superior e inferior 48 y 50 en los lados izquierdo y derecho, y una mesa 52 montada encima de este. Una ruedecita 54 puede montarse en la parte inferior de cada poste 42 para facilitar mover el soporte 22. Los detalles de la construcción del soporte 22 no son críticos para la invención, y así el soporte 22 podría tener alguna otra configuración sin salir de los principios de la invención.

Como también se muestra en la figura 1, el bastidor 24 comprende cuatro soportes 60 que se extienden verticalmente montadas en el top 52 de mesa, que soportan una placa 62 generalmente horizontal. El ensamblaje 26 de muestreador se monta en la placa 62, como se describe con más detalles después. Un árbol 64 se monta también en la placa, y se extiende generalmente de forma horizontal desde esta. El extremo libre del árbol 64 tiene postes verticales primero y segundo 66 y 68 para montar un transportador 32 de semillas y partes del transportador 34 de muestras, respectivamente. Los detalles de la construcción del bastidor no son críticos para la invención, y así el bastidor podría tener alguna otra configuración sin salir de los principios de esta invención.

Como se muestra en las figuras 1 y 2, el ensamblaje 26 de muestreador se monta en la placa 62 de bastidor 24. El ensamblaje de muestras comprende un contenedor o tolva 70, una estación 72 de muestreo, y un mecanismo 74 de alimentación para repartir una única semilla desde la tolva 70 a la estación de muestreo.

Como se muestra en las figuras 1 y 3, la etapa 28 se adapta para montar de forma segura una pluralidad de bandejas 80 de semillas y bandejas 82 de muestras en posiciones y orientaciones fijas. Cada una de las bandejas 80 de semillas y bandejas 82 de muestras se divide en una pluralidad de compartimentos. El número y disposición de los compartimentos en las bandejas 80 de semillas corresponde preferentemente al número y disposición de los compartimentos en las bandejas 82 de muestras. Esto facilita la correspondencia uno con uno entre una semilla y su muestra. Sin embargo, en algunas realizaciones puede ser deseable proporcionar múltiples compartimentos en la bandeja de muestras para cada compartimento en la bandeja de semillas, por ejemplo cuando se pueden hacer múltiples ensayos en las muestras, o cuando se pueden tomar diferentes muestras de la misma semilla (por ejemplo, muestras de diferentes profundidades).

La etapa 28 se monta en un mecanismo 30 de traslación bidimensional, que en esta realización preferida comprende una base 90 con un actuador lineal primero 92 que tiene un carro trasladable 94 montado en una base 90, y un actuador lineal segundo 96, que tiene un carro 98 montado en el carro 94 del actuador lineal primero 92. La etapa 28 se monta en el carro 98 del actuador lineal segundo 96, y así puede moverse precisamente en dos dimensiones a través del funcionamiento de los actuadores lineales primero y segundo 92 y 96.

El transportador 32 de semillas comprende un tubo 100 con un extremo 102 de entrada adyacente a la estación 72 de muestreo, y un extremo 104 de salida montado en el poste 66 del bastidor 24. Hay un dispositivo 106 de Venturi primero en el extremo 102 de entrada del tubo 100 para inducir un flujo de aire en el tubo hacia el extremo 104 de salida del tubo, y un dispositivo 108 de Venturi segundo en el extremo 104 de salida del tubo 100 para inducir un

flujo de aire hacia el extremo 102 de entrada del tubo. El dispositivo 106 de Venturi primero se acciona para crear un flujo de aire en el tubo y extraer una semilla de la estación de muestreo dentro del tubo a lo largo del extremo primero. El dispositivo 108 de Venturi segundo se acciona entonces para crear un flujo de aire en la dirección opuesta, ralentizando así la semilla para reducir el potencial para dañar la semilla mientras sale por el extremo 104 de salida del tubo y se reparte a un compartimento en la bandeja. En esta realización preferida, el Venturi segundo 108 para de hecho el movimiento de la semilla, permitiéndola caer por la gravedad en su compartimento en una bandeja 80. Varios sensores de posición pueden ser provistos en el tubo 100 para detectar la presencia de la semilla, y confirmar el funcionamiento apropiado del transportador 32 de semillas.

El transportador 34 de muestras comprende un tubo 120 con un extremo 122 de entrada adyacente a la estación 72 de muestreo, y un extremo 124 de salida montado en el poste 68 del bastidor 24. Hay un dispositivo 26 de Venturi primero en el extremo 122 de entrada del tubo 120 para inducir un flujo de aire en el tubo hacia el extremo 124 de salida del tubo. Un separador 128 es provisto en el extremo de salida para separar el material de muestras de la corriente de aire que lo lleva, de manera que la corriente de aire no vuela la muestra fuera del compartimento en la bandeja 82. El separador preferentemente también contiene un filtro para evitar la contaminación cruzada de las muestras.

Como se muestra en la figura 2, el ensamblaje 26 de muestreo de semillas se adapta para ser montado en la placa 62 en un poste 140. El ensamblaje 26 de muestreo de semillas comprende una placa 142 de montaje de tolva, una placa 144 de montaje de corredera y cuatro soportes separadores 146 de corredera entre ellas. La tolva 70 (como se muestra en la figura 3), que proporciona semillas individuales a una estación 72 de muestreo, se monta en la placa 142 de tolva. La estación 72 de muestreo comprende un nido 148 de semillas montado en un monte 150 de nido, que es soportado desde la placa 144 de montaje de corredera por una par de separadores 152. El nido 148 tiene una abertura de rebaje en su superficie inferior, en la que la tolva 70 suministra una única semilla. Hay una ranura en la parte superior del nido 148 de semillas a través de la cual una porción de semilla en el rebaje es expuesta. Un mandril 154 (figura 4) se monta en un portamandriles 156 que se monta en una placa 158 de transición de corredera en una corredera programable 160, con un bloque de sujeción de mandril 162. La corredera programable 160 (figura 5) se monta en la parte inferior de la placa 144 de montaje de corredera, y mueve el mandril 154 a través de la ranura en el nido 148 de semillas para retirar una muestra de una semilla en el rebaje en el nido de semillas.

Como se muestra mejor en la figura 4 el mandril 154 tiene una pluralidad de dientes 164 que incrementan en altura hacia el extremo proximal, de manera que el mandril 154 es avanzado en la ranura, corta de manera incrementada más profundamente en la semilla en el rebaje en el nido 148. El rasurado gradual resultante reduce el daño en la semilla, protegiendo su viabilidad. Lo que es más, como se describe en más detalle después, cortando a diferentes profundidades en diferentes momentos, las muestras de diferentes profundidades de la misma semilla pueden ser separadas para análisis separados.

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

La estación 26 de muestreo también incluye una tolva 70, mostrada mejor en la figura 3. La tolva 70 comprende placas 170 y 172 de montaje de tolva izquierda y derecha, y una placa 174 de montaje de cilindro y una escuadra 176 de cilindro superior. La tolva 70 también tiene un panel frontal 178, un panel trasero 180, paneles 182 y 184 de extremo primero y segundo, y panel inferior 186. Un divisor 188 divide la tolva en compartimentos primero y segundo 190 y 192. El compartimento primero 190 sujeta un suministro de semillas que son transferidas individualmente al compartimento segundo 192.

Un actuador 194 de pistón acciona un pistón 196 para levantar una semilla fuera del compartimento primero. Un ensamblaje 198 de chorro de aire transfiere una semilla del extremo del pistón 196 al compartimento segundo 192. El compartimento segundo tiene una parte inferior conformada 200, con un pocillo 202 para recibir la semilla y posicionarla. Un actuador 210 de pistón acciona un pistón 214 para levantar una semilla fuera del compartimento segundo 192. El ensamblaje 216 de chorro de aire se usa para remover las semillas durante el procedimiento de elección de semilla.

Como se muestra en la figura 7, la etapa 28 tiene escuadras 220 para montar bandejas 80 de semillas y bandejas 82 de muestras en registro de manera que el transportador de semillas y el transportador de muestras reparten semillas y muestras a los compartimentos correspondientes, en las bandejas respectivas. Las bandejas 82 de muestras pueden (como se muestra) ser adaptadas para sujetar viales individuales. Por supuesto, podrían ser usadas bandejas de diferentes configuraciones, por ejemplo donde están provistos múltiples compartimentos para muestras múltiples de la misma semilla. Por ejemplo donde una muestra se divide en varias muestras, o donde las muestras se separan de donde son tomadas, por ejemplo, por profundidad.

Como se muestra en la figura 8, el mecanismo 30 de traslación bidimensional también incluye un cursor 230 que tiene un carril 232 y un carro 234, que está posicionado paralelo al actuador lineal primero 92. El actuador lineal segundo 96 se monta en el carro 94 que tiene carro 98 montado en el carro 94 del actuador lineal primero 92. La etapa 28 se monta en el carro 98 del actuador lineal segundo 96, y así puede ser movido precisamente en dos

dimensiones a través del funcionamiento de los actuadores lineales primero y segundo 92 y 96. Bajo control apropiado el mecanismo de traslación puede alinear compartimentos individuales de las bandejas 80 de alimentación y bandejas 82 de muestras con las salidas del transportador de semillas y transportador de muestras.

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

15 Como se muestra en la figura 10, un ensamblaje 260 de descarga de semillas se dispone en el extremo 104 de salida del tubo 100 de transportador 32 de semillas. El ensamblaje de descarga se monta en el poste 66, con una escuadra 262 y un soporte 264 de descarga. Un tubo 266 de sensor de semillas se monta en la escuadra 262, y lleva sensores 268 de semillas para detectar el paso de una semilla a través del mismo. Los sensores 268 son preferentemente sensores ópticos alineados con aberturas en el tubo 266 de sensor de semillas. El amplificador 270 de aire (figura 12) se adapta para ser conectado a una fuente de aire comprimido. Cuando el aire se aplica al amplificador de aire, induce un flujo de aire por el tubo 100, empleando el efecto Venturi. Bajo el amplificador 270 de aire hay un tubo conector 272, y debajo de eso hay un tubo 274 de descarga de semillas ventilada, que también es soportado por un portatubos 276 de descarga de semilla, llevado en un actuador 278 de tubo de descarga de semillas.

25 El extremo 122 de entrada del tubo 120 del transportador 34 de muestras está conectado por mediación del conector 168 al tubo 166 de descarga de muestras. Como se muestra en la figura 11, el extremo 124 de salida del tubo 120 está conectado a un conector 280 de muestras, que a su vez está conectado a un amplificador 282 de aire, que está conectado a un ensamblaje 284 de boquilla chip. El ensamblaje 284 de boquilla chip está montado en el portatubos 286 de descarga de semillas, que es llevado en un actuador 288 de descarga. El actuador de descarga está montado en el poste 68. Los filtros 290 están montados en las salidas del ensamblaje 284 de boquilla chip, para evitar que las muestras que son descargadas contaminen los otros compartimentos.

Funcionamiento del sistema de muestreador

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

40 La muestra se retira de la estación 72 de muestreo por el transportador 34 de muestras. El dispositivo 126 de Venturi crea un flujo de aire en el tubo 120 hacia el extremo 124 de salida. El material de muestras se extrae en el tubo y hacia el compartimento de la bandeja de muestras alineada con el extremo 124 de salida del tubo 120. El separador 128 separa la muestra desde la corriente de aire llevándolo, y permite que la muestra caiga en el compartimento. En algunas realizaciones, la muestra puede ser distribuida en dos o más compartimentos en la bandeja de muestras, en cuyo caso el mecanismo 30 de traslación bidimensional se acciona para llevar uno o más compartimentos adicionales en alineación con la salida 124. Es posible coordinar de forma exacta el movimiento de las bandejas de muestras con el funcionamiento de la estación 72 de muestreo de manera que las muestras de diferentes porciones de la semilla, y en particular diferentes profundidades de la semilla, puedan ser repartidas para separar compartimentos en la bandeja de muestras.

50 Después de que el muestreo de la semilla se completa, el transportador 32 de semillas se acciona para retirar la semilla de la estación de muestreo. El dispositivo 106 de Venturi primero se acciona para crear un flujo de aire en el tubo y extraer una semilla de la estación 72 de muestreo en el tubo 100. El dispositivo 108 de Venturi segundo es después accionado para crear un flujo de aire en la dirección opuesta, ralentizando así la semilla para reducir el daño a la semilla mientras sale del extremo 104 de entrada del tubo 100 y se reparte a un compartimento en la bandeja 82 de semillas. El Venturi segundo 108 para preferentemente el movimiento de la semilla, permitiéndole caer por la gravedad en su compartimento en una bandeja 80. El funcionamiento de los Venturi 106 y 108 primero y segundo puede ser programado, o puede ser activado por sensores de posición que monitorizan el tubo 100.

60 Una realización de un sistema de muestreador de semillas de alta producción se indica generalmente como 500 en las figuras 13-26. Como se muestra en las figuras 13 y 14, el sistema 500 de muestreador de semillas comprende una estación 502 de muestreo, una estación 504 de manejo de muestras, y una estación 506 de manejo de semillas. Es deseable, pero no esencial, que el sistema 500 de muestreador de semilla encaje en uno o más carros de ruedas que pueden pasar por puertas convencionales, de manera que el sistema puede ser convenientemente transportado. En esta realización preferida, la estación 502 de muestreador de semillas se monta en una carretilla 508, la estación de manejo de muestras se monta en una carretilla 510, y la estación de manejo de semillas se monta en una carretilla 512.

5 La estación 502 de muestreo de semillas comprende un alimentador 514 de semillas y una trituradora 516 de semillas. Una pluralidad de columnas 518 se extiende verticalmente hacia arriba desde la superficie 520 de la carretilla 508. Una plataforma 522 se monta sobre las columnas 518 y soporta la trituradora 514 de semillas. Dos escuadras en forma de L 524 se extienden horizontalmente desde las columnas 518, y soportan una plataforma 526. Una etapa 528 se monta en la plataforma 526 por una pluralidad de postes 530 y soporta el alimentador 514 de semillas.

10 Una pluralidad de pilares 532 se extiende hacia arriba desde la placa 522. Una placa 534 se monta en los pilares 532. Una pluralidad de postes 536 depende de la placa 534, y soportan una estantería 538.

15 Como se muestra en la figura 3, 14, 15 y 16, el alimentador 514 de semillas comprende una tolva 550, con una superficie conformada adaptada para alimentar semillas depositadas en la tolva hacia una rueda 552 de separación (véanse también las figuras 23A a 23C). La rueda 552 de separación se monta para rotación en un plano vertical adyacente a la tolva 550, y tiene una pluralidad de rebajes espaciados 554 que tiene cada uno una abertura 556 que comunica con un sistema de aspiradora (no mostrado). La rueda 552 se avanza con un motor 560 de indexación. Las semillas individuales se recogen por los rebajes 554 en la rueda 552 y se sujetan en los rebajes por succión desde el sistema de aspiradora por mediación de las aberturas 556. Una rasqueta 562 elimina semillas individuales de los rebajes 554, permitiéndoles caer por una guía 564 en una abertura en un distribuidor 566.

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

35 El distribuidor 566 se monta por una escuadra 582 en el carro 584 de un actuador 586 de línea, para trasladar relativo a la guía 564, llevando sucesivamente cada uno de los pasos 570 en el árbol 568 en alineación con la guía 564 de manera que una semilla puede ser depositada dentro. Un sensor de semillas (no mostrado) puede montarse adyacente a la guía 564 para confirmar que una semilla se deposita en cada paso 570. Una pluralidad de boquillas 590 de aire se monta en la etapa 528, y se alinea con los pasos 570 cuando el distribuidor 566 se mueve a su posición de dispensación por el actuador 586. Un tubo 592 se alinea con cada paso 570, y cada tubo conecta a una pluralidad de estaciones 600 de muestreo de semillas en la trituradora 516 de semillas. Los manguitos 572 y 574 se trasladan permitiendo que las semillas en el paso 570 caigan dentro de tubos 592. Una de las boquillas se alinea con cada uno de los pasos 570; y se activa para facilitar el movimiento de las semillas desde los pasos a través de los tubos 592 a sus respectivas estaciones 600 de muestreo de semillas.

