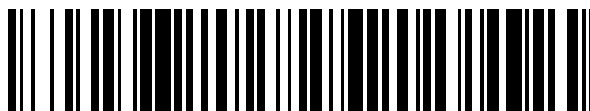


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 611 212**

51 Int. Cl.:

A01G 7/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.07.2012 PCT/US2012/048455**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.01.2013 WO13016603**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.07.2012 E 12746194 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.08.2016 EP 2736318**

54 Título: **Cinética de crecimiento de plantas capturada mediante seguimiento de movimiento**

30 Prioridad:

27.07.2011 US 201161512291 P

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

05.05.2017

73 Titular/es:

**DOW AGROSCIENCES LLC (100.0%)
9330 Zionsville Road
Indianapolis, Indiana 46268, US**

72 Inventor/es:

**SETLUR, PRADEEP;
PAI, REETAL;
GOLGOTIU, KIRSTI ALISE y
BEATTY, DOUGLAS**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 611 212 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

Cinética de crecimiento de plantas capturada mediante seguimiento de movimiento

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención está relacionada con la utilización de equipo de detección y seguimiento para obtener imágenes, monitorizar, seguir, y/o determinar un parámetro de cinética de crecimiento de plantas (por ejemplo, elongación de hojas de plantas y velocidad de crecimiento en altura). Se pueden utilizar un aparato de la invención y sus métodos asociados para examinar plantas por cribado de uno o más rasgos agronómicos, y/o para estudiar la

10 cinética de crecimiento de plantas y cultivares concretos, por ejemplo, en una plataforma de alto rendimiento.

ANTECEDENTES

Desde hace mucho tiempo los biólogos han deseado medir y predecir con precisión el crecimiento de las plantas. Estudios de crecimiento convencionales utilizando una regla proporcionaron información valiosa acerca del

15 crecimiento acumulado de las plantas a lo largo de periodos de tiempo prolongados. Dependiendo de la planta concreta, para obtener resultados significativos se suelen tomar medidas de parámetros de crecimiento a intervalos diarios. Como consecuencia de este periodo de intervalo relativamente largo, se pierde información detallada acerca del patrón de crecimiento diario y de posibles ritmos circadianos en la velocidad de crecimiento. Además, el contacto físico repetido y transitorio con las plantas durante la medición puede conducir a fenómenos tigmomorfogénicos, los

20 cuales producen como resultado un comportamiento de crecimiento alterado. Jaffe (1976) Z. Pflanzenphysiol. 78:24-32. Cuando se mide físicamente el crecimiento de una planta, cuanto mayor es la frecuencia con la que se mide el crecimiento, mayor debe ser la frecuencia con la que se establezca contacto con la planta y, de ese modo, con mayor frecuencia se verá sometida su velocidad de crecimiento a alteración tigmomorfogénica. De esta manera, estos problemas están relacionados.

25 Las plantas son capaces de responder rápidamente (por ejemplo, con respuestas que no pueden ser detectadas por medición diaria) a cambios en los factores ambientales, tales como la densidad de la radiación incidente, la calidad de la luz y la temperatura. Por ejemplo, varios estudios de crecimiento a corto plazo han revelado fenómenos que se han denominado "transitorios en la velocidad de crecimiento". Estos transitorios, aunque no contribuyen necesariamente de forma significativa a la elongación total de la planta, pueden proporcionar información acerca de las diferencias existentes en la cinética de las respuestas de crecimiento. Cosgrove (1981) Plant Physiol. 67:584-90; Gaba y Black (1983) Photochem. Photobiol. 38: 473-6; Kristie y Jolliffe (1986) Can. J. Botany 64: 2399-405; y Prat y Parésys (1995) Plant Physiol. Biochem. 33: 709-16. Para detectar respuestas rápidas de crecimiento, tales como

30 transitorios en la velocidad de crecimiento, los métodos de medida apropiados deben tener a la vez una frecuencia de muestreo suficientemente alta para capturar el fenómeno y una alta sensibilidad, dado que tales cambios en la velocidad de crecimiento pueden ser inferiores a unos pocos micrómetros por segundo.