45 Hay preferentemente una lumbrera 596 a través de la tolva 550 que se alinea con la abertura 556 en cada rebaje 554 cuando la rueda 552 gira. La lumbrera 596 puede ser conectada a una aspiradora para extraer cualquier suciedad o trozos de cáscara de semilla o semillas que pueden obstruir las aberturas 556 en los rebajes 554, y afectar la habilidad de la rueda 552 para seleccionar semillas individuales de la tolva 550.

50 La trituradora 516 de semillas comprende al menos una, y en esta realización preferida seis, estaciones 600 de muestreo. Cada estación 600 de muestreo de semillas retira una muestra de material de una semilla repartida a esta. En esta realización preferida las estaciones 600 de muestreo se disponen o agrupan en dos grupos de tres, pero el número y disposición de las estaciones de muestreo podría variar. La estación 504 de manejo de muestras recibe muestras de tejido retiradas de una semilla y transportadas lejos de cada estación 600 de muestreo. Similarmente, la estación 506 de manejo de semillas recibe una semilla después de que la muestra haya sido retirada de la semilla, y la semilla se transporta desde la estación 600 de muestreo.

55 Cada estación 600 de muestreo de semillas tiene un anillo 602 de entrada conectado al tubo 590, que da a una cámara 604. La superficie inferior de la cámara 604 está formada por el extremo de un vástago 606 de actuador 608. La superficie de la parte inferior está bajo el anillo 602 de entrada para asegurar que la semilla entera cae dentro de la cámara 604 y no es cogida en una posición solo en parte en la cámara. Un conducto 610 de ventilación puede ser posicionado en frente del anillo 602 de entrada para permitir que el aire de las boquillas 590 de aire escape. El conducto 610 de ventilación puede ser cubierto con una rejilla 612 para evitar que la semilla escape de la cámara 604 y amortigüe la semilla cuando se reparte en la cámara.

65 Este vástago 606 levanta una semilla fuera de la cámara 604 y en un rebaje 614 de recepción de semilla en la parte inferior de una placa 616 de muestreo de semillas. La placa 616 de muestreo tiene una abertura 618 de muestreo a través de la cual una semilla en el rebaje 614 de recepción de semilla protruye. Una hendidura 620 de muestreo es

5 formada en la superficie superior de la placa 616 de muestreo de manera que una porción de una semilla en el rebaje 614 protruye en la hendidura. La placa 616 de muestreo también tiene aberturas 622 y 624 orientadas lateralmente alineadas con el rebaje 614 de recepción de semilla. Cuando el vástago 606 levanta una semilla repartida a la estación 600 de muestreo en el rebaje 614 en la placa 616, los dedos 626 y 628 se extiende transversalmente a través de las aberturas 622 y 624 y se accionan mediante el actuador 630 para aplicar y comprimir la semilla. Se ha descubierto que comprimir al menos ciertos tipos de semillas durante el proceso de muestreo puede mejorar la viabilidad de las semillas después del muestreo. Para semillas tales como semillas de soja, se ha descubierto que una presión compresiva mejora la viabilidad de la semilla, y esa presión compresiva de entre 17 y 34 kPa es suficiente para mejorar la viabilidad.

10 El mandril 650 de muestreo que tiene una pluralidad de bordes 652 de corte corresponde en la hendidura 620 de manera que los bordes 652 de corte puede rascar una muestra de una semilla que está siendo sujeta en el rebaje 614 por el vástago 606 y los dedos 626 y 628. Los bordes 652 de corte son preferentemente paralelos, y orientados un ángulo oblicuo menor de 90° relativo a la dirección de trayectoria del mandril. Es deseable, pero no esencial, que los bordes de corte permitan que la próxima hoja establezca contacto con la semilla antes de que la hoja actual pierda contacto con la semilla. En la realización preferida los bordes de corte están orientados en un ángulo de unos 60°, aunque este ángulo dependerá en cierto modo del ancho del mandril. El ancho del mandril puede también ser importante para preservar la viabilidad de la semilla después del muestreo, y puede variar dependiendo del tipo de semilla y su contenido de humedad.

15 Los bordes 652 de corte están escalonados, cada uno cortando progresivamente más profundo que el anterior. La cantidad de material de muestra y la profundidad del corte pueden ser controladas controlando el avance del mandril 650. Para muestras más pequeñas y profundidades más huecas de corte, el golpe del mandril 650 es más corto, y para muestras mayores y profundidades más profundas de corte, el corte del mandril es más largo. Para golpes parciales, el tejido de la semilla puede ser atrapado entre los bordes 652. El mandril 650 puede ser avanzado o retraído para ayudar a liberar todas las muestras. Por ejemplo, después de que la muestra es liberada, el mandril puede ser avanzado y retraído para ayudar a retirar tejido de semilla atrapado entre los bordes de corte. El intervalo total de trayectoria del mandril 650 se muestra en las figuras 19A y 19B.

20 El mandril 650 de muestreo se acciona preferentemente por un actuador lineal 654. En la realización preferida, tres mandriles 650 son accionados por un único actuador 654. Usar un único actuador para activar múltiples mandriles ahorra espacio y es más económico.

25 Un sistema 656 de transporte de muestras que comprende un conducto 658 que tiene una entrada 660 que comunica con un paso 662 que da a la abertura 618 de muestreo y la hendidura 620 en la placa 616 de muestreo retira muestras de tejido hechas por la acción de los bordes 652 de corte del mandril 650 de muestreo. El conducto 658 transporta la muestra a la salida 664 donde se deposita en un único portamuestras en la estación 504 de manejo de muestra. Este portamuestras puede ser, por ejemplo, un pocillo 666 en una bandeja 668 montado en una tabla de indexación x-y 670 en carretilla 510, de manera que la relación entre muestras y sus respectivas semillas puede ser determinada. El sistema 656 de transporte de muestras incluye un chorro 672 de aire que induce un flujo de aire por el conducto 658 para mover la muestra por el conducto.

30 Un mecanismo de muestreo segundo puede ser montado en el actuador lineal 654 y se mueve con el mandril 650. El mecanismo de muestreo segundo puede comprender un dispositivo 674 de núcleo que tiene una herramienta 676 de núcleo para tomar una muestra de tapón de la semilla desde la vía hecha por el mandril 650. Este tejido en esta muestra es de una localización más profunda que el tejido rascado por el mandril 650, y proporciona información diferente. En algunas realizaciones el material retirado por el mandril 650 puede simplemente ser descartado, y solo la muestra tomada con el dispositivo 674 de núcleo retenida. En algunas realizaciones ambas muestras pueden ser retenidas y almacenadas separadamente para un ensayo separado. En otras realizaciones más, la única muestra es la muestra retirada por el mandril 650. En realizaciones sin el mecanismo de muestreo segundo, el dispositivo 674 de núcleo y la herramienta 676 de núcleo pueden ser remplazados con un actuador con un simple vástago de empuje que se extiende por la abertura 618 de muestreo para ayudar a empujar la semilla en el rebaje 614.

35 Un sistema 680 de transporte de semillas que tiene un rebaje adyacente 614 de entrada 682 para extraer semillas después de que sean liberadas por los dedos 626 y 628 y el vástago 606 baja la semilla después del funcionamiento de muestreo. El sistema 680 de transporte de semillas transporta las semillas a un portasemillas único en la estación 506 de manejo de semillas en la carretilla 512. Este portasemillas puede ser, por ejemplo, un pocillo 684 en una bandeja 686 montada en una mesa de indexación x-y 688 en carretilla 612, de manera que la relación entre muestras y sus respectivas semillas pueda ser determinada. El mecanismo 680 de transporte de semillas incluye un chorro 690 de aire que induce un flujo de aire por el conducto 680 para mover las muestras por el conducto.

Funcionamiento

40 En funcionamiento, una pluralidad de semillas, por ejemplo semillas de soja, se dejan en el mandril 550 del sistema 500 de muestreo. Estas semillas fluyen por la gravedad hacia el disco 552, la succión por las lumbreras 556 sujeta una semilla en cada cavidad 554. Cuando el disco 552 es rotado por el motor 560 de indexación, las semillas

- individuales son eliminadas del disco por la rasqueta 562, y caen por la gravedad por la guía 564 a la salida. El actuador lineal 586 mueve el distribuidor 566 de manera que cada paso 570 del distribuidor se alinea con la guía 564 para cargar una semilla por la abertura 576 y en el paso 570. Cuando todos los pasos 570 en el distribuidor 566 están llenos, el actuador lineal 586 mueve el distribuidor en posición para cargar sus semillas en las estaciones 600 de muestreo en el triturador 516 de semillas. Los manguitos 572 y 574 se mueven mediante el actuador 580, que alinea las aberturas 578 con los pasos 570, permitiendo a las semillas en los pasos 570 que caigan en los tubos 592 que llevan a las unidades 600 de muestreo. Las boquillas 590 proporcionan una explosión de aire que ayuda a urgir a las semillas de los pasos 570 por los tubos 592 a las cámaras 604 en las unidades 600 de muestreo.
- 10 Preferentemente todos los pasos 570 se cargan en serie y descargan sus semillas simultáneamente en las unidades 600 de muestreo, pero el distribuidor podría ser programado para funcionar de otra manera. Una vez que las semillas llegan a las estaciones 600 de muestreo, los vástagos 606 levantan las semillas en los rebajes 614 en el lado inferior de las placas 616. Los rebajes 614 pueden ser dimensionados y conformados para ayudar óptimamente a orientar la semilla. En los rebajes 614, una porción de las semillas protruye por los agujeros 618 de muestreo y en las hendiduras 620. Los mandriles 650 se trasladan a las hendiduras 620, permitiendo que sus bordes 652 de corte retiren material de las porciones de las semillas que protruyen en las hendiduras 620, y forman pequeñas vías en las semillas. Mientras cada mandril 650 retira material, el sistema 656 de transporte de muestras extrae el material de muestra por el paso 662 y en la entrada 660. Las muestras viajan por los conductos 658 lejos de las estaciones 600 de muestreo a una localización de almacenaje de muestras, tales como pocillos 666 en una bandeja 668 de muestras. Una muestra segunda puede ser tomada por la herramienta 676 de extracción de dispositivo 674 de muestreo por la abertura 618 en la placa 616 de muestreo. Después de que el muestreo se completa, el vástago 606 se retracta, y mientras la semilla cae el sistema 680 de transporte de semilla de muestra transporta la semilla muestreada a una localización de almacenaje de semillas, tal como un pocillo 684 en una bandeja 686 de semillas.
- 25 Las mesas 670 y 688 de indexación se mueven para alinear diferentes pocillos con las salidas del sistema 656 de transporte de muestras y el sistema 680 de transporte de semillas, y el proceso de muestras se repite. Cuando todos los pocillos 666 en una bandeja 668 de muestras están llenos, las muestras en la bandeja de muestras pueden ser ensayadas, y las semillas en la correspondiente bandeja 686 de muestras puede ser seleccionadas en base a los resultados del ensayo de muestras. El muestreo preferentemente no afecta substancialmente de forma
- 30 adversa la viabilidad de las semillas.

Aplicaciones

- 35 La presente invención permite para analizar semillas tener un rasgo, marcador o genotipo deseado. Las semillas individuales que están presentes en una partida o una población a granel de semillas pueden ser analizadas de manera que las características químicas y/o genéticas de las semillas individuales pueden ser determinadas.
- Las muestras preparadas por la presente invención pueden ser usadas para determinar una amplia variedad de rasgos físico, químicos y/o genéticos. Ejemplos de análisis químicos para el uso en los métodos de la presente invención incluyen contenido de almidón, contenido de proteínas, contenido de aceites, determinación de perfiles de ácidos grasos, etc.
- 40 En un aspecto, el método y dispositivo de la presente invención puede ser usado en un programa de cultivo para seleccionar plantas o semillas que tienen un rasgo, marcador o genotipo deseado. Los métodos de la presente invención pueden ser usados en combinación con cualquier metodología de cultivo y pueden ser usados para seleccionar una generación única o para seleccionar múltiples generaciones. La elección de método de cultivo depende el modo de reproducción de plantas, que se mejore la heredabilidad del rasgo o rasgos, y el tipo de cultivo usado comercialmente (por ejemplo, F₁ cultivo híbrido, cultivo de línea pura, etc.). Los enfoques seleccionados no limitativos para cultivar las plantas de la presente invención se establecen después. Se entiende además que cualquier cultivo comercial o no comercial puede ser utilizado en un programa de cultivo. Factores tales como, por ejemplo, vigor de emergencia, vigor vegetativo, tolerancia al estrés, resistencia a la enfermedad, ramificación, floración, desarrollo de semilla, tamaño de semilla, densidad de semilla, resistencia, desgranabilidad, etc. dictarán generalmente la elección.
- 45 El método de la presente invención puede ser usado para determinar las características genéricas de las semillas en un programa de cultivo asistido por marcadores. Tales métodos permiten programas de cultivo asistidos por marcadores mejorados en los cuales se puede llevar a cabo el muestreo directo de semillas de manera no destructiva mientras se mantiene la identidad de los individuos del muestreador de semillas en el campo. Como resultado, el programa de cultivo asistido por marcadores da como resultado una plataforma de "alta producción" en la cual una población de semillas que tiene un rasgo, marcador o genotipo deseado se pueden aumentar más eficazmente en un periodo de tiempo más corto, con menos recursos requeridos de campo y de mano de obra. Tales ventajas se describirán de manera más completa después.
- 50 El método de la presente invención puede ser usado para determinar las características genéricas de las semillas en un programa de cultivo asistido por marcadores. Tales métodos permiten programas de cultivo asistidos por marcadores mejorados en los cuales se puede llevar a cabo el muestreo directo de semillas de manera no destructiva mientras se mantiene la identidad de los individuos del muestreador de semillas en el campo. Como resultado, el programa de cultivo asistido por marcadores da como resultado una plataforma de "alta producción" en la cual una población de semillas que tiene un rasgo, marcador o genotipo deseado se pueden aumentar más eficazmente en un periodo de tiempo más corto, con menos recursos requeridos de campo y de mano de obra. Tales ventajas se describirán de manera más completa después.
- 55 La presente invención permite analizar semillas individuales dentro de una población de semillas que tienen diferencias genéticas. El método comprende retirar una muestra que comprende células con ADN de semillas en la población sin afectar a la viabilidad de germinación de las semillas; seleccionar del ADN extraído de la muestra para
- 60
- 65

la presencia o ausencia de al menos un marcador genético; seleccionar semillas de la población en base a los resultados de la selección de ADN; y cultivar plantas a partir de la semilla seleccionada.

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

15 La viabilidad de germinación puede mantenerse durante al menos seis meses después del muestreo para garantizar que la semilla muestreada será viable hasta que alcance el campo para su plantación. Se puede proporcionar, además, tratar las semillas muestreadas para mantener la viabilidad de germinación. Tal tratamiento puede incluir generalmente cualquier medio conocido en la técnica para proteger una semilla de las condiciones ambientales durante el almacenamiento o el transporte. Por ejemplo, las semillas muestreadas se pueden tratar con un polímero y/o un fungicida para proteger la semilla muestreada durante el almacenamiento o el transporte al campo antes de su plantación.

20 El ADN se puede extraer de la muestra usando cualquier método de extracción de ADN conocido por el experto en la técnica, el cual proporcionará rendimiento de ADN, calidad de ADN y respuesta PCR suficientes. Un ejemplo no limitativo de métodos de extracción de ADN adecuados es la extracción basada en SDS con centrifugación. Adicionalmente, el ADN extraído se puede amplificar después de la extracción usando cualquier método de amplificación conocido por el experto en la técnica. Por ejemplo, un método de amplificación adecuado es la preparación de amplificación de ADN GenomiPhi® de Amersham Biosciences.

25 El ADN extraído es cribado para la presencia o ausencia de un marcador genético adecuado. Una gran variedad de marcadores genéticos están disponibles y son conocidos por el experto en la técnica. El cribado de ADN para la presencia o ausencia del marcador genético se puede usar para la selección de semillas en una población de cultivo. El cribado se puede usar para seleccionar los locus de rasgos cuantitativos (QTL), alelos, regiones genómicas (haplotipos). Los alelos, QTL, o haplotipos a seleccionar para poder ser identificados usando técnicas más nuevas de biología molecular con modificaciones de las estrategias de cultivo clásicas.

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

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

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

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

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

Las ventajas de usar el método de criba de la invención incluyen, sin limitación, la reducción de mano de obra y los recursos de campo requeridos por población o línea de cultivo, capacidad incrementada para evaluar un mayor número de poblaciones de cultivo por unidad de campo, y capacidad incrementada para cribar poblaciones de cultivo para rasgos deseados antes de la plantación. Los recursos de campo por población se reducen limitando el espacio de campo requerido para avanzar los genotipos deseados. Por ejemplo, una población de 1000 individuos se puede plantar en 25 semillas por fila consumiendo un total de 40 filas en el campo. Usando el muestreo de tejido convencional, las 1000 plantas serían catalogadas y muestreadas manualmente evaluando el tejido foliar. Los resultados del marcador molecular serían necesarios antes de la polinización y solo se polinizarían las plantas que contienen la composición genética deseada. De este modo, si se determinase que 50 semillas contenían la composición genética deseada, la metodología de cultivo convencional requeriría la plantación de 1000 plantas para obtener 50 semillas. Por el contrario, los métodos de cribado de esta invención permiten al criador cribar las 1000 semillas en el laboratorio y seleccionar las 50 semillas deseadas antes de la plantación. Los 50 individuos se pueden entonces plantar en el campo, consumiendo solo dos filas de 25 filas de semillas. Adicionalmente, los métodos de cribado de esta invención no requieren catalogación o muestreo en el campo, reduciendo de este modo de manera significativa los recursos de mano de obra necesarios.

Además de reducir el número de filas de campo por población, el método de cribado de esta invención pueden incrementar adicionalmente el número de poblaciones que el criador puede evaluar en un vivero dado. Usando el ejemplo anterior en el cual 50 semillas de cada población de 1000 semillas contenían la composición genética deseada, un criador que aplica los métodos de la invención podría evaluar 20 poblaciones de 50 semillas cada uno usando la misma área de campo consumida por una única población usando técnicas de muestreo de tejido de campo convencionales. Incluso si se seleccionan las poblaciones para un único alelo, usando una relación de segregación esperada de 1:2:1 para una población F_2 , el criador podría evaluar 4 poblaciones en la misma área de campo que una única población muestreada de tejido de campo.

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

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

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

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

El método de la presente invención además proporciona garantía de calidad (QA) y control de calidad asegurando que se identifican y se descartan transgenes regulados o no queridos antes de plantar. Esta aplicación en una capacidad QA podría eliminar eficazmente infracciones de liberación no intencionadas.

El método de la presente invención se puede aplicar además para identificar una semilla híbrida para ensayo de transgenes. Por ejemplo, en una conversión en una línea endogámica en la etapa BCnF1, un criador podría crear eficazmente un lote de semillas híbridas (salvo la selección de gametos) que fuese hemiciigótico al 50% para el rasgo de interés y homociigótico al 50% para la falta del rasgo con el fin de generar una semilla híbrida para ensayo. El criador podría entonces cribar todas las semillas F_1 producidas en el cruce de ensayo e identificar y seleccionar las semillas que eran homociigóticas. Tal método es ventajoso porque las interferencias de los ensayos híbridos representarían productos genéticos híbridos comerciales con respecto a la cigosidad del rasgo.

Otras aplicaciones del método de cribado de la invención para identificar y seguir los rasgos de interés tienen las mismas ventajas identificadas anteriormente con respecto al campo y los recursos de mano de obra requeridos. Generalmente, los programas de conversión transgénica se ejecutan en localizaciones multitemporada que llevan

una mayor estructura de coste de gestión y de tierra. De este modo, el impacto de reducir las necesidades de filas por población o incrementar el número de poblaciones dentro de una unidad de campo dada es significativamente más drástico en el coste frente a aplicaciones moderadas.

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

10

Ejemplos

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

15 Ejemplo 1

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

25

En este ejemplo, se usó tubulina como el gen IC y el GOI fue un transgen que codifica fosfotransferasa de neomicina II (NPT II), que se usa para selección de resistencia a la Kanamicina. El tejido de endospermo (triploide) se tomó de la semilla (bien por muestreo manual o raspando una semilla con un muestreador automatizado de la presente invención). La semilla de endospermo muestreado se germinó, y el tejido foliar (diploide) de una planta germinada con éxito se muestreó también para análisis genético. El tejido foliar se correlaciona directamente con la cigosidad embrionaria y de ese modo se uso para demostrar que la cigosidad de endospermo predice generalmente la cigosidad del embrión y para confirmar las células de homocigosidad del endospermo. El ADN genómico total se extrajo del tejido de endospermo y del tejido foliar, y se analizó cuantitativamente usando un ensayo Invader® con sondas oligonucleotídicas específicas para el gen de interés, NPT II, o para el gen de control interno, tubulina. La relación del GOI respecto del IC se midió usando técnicas convencionales de biología molecular. Véase la tabla 1. Se muestra un sumario de resultados de múltiples experimentos en la tabla 2.

35

Los resultados indicaron que la cigosidad de endospermo predijo generalmente la cigosidad del embrión (como se indica mediante la cigosidad de la hoja) y fue fiable en predecir homocigosidad para todas las semillas que 10 germinaron. Asimismo, el análisis de cigosidad de endospermo dio predicciones homocigóticas de faso negativo (especialmente cuando el tejido de endospermo se obtuvo con el muestreador automatizado). Estos resultados demuestran que para una célula de un nivel de ploidía conocido, la relación de número de copias de un GOI respecto del de un IC que indica la cigosidad de esa célula. Asimismo, el ensayo de cigosidad de la presente invención puede predecir cigosidad de un tejido en base a la cigosidad de otro, es decir, el ensayo puede predecir la cigosidad embrionaria en base a la cigosidad de endospermo.

40

45

Tabla 1

Relación Automatizada	Cigosidad automatizada	Relación manual	Cigosidad manual
1,39	Heterocigótico	1,42	Heterocigótico
0,14	Homocigótico negativo	0,12	Homocigótico negativo
0,08	Homocigótico negativo	0,08	Homocigótico negativo
0,13	Homocigótico negativo	0,10	Homocigótico negativo
0,10	Homocigótico negativo	0,08	Homocigótico negativo
1,55	Heterocigótico	1,38	Heterocigótico
0,84	Heterocigótico	1,45	Heterocigótico
0,14	Homocigótico negativo	1,48	Heterocigótico
1,48	Heterocigótico	1,37	Heterocigótico
1,39	Heterocigótico	1,47	Heterocigótico
2,03	Homocigótico POS	1,93	Homocigótico POS

0,13	Homocigótico negativo	0,05	Homocigótico negativo
1,71	Inconcluyente	1,81	Homocigótico POS
0,81	Heterocigótico	1,41	Heterocigótico
1,84	Homocigótico POS	1,77	Homocigótico POS
1,54	Heterocigótico	1,43	Heterocigótico
1,48	Heterocigótico	1,50	Heterocigótico
0,92	Heterocigótico	1,40	Heterocigótico
1,51	Heterocigótico	1,42	Heterocigótico
1,60	Heterocigótico	1,37	Heterocigótico
0,86	Heterocigótico	1,47	Heterocigótico
1,81	Homocigótico POS	2,02	Homocigótico POS
0,15	Homocigótico negativo	ADN bajo	
1,89	Homocigótico POS	1,85	Homocigótico POS
0,21	Homocigótico negativo	0,10	Homocigótico negativo
0,09	Homocigótico negativo	0,11	Homocigótico negativo
0,89	Heterocigótico	1,50	Heterocigótico
1,50	Heterocigótico	1,37	Heterocigótico
1,82	Inconcluyente	2,02	Homocigótico POS
2,14	Homocigótico POS	0,99	Inconcluyente
1,22	Heterocigótico	1,44	Heterocigótico
2,22	Homocigótico POS	2,24	Homocigótico POS
0,79	Heterocigótico	1,40	Heterocigótico
1,23	Heterocigótico	1,47	Heterocigótico
1,49	Heterocigótico	1,38	Heterocigótico
1,33	Heterocigótico	1,37	Heterocigótico

Tabla 2

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

Ejemplo 2

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

La soja es el cultivo de leguminosas más valioso, con muchos usos nutricionales e industriales debido a su composición química única. Las semillas de soja son una fuente importante de aceite vegetal, que se usa en productos alimentarios por todo el mundo. El nivel relativamente alto (habitualmente aproximadamente el 8%) de 10 ácido linoleico (18:3) en el aceite de soja reduce su estabilidad y sabor. La hidrogenación del aceite de soja se usa para reducir el nivel de ácido linoleico (18:3) y mejorar tanto la estabilidad como el sabor de los aceites de soja. Sin embargo, la hidrogenación da como resultado la producción de ácidos grasos trans, que aumentan el riesgo de enfermedad cardíaca coronaria cuando se consumen. El desarrollo de soja con bajo contenido de ácido linoleico se ha complicado por la naturaleza cuantitativa del rasgo. Las variedades de soja con bajo contenido de ácido linoleico 15 que se han desarrollado se han encontrado tener un bajo rendimiento, limitando su utilidad en la mayoría de los ámbitos comerciales. Desarrollar un producto con un rendimiento de semillas comercialmente significativo es una prioridad elevada en la mayoría de los programas de desarrollo de cultivares de soja.

Un ejemplo de la aplicación de los métodos de cribado de la presente invención es la selección de plantas de soja tanto con gran rendimiento con un rendimiento de la progenie de Soja con un contenido de ácido linoleico reducido entorno al bajo contenido en ácido linoleico se basa principalmente en dos locus principales de rasgo cuantitativo (QTL) en Fad3-1c. El análisis de la segregación de plantas demuestra que fad3-1b y Fad3-1c controlan adicionalmente el contenido linolénico en soja. Por lo tanto, usando una combinación de marcadores para Fad3-1b y Fad3-1c, un criador que usa la invención puede predecir con precisión el contenido de ácido linolénico en las plantas de soja. Los marcadores se pueden usar para inferir el estado genotípico de una semilla en cualquier etapa en el proceso de cultivo, por ejemplo, en la etapa de línea endogámica acabada, o la F₁, F₂, F₃, etc.

Un híbrido F₁ seminal se puede producir cruzando dos líneas de soja endogámicas (por ejemplo, cruzando una planta que contiene los alelos Fad3-1b y/o Fad3-1c asociados a contenido de ácido linoleico reducido a una planta que carece de estos alelos) seguido de autopolinización natural. Puesto que los marcadores se pueden usar para inferir el estado genotípico de una única semilla obtenida a partir de un interacomplamiento de tales líneas endogámicas, se puede llevar a cabo el cultivo asistido por marcado de primera generación (es decir, F₂).

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

Las semillas F₂ seleccionadas que tienen el genotipo deseado se pueden aumentar o mantener separadas dependiendo de los objetivos de cultivo. Si se hubiesen seleccionado múltiple QTL con efectos variables a partir de una población dada, el criador podría preservar la única identidad de semilla para diferenciar los individuos con varias combinaciones del QTL de resistencia diana. Estas semillas se podrían plantar en el campo con identificación de campo apropiada. Varios métodos de preservación de identidad de semillas única se pueden usar mientras se transfiere la semilla desde el laboratorio de corte al campo. Los métodos incluyen transferir individuos seleccionados a la cinta se semillas hortícolas que también podría incluir identificación de radiofrecuencia para ayudar a la identificación de la semilla individual genotipificada. Otros métodos serían usar una bandeja de indexación, semillas de plantas en macetas con turba y a continuación trasplantarlas, o plantar a mano a partir de paquetes individuales de semillas.

45 Ejemplo 3

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

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

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

60 Ejemplo 4

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

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

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

REIVINDICACIONES

- 1.- Un sistema (20, 500) de muestreador de semillas automatizado, que comprende:
- 5 una estación (26, 72, 502, 600) de muestreo;
- un muestreador (650) para retirar el material de una semilla en la estación de muestreo;
- 10 un transportador (32) de semillas para transportar la semilla desde la estación de muestreo a un compartimento en una bandeja (80, 686) de semillas;
- un transportador (34) de muestras para transportar el material retirado de la semilla a un compartimento correspondiente en una bandeja (82, 668) de muestras;
- 15 en el que el muestreador es accionable para retirar el material desde la semilla en la estación (26, 72, 502, 600) de muestreo mientras se mantiene la viabilidad de germinación de la semilla.
- 2.- El sistema de muestreador de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el transportador (32) de semillas es un transportador neumático.
- 20 3.- El sistema de muestreador de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el transportador (34) de muestras es un transportador neumático.
- 4.- El sistema de muestreador de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además una mesa para soportar la bandeja (80, 686) de semillas y la bandeja (82, 668) de muestras, y un posicionador para mover la mesa para alinear el compartimento en la bandeja (80, 686) de semillas en la mesa con el transportador (32) de semillas y para alinear el compartimento correspondiente en la bandeja de muestras con el transportador (34) de muestras.
- 25 5.- El sistema de muestreador de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el posicionador traslada la mesa en dos direcciones mutuamente perpendiculares.
- 30 6.- Un método para ensayar una pluralidad de semillas, comprendiendo el método:
- alimentar una semilla a una estación (26, 72, 502, 600) de muestreo, sujetar la semilla en la estación (26, 72, 502, 600) de muestreo, retirar una muestra de la semilla que está siendo sujeta en la estación (26, 72, 502, 600) de muestreo, recibir la muestra en un compartimento en una bandeja (82, 668) de muestras y recibir la semilla en un compartimento en una bandeja (80,686) de semillas con una relación conocida con el compartimento en la bandeja (82, 66) de muestras en el que la muestra correspondiente fue recibida; y
- 35 40 ensayar la muestra.
- 7.- El método de la reivindicación 6, en el que ensayar la muestra incluye ensayar la muestra para la presencia o ausencia de al menos un rasgo deseado, y en el que el método comprende además clasificar la semilla en base a la presencia o ausencia de al menos un rasgo deseado.
- 45 8.- El método de la reivindicación 7, que comprende además seleccionar la semilla en base a la presencia o ausencia de al menos un rasgo deseado; y cultivar una planta a partir de la semilla.
- 9.- El método de cualquiera de las reivindicaciones 6-8, en el que retirar una muestra de la semilla que está siendo sujeta en la estación (26, 72, 502, 600) de muestreo comprende cortar la muestra de la semilla.
- 50 10.- El método de cualquiera de las reivindicaciones 6-9, en el que retirar una muestra de la semilla sujeta en la estación (26, 72, 502, 600) de muestreo comprende retirar la muestra de la semilla que está siendo sujeta en la estación (26, 72, 502, 600) de muestreo mientras se mantiene la viabilidad de germinación de la semilla.

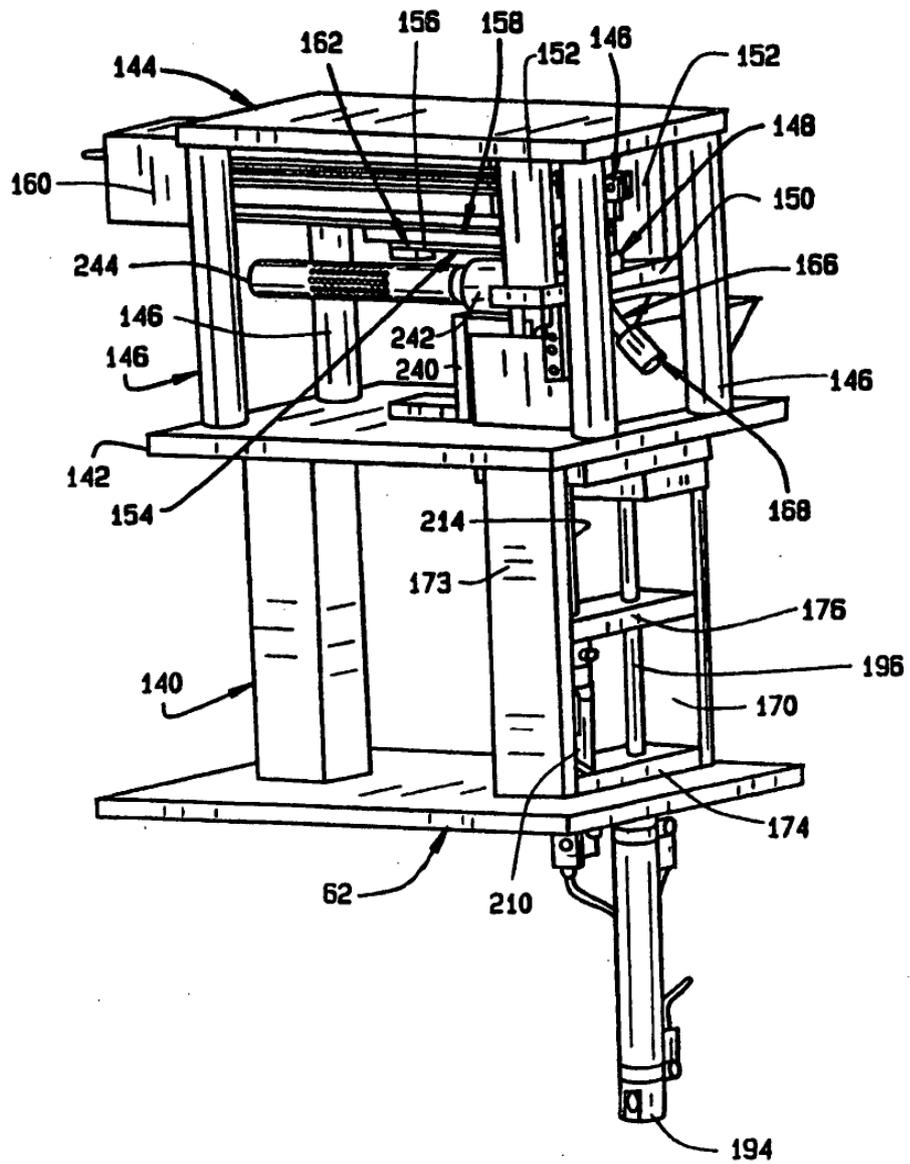


FIG. 2

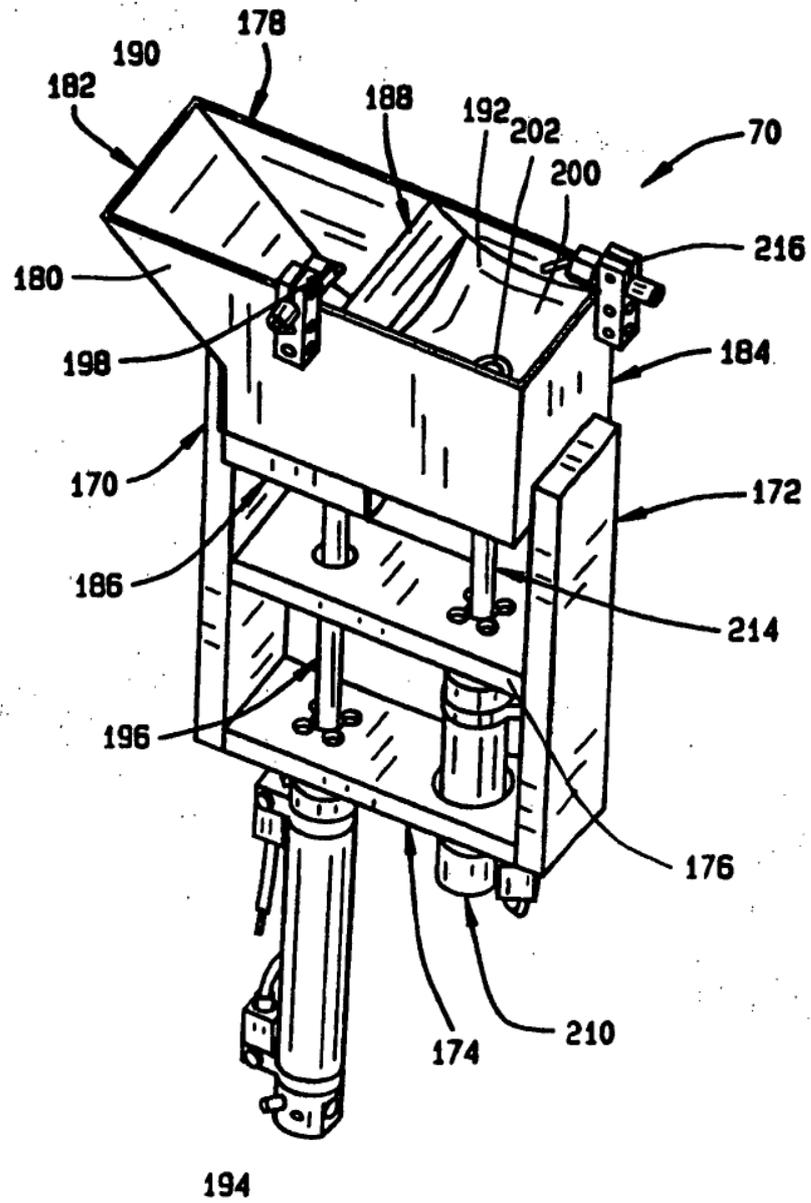


FIG. 3

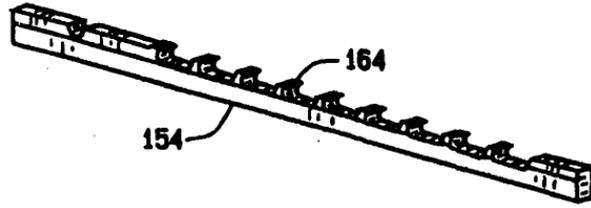


FIG. 4

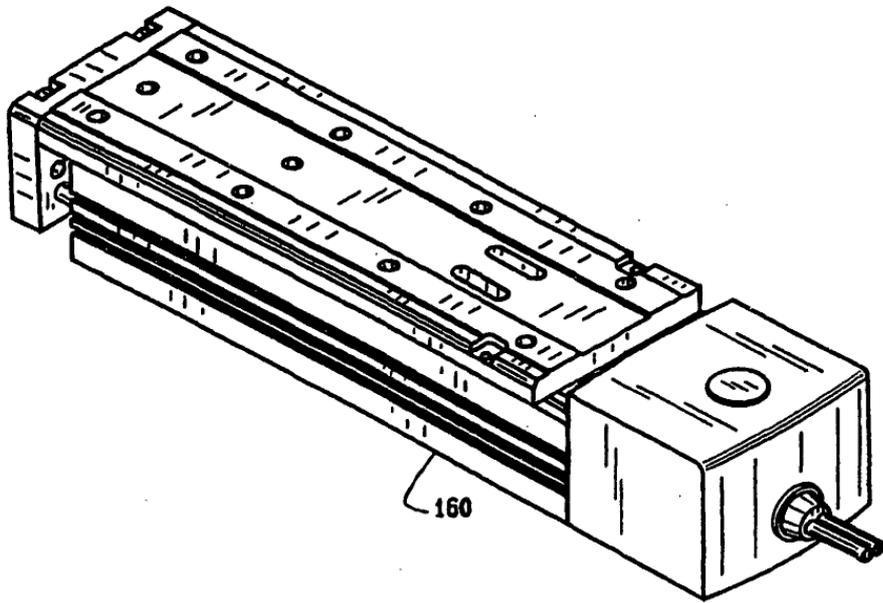


FIG. 5

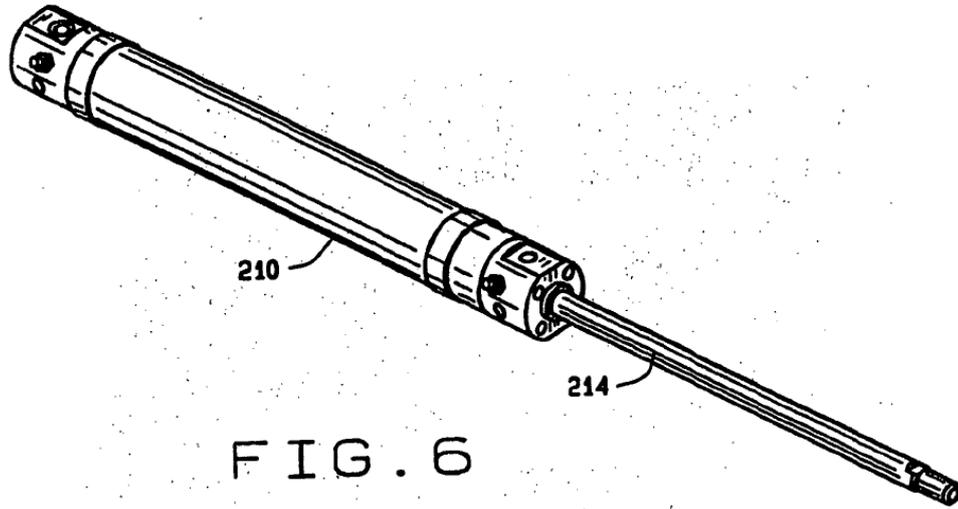


FIG. 6

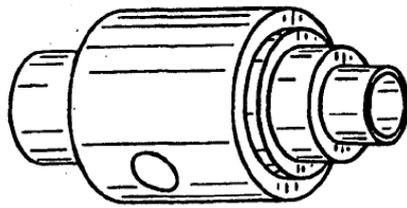


FIG. 12

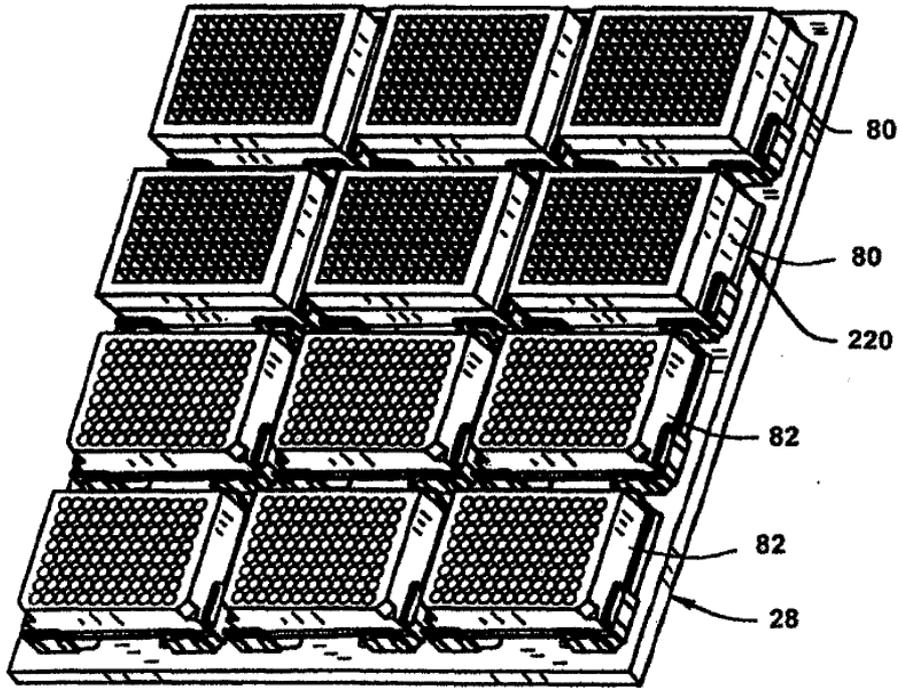


FIG. 7

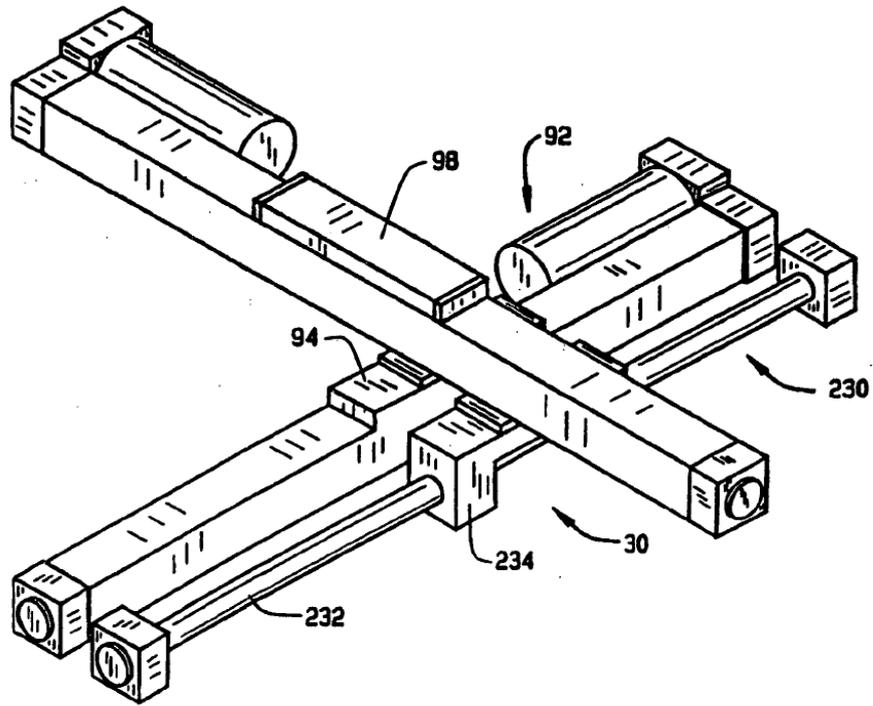


FIG. 8

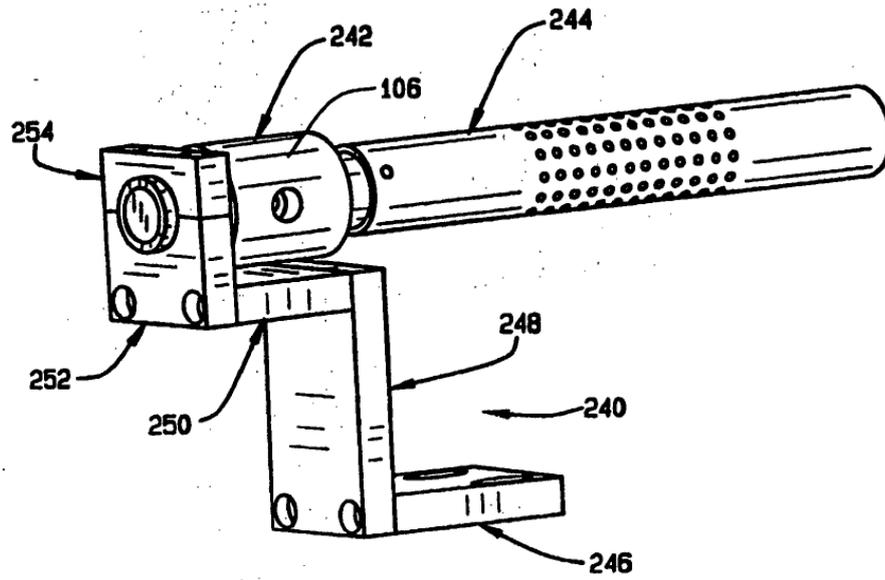


FIG. 9

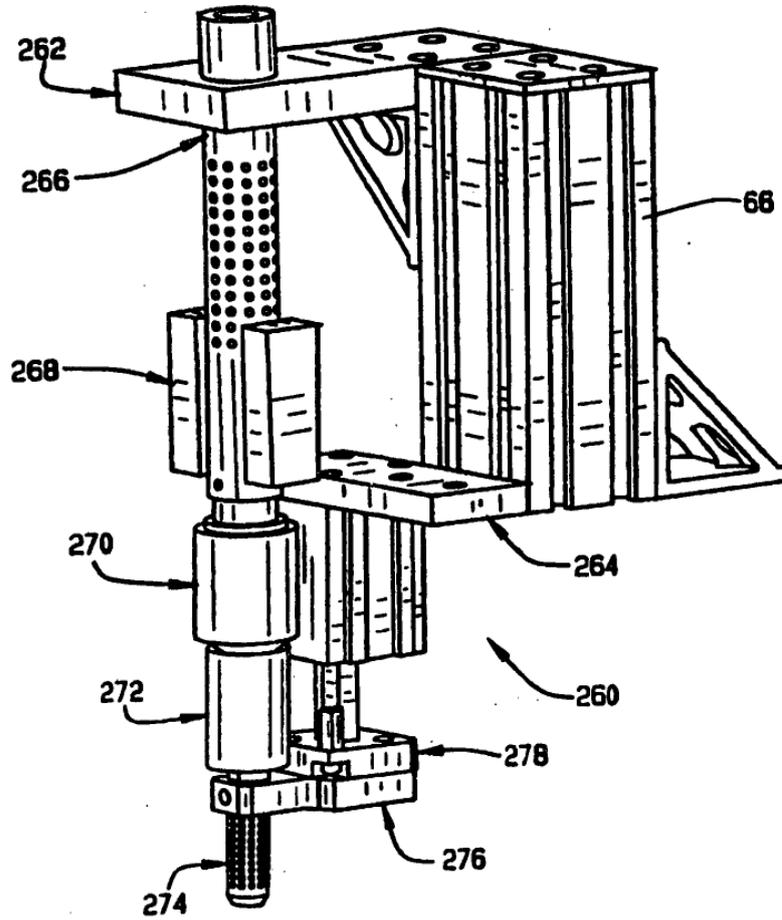


FIG. 10

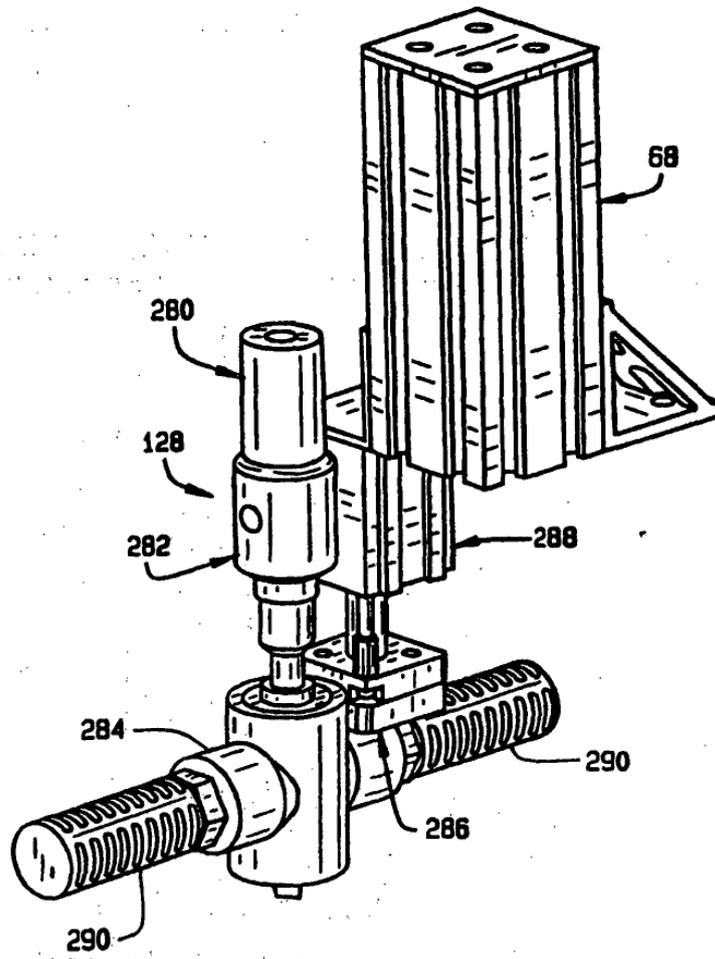


FIG. 11

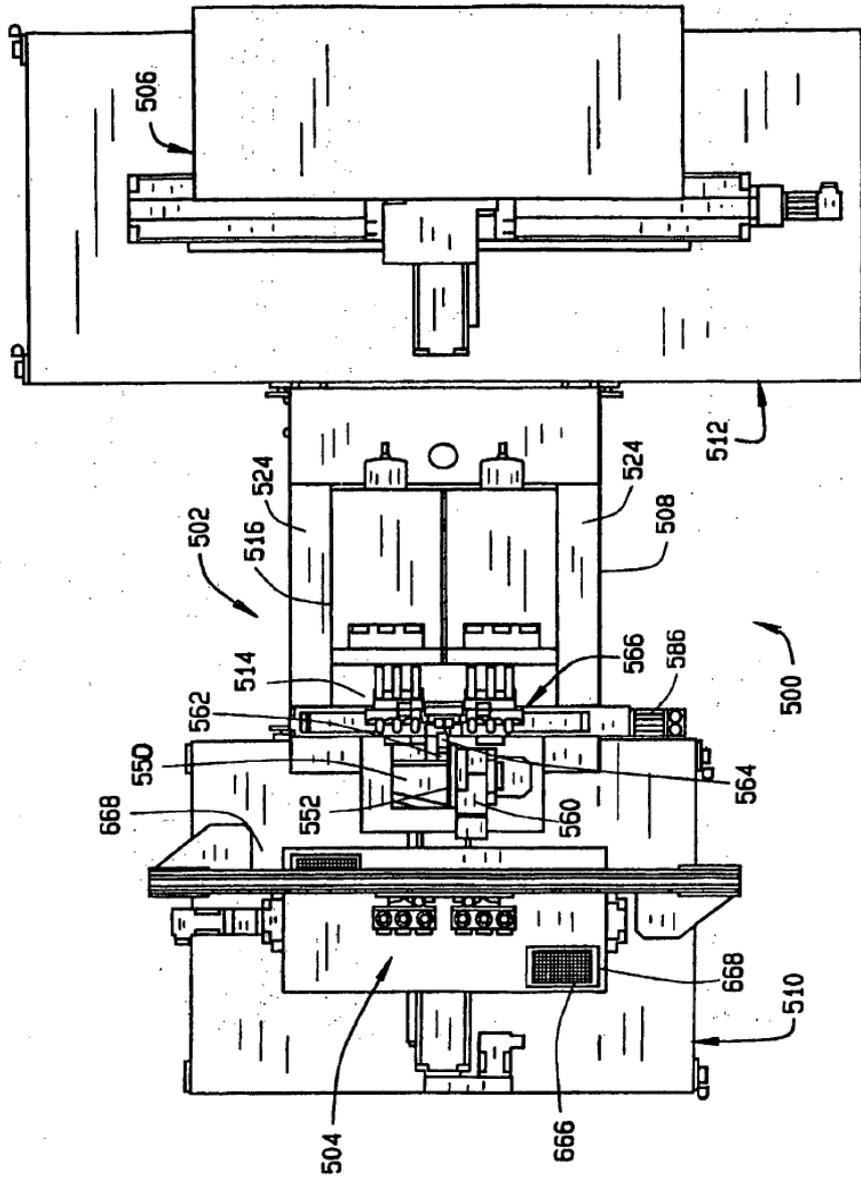


FIG. 13

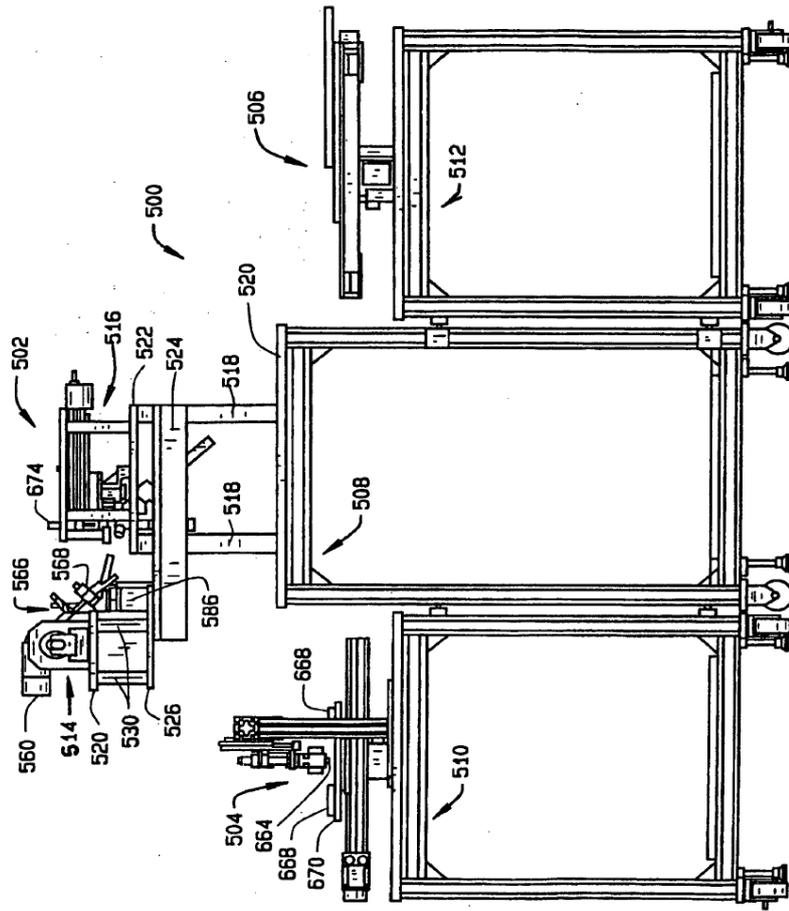


FIG. 14

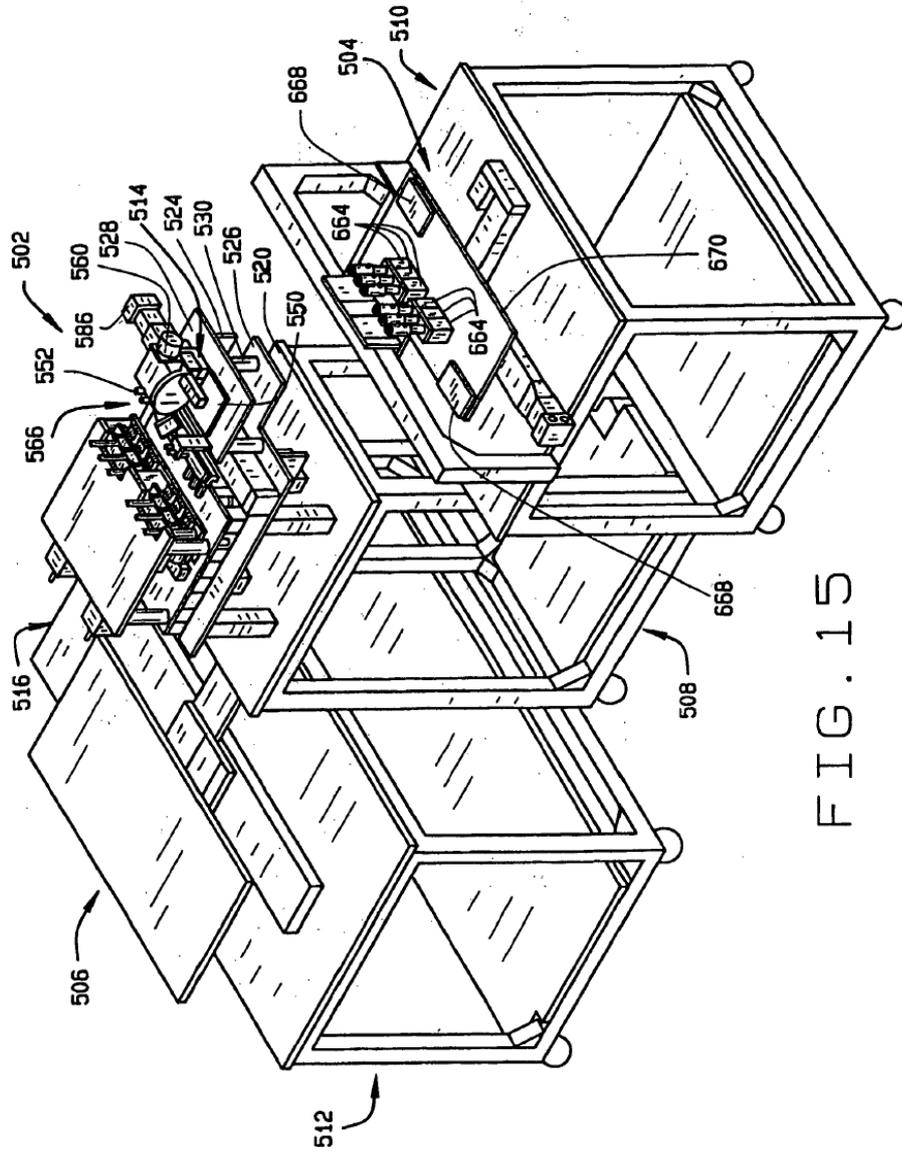


FIG. 15

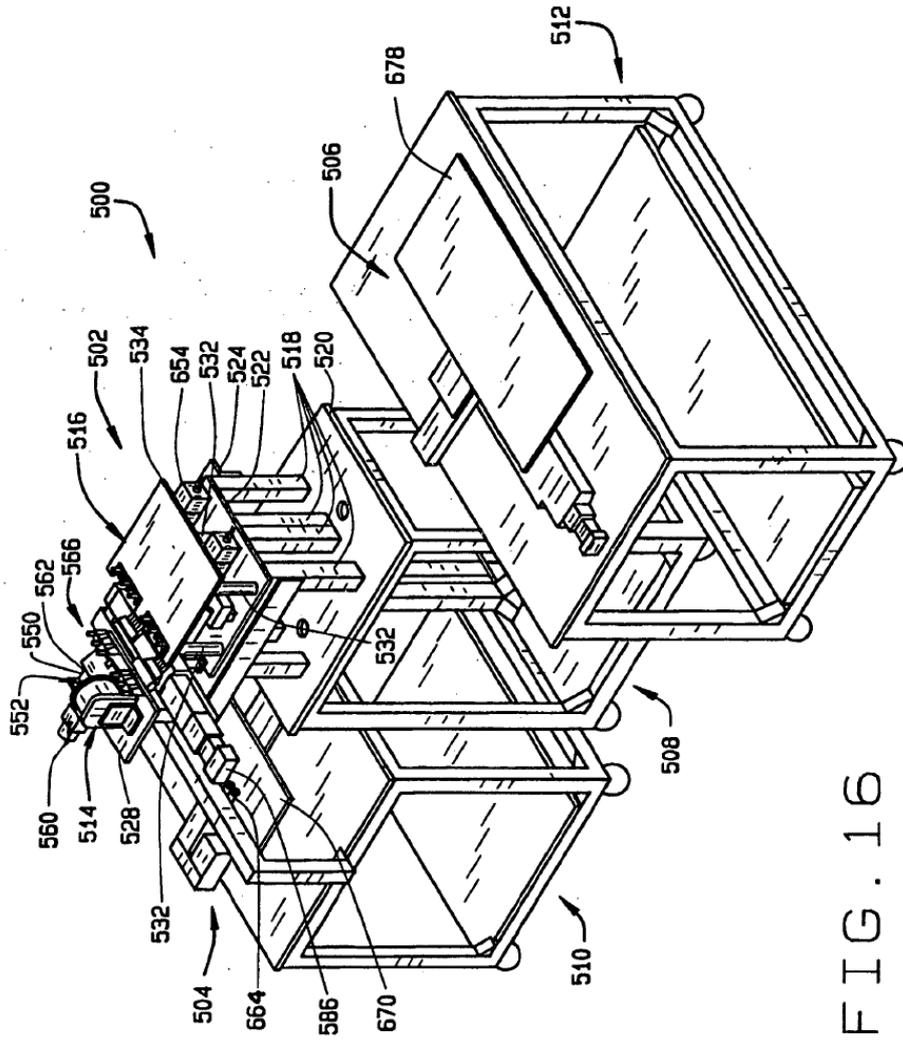


FIG. 16

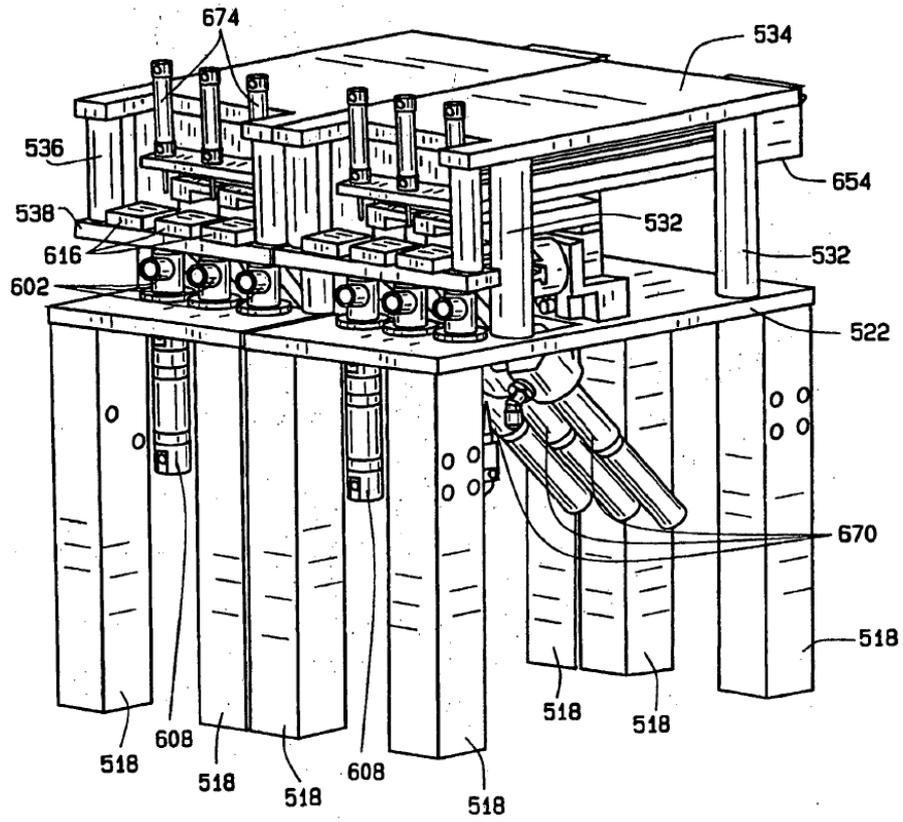


FIG. 17

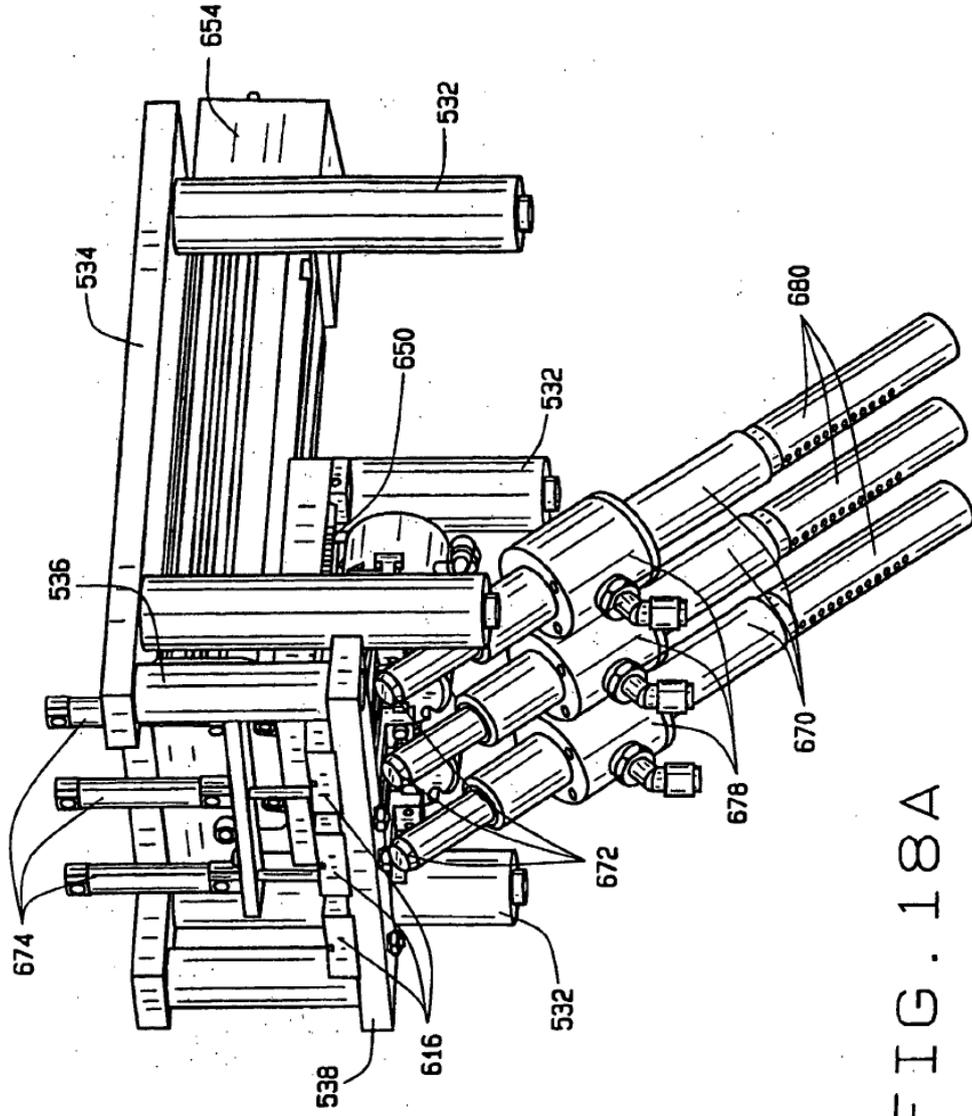


FIG. 18A

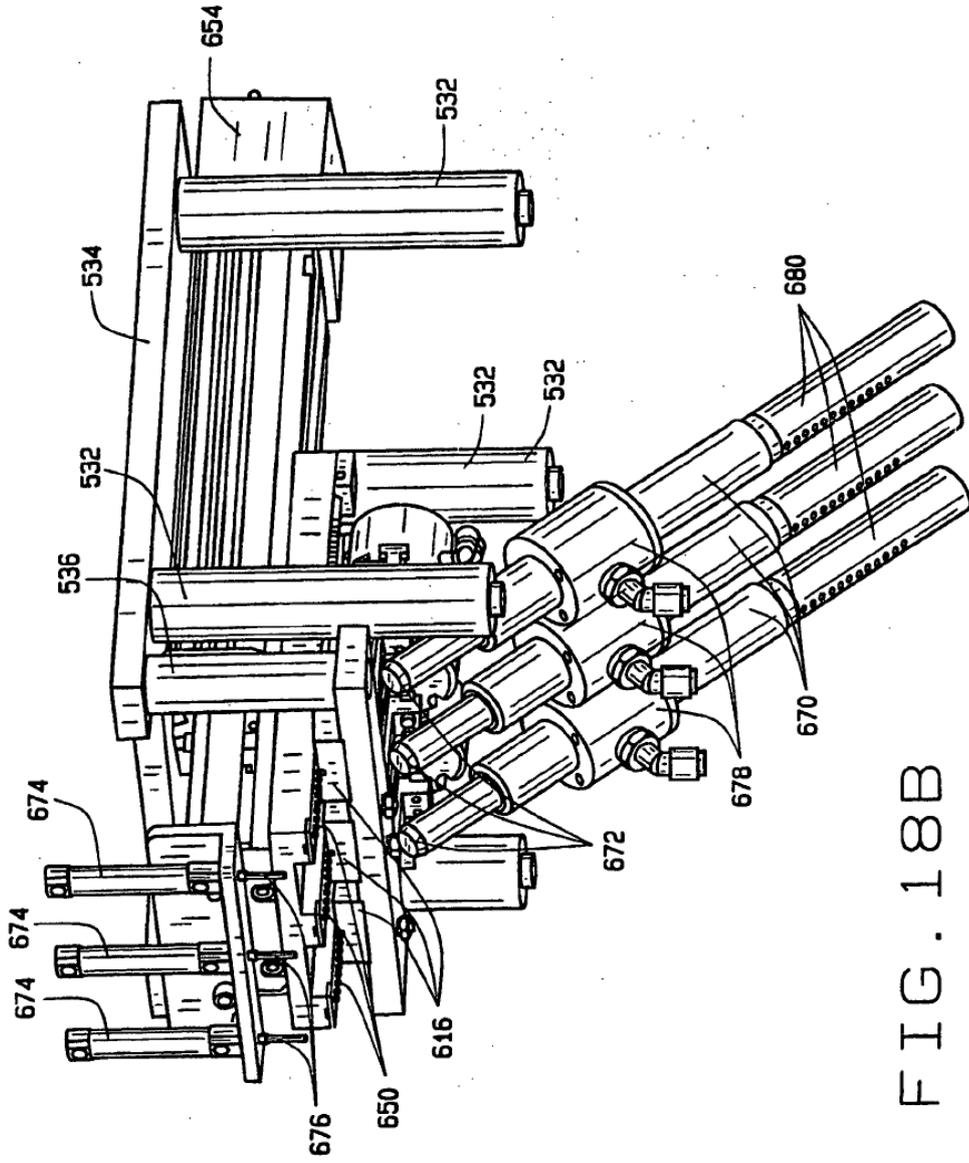


FIG. 18B

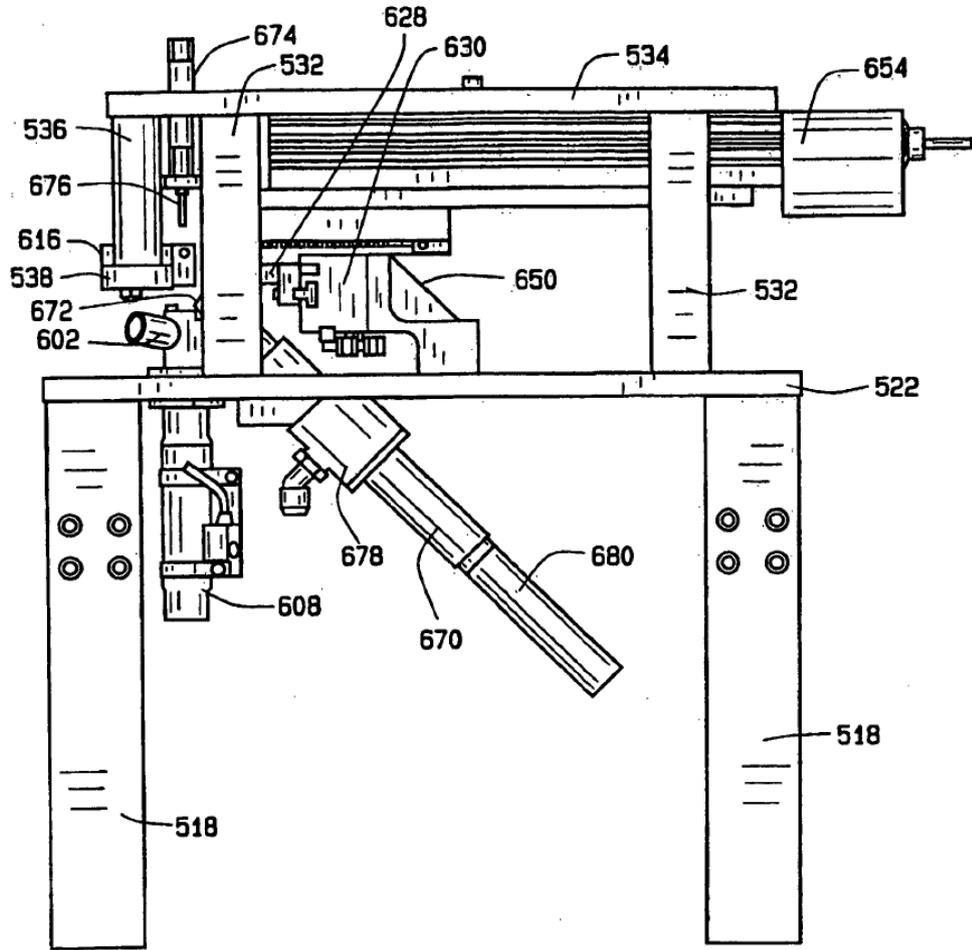


FIG. 19A

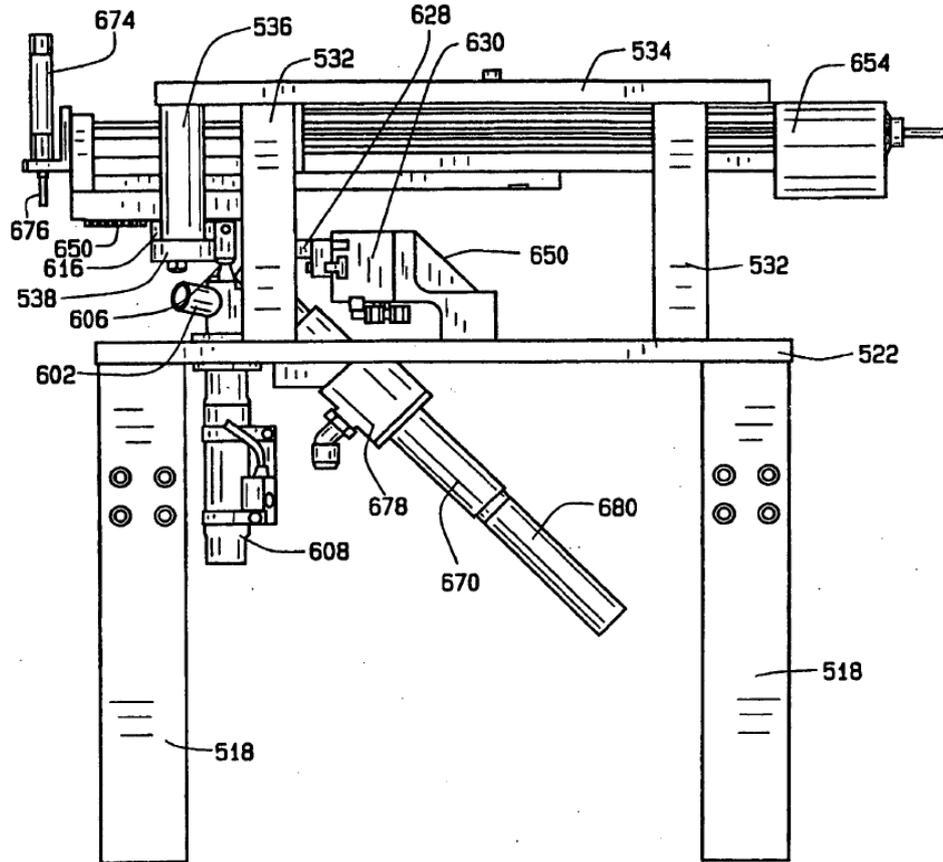


FIG. 19B

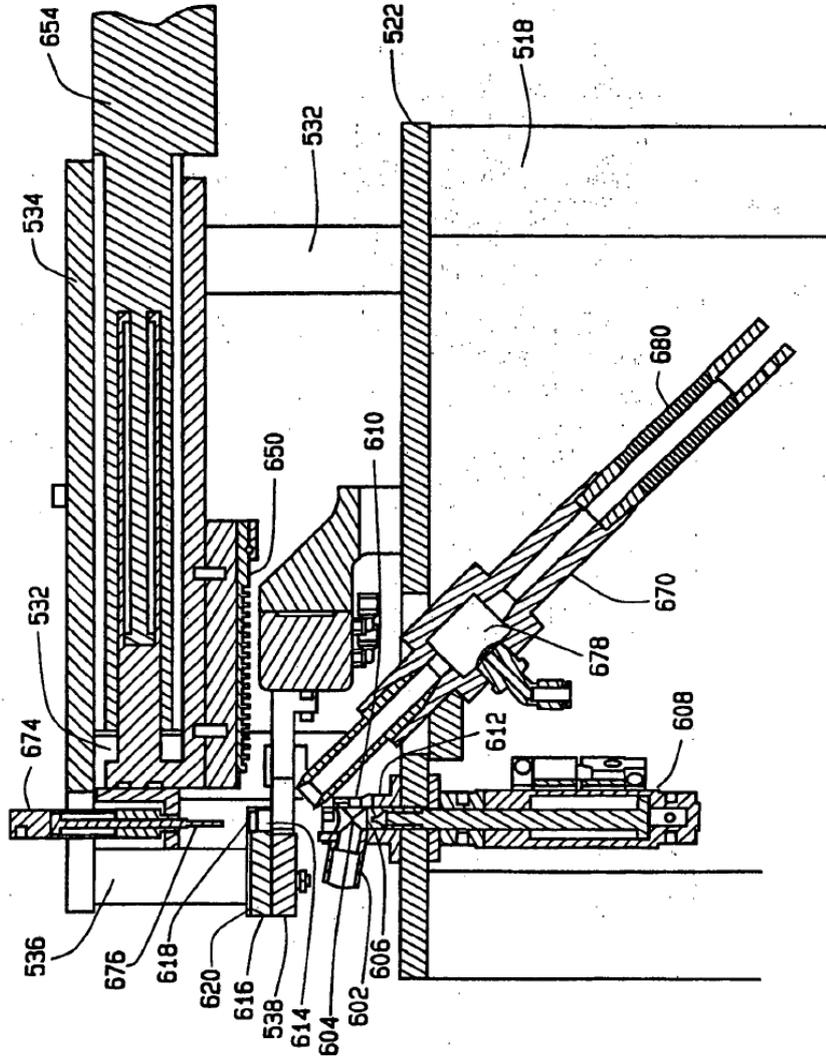


FIG. 20

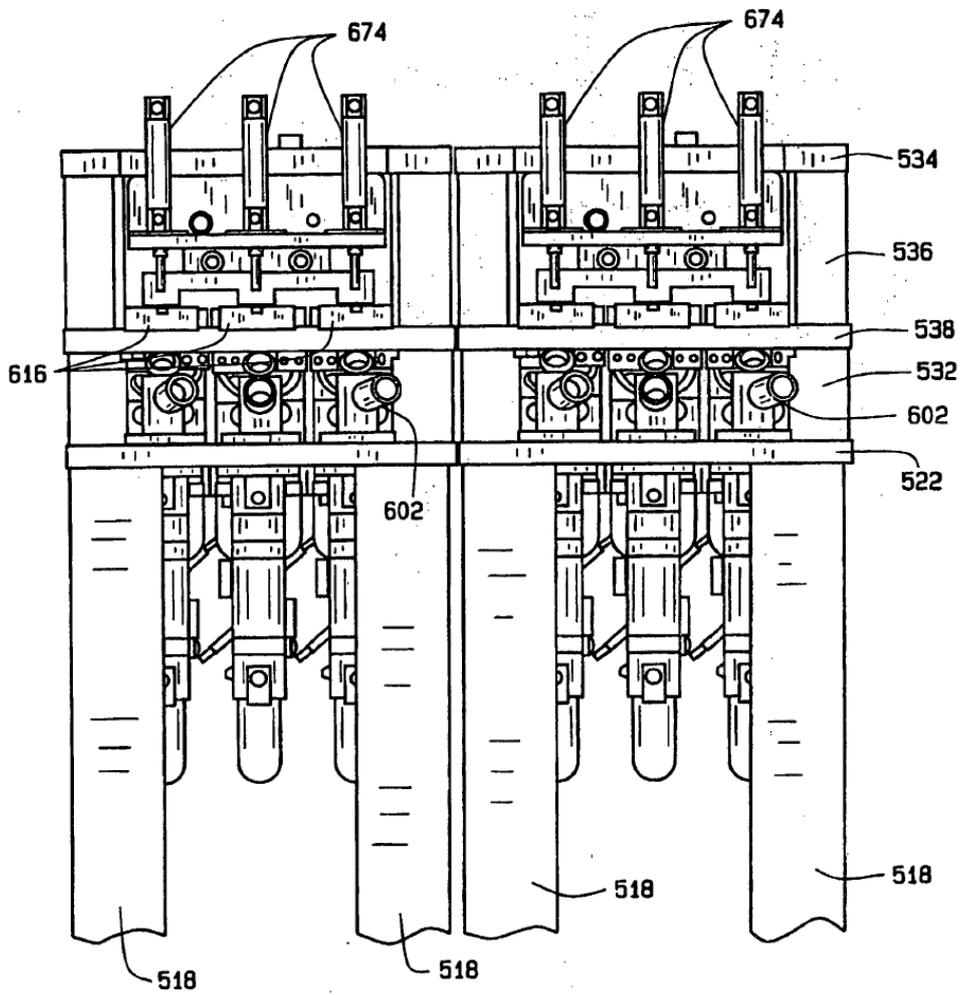


FIG. 21

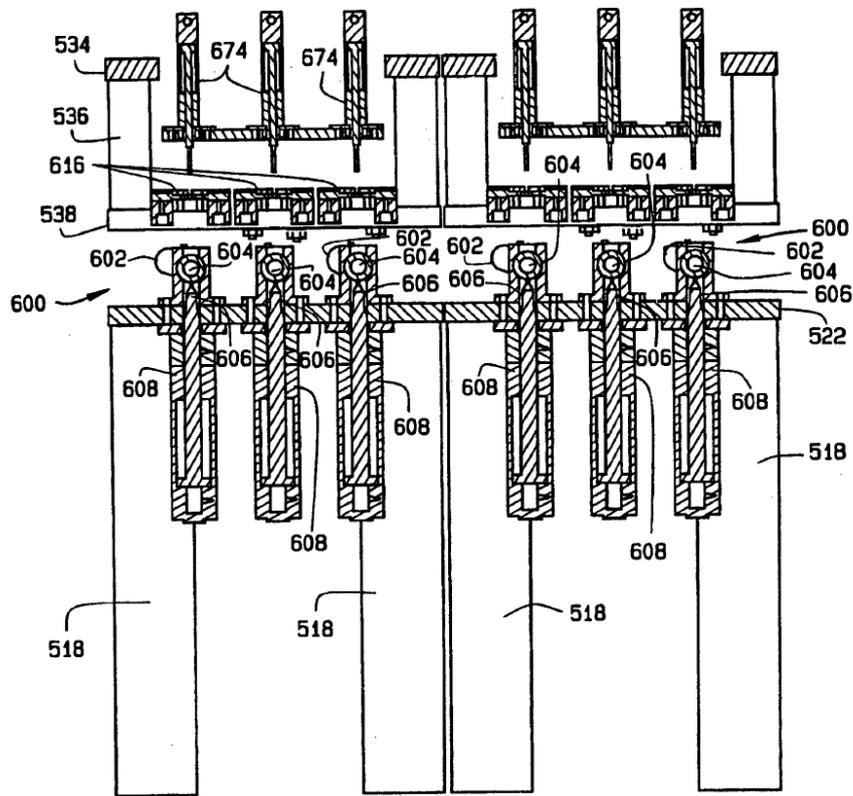


FIG. 22

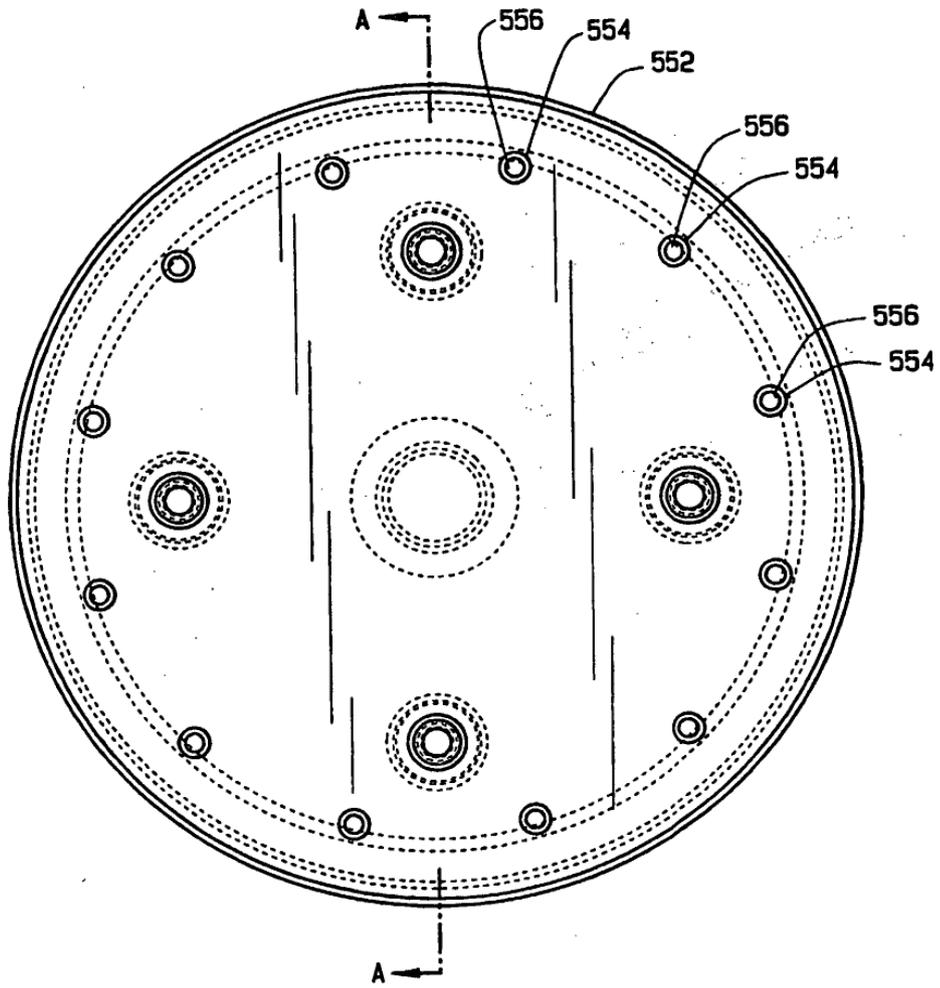


FIG. 23A

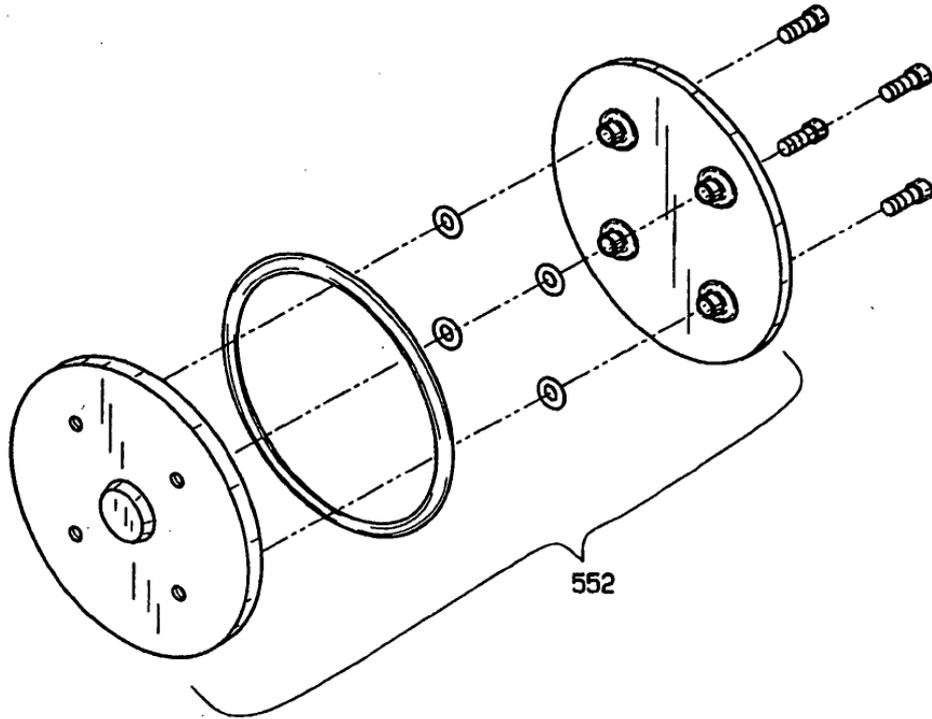


FIG. 23B

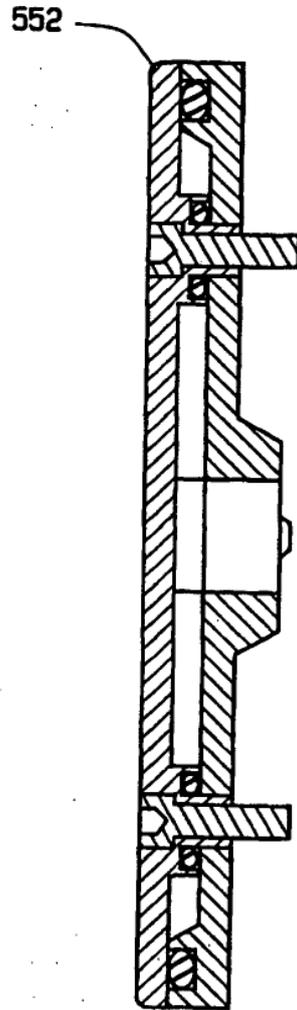


FIG. 23C

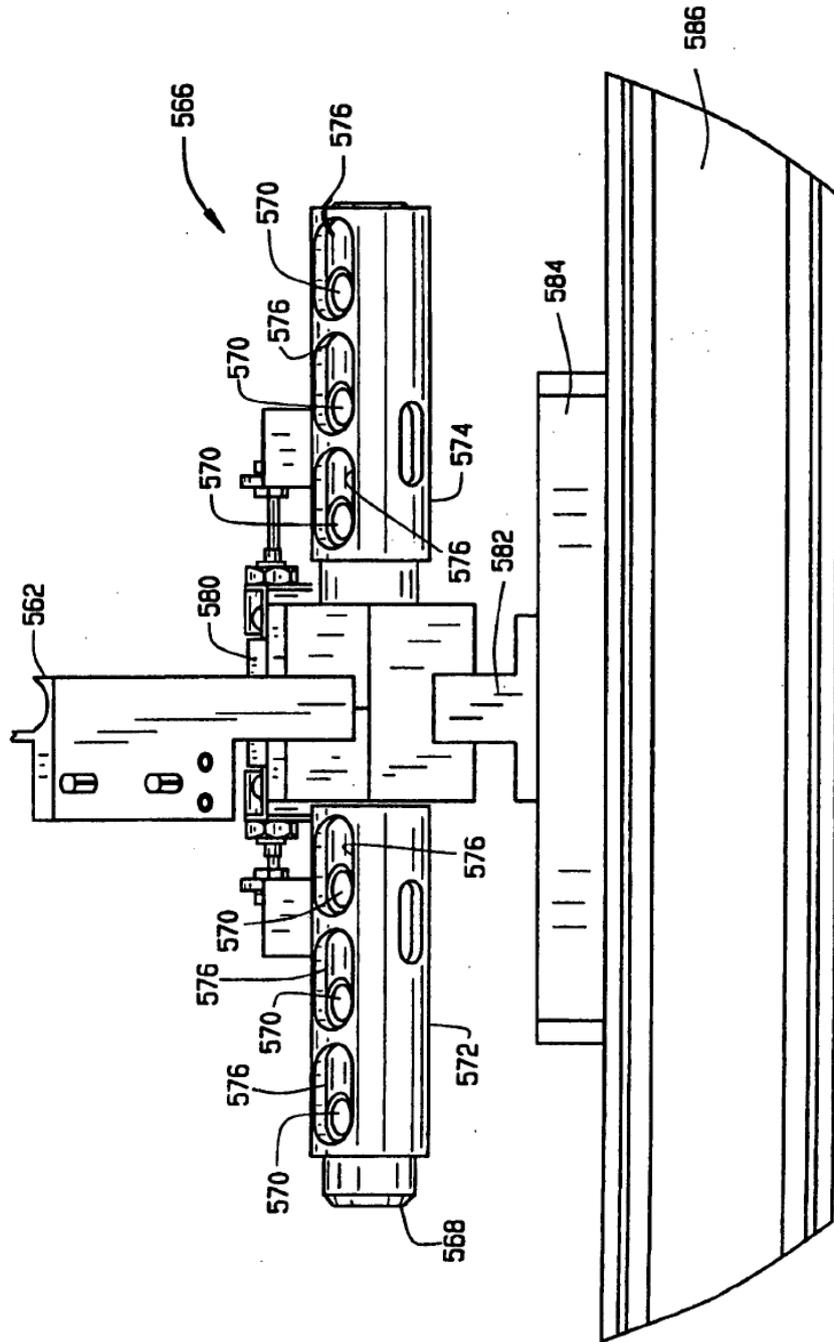


FIG. 24

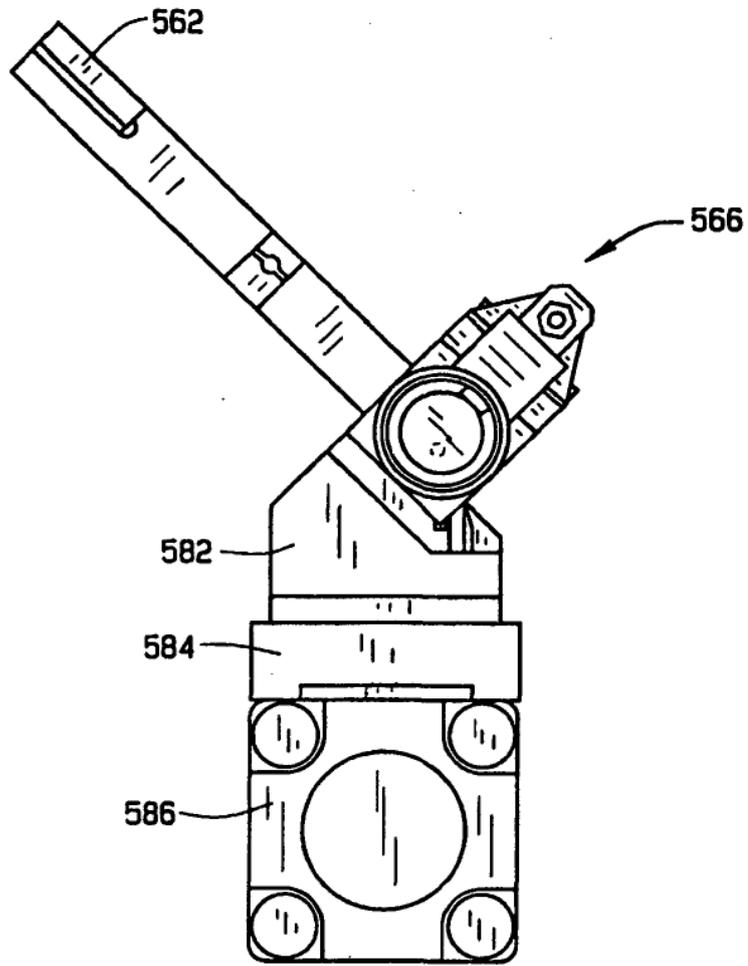
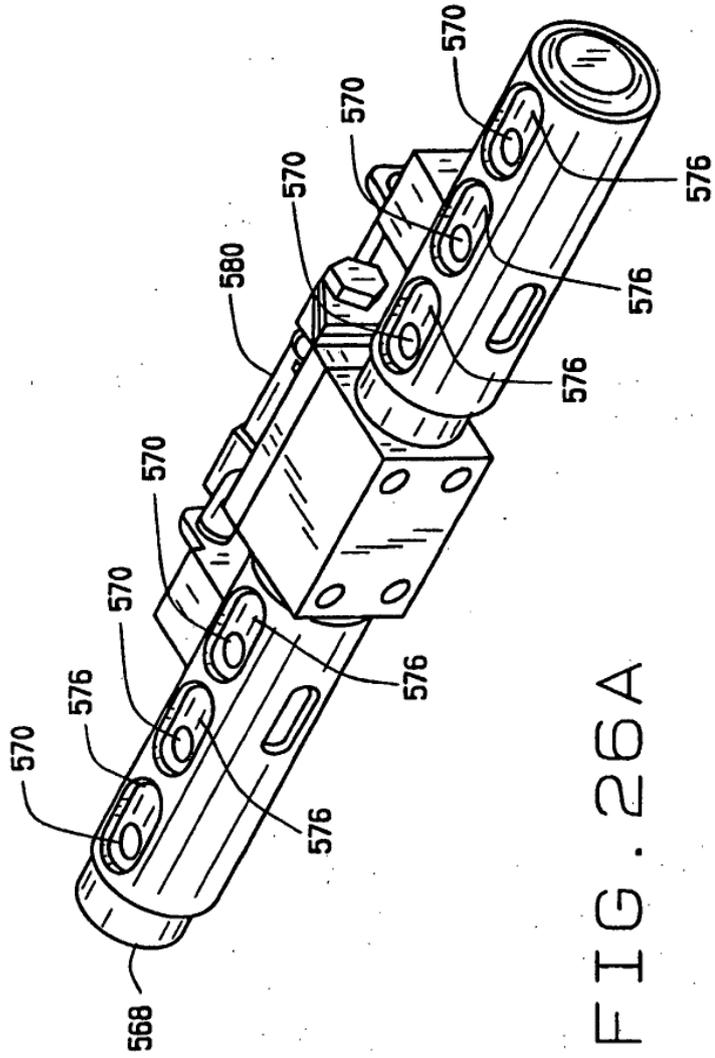


FIG. 25



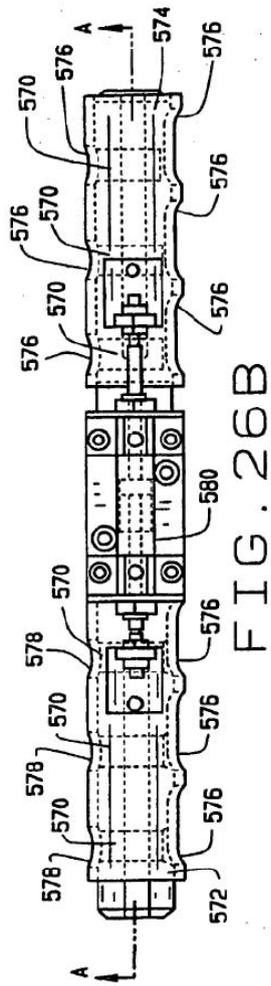


FIG. 26B

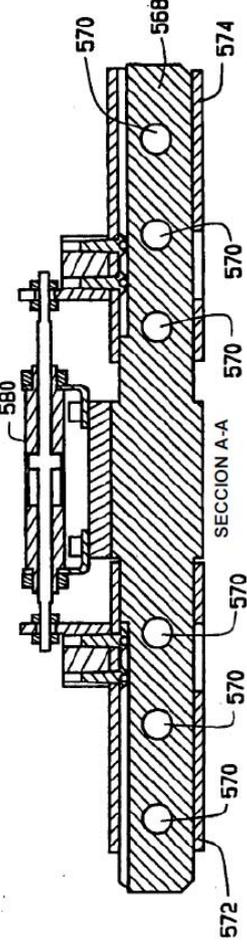


FIG. 26C

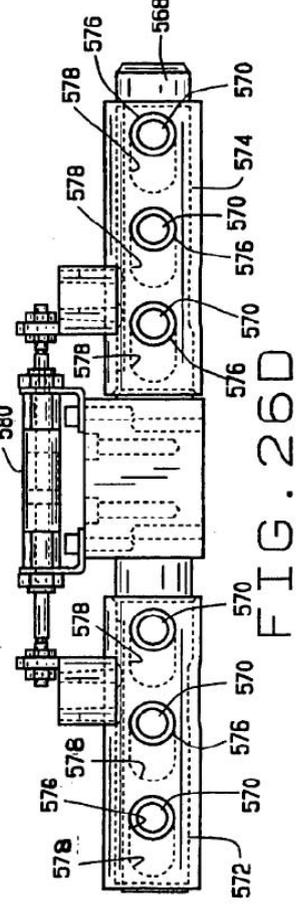
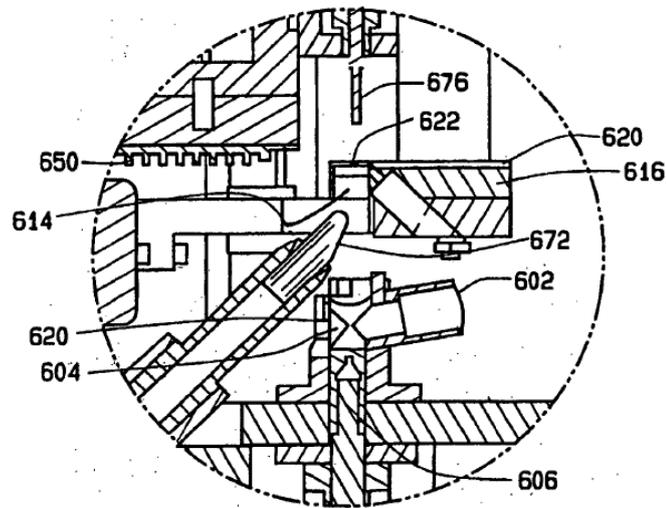
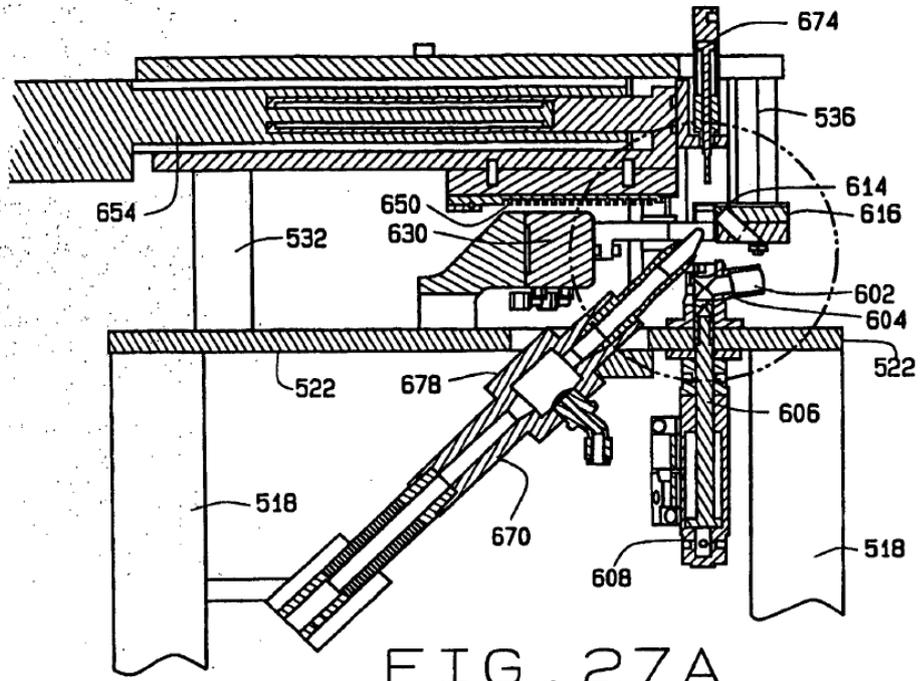


FIG. 26D



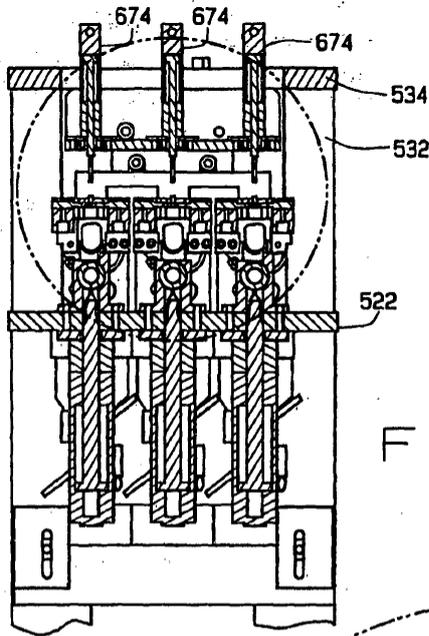


FIG. 28A

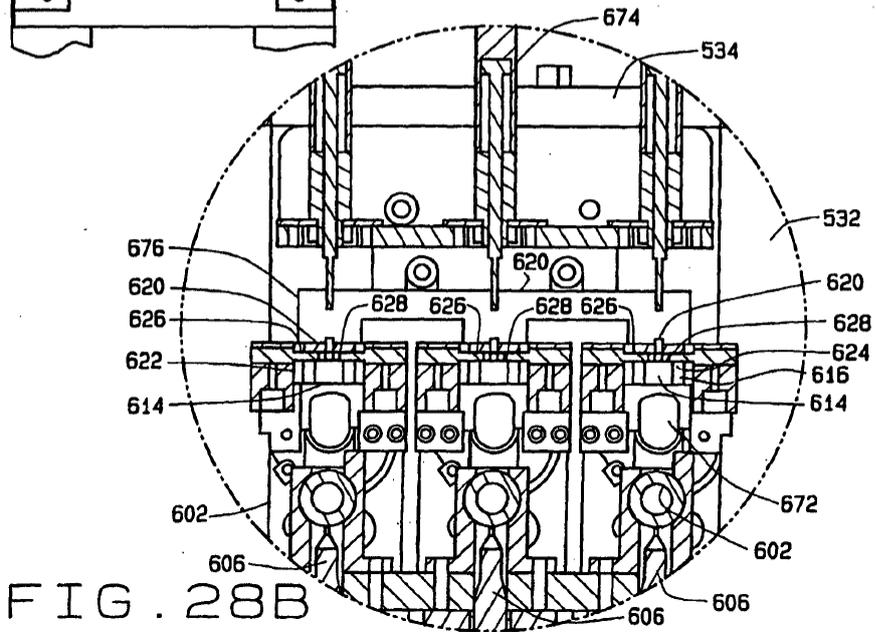


FIG. 28B