Desde el uso de los auxanómetros autográficos a finales del siglo XIX para monitorizar fluctuaciones diurnas de crecimiento en longitud del tallo, los métodos para la medida continua del crecimiento de plantas se han venido

40 desarrollando de manera continua. Véanse Anderson y Kerr (1943) Plant Physiol. 18: 261-9; y Wilson (1948) Plant Physiol. 23: 156-7; Para obtener medidas de alta resolución de cambios en la elongación, se desarrollaron nuevos métodos para permitir el registro continuo preciso del crecimiento de plantas intactas. Véase, por ejemplo, Meijer (1968) Acta Bot. Neerl. 17:9-14 (transformadores diferenciales variables lineales). Desde entonces, se han aplicado frecuentemente transductores de desplazamiento para estudiar respuestas rápidas de crecimiento a la luz y a otras

45 condiciones ambientales. Penny et al. (1974) Can. J. Botany 52: 959-69; Cosgrove (1981), *supra*; Van Volkenburgh et al. (1983) Ann. Bot. 51:669-72; Lecharny et al. (1985) Plant Physiol. 79:625-9; Child y Smith (1987) Planta 172:219-29; Shinkle y Jones (1988) Plant Physiol. 86:960-6; Prat y Parésys (1989) Plant Physiol. Biochem. 27: 955-62; Bertram y Karlsen (1994) Sci. Hort. 58:139-50; y Ruiz Fernandez y Wagner (1994) J. Plant Physiol. 144: 362-9.

50 De manera alternativa, se han utilizado métodos ópticos de análisis de crecimiento, tales como, por ejemplo, la técnica de medición interferométrica (Fox y Puffer (1976) Nature 261:488-90; y Jiang y Staude (1989) J. Exp. Bot. 40:1169-73); fotografía por intervalos (Hart et al. (1982) Plant Cell Environ. 5:361-6; y Baskin et al. (1985) Plant Cell Environ. 8:595-603); y grabación en video (Jaffe et al. (1985) Plant Physiol. 77:722-30; MacDonald et al. (1987) Plant Cell Environ. 10:613-7; y Popescu et al. (1989) Photochem. Photobiol. 50:701-5). Estos métodos tienen la ventaja de

55 no requerir contacto físico con la planta.

BREVE SUMARIO DE LA INVENCION

En este documento se describen aparatos y métodos relacionados con aplicación de tecnología de detección y seguimiento de movimiento en un aparato adaptado para obtener imágenes, monitorizar, seguir, y/o determinar un

60 parámetro de cinética de crecimiento de plantas (por ejemplo, elongación de hojas de plantas y velocidades de crecimiento en altura). Algunas realizaciones proporcionan composiciones y métodos para la captura de cinética de la planta ventajosos con respecto a los sistemas convencionales y alternativos a ellos, incluyendo los métodos ópticos convencionales de análisis de crecimiento. Típicamente, los sistemas convencionales para la captura de cinética de la planta implican, o bien captura manual por medición de la longitud de las hojas y de la altura de la

65 planta a lo largo del tiempo, o bien captura de imagen digital por procesamiento de imágenes en serie utilizando procesamiento de imagen colorimétrico o manual. Estos dos procedimientos son caros e intensivos en mano de

obra. Algunas realizaciones de la invención proporcionan una plataforma automática que puede incrementar mucho el rendimiento para aplicaciones de examen de plantas por cribado de rasgos agronómicos (por ejemplo, tolerancia a la falta de agua, NUE, tolerancia al calor, tolerancia a la sal, etc.) reduciendo el tiempo necesario para adquisición y/o análisis de datos. En realizaciones concretas, el uso de marcadores reflectantes en conjunto con una o más cámaras adaptadas para mejorar la obtención de imágenes de los marcadores para medir el crecimiento de plantas puede proporcionar una estrategia eficiente y rentable para medir cinética de crecimiento de plantas en el campo de la investigación en agricultura.

Algunas realizaciones pueden incluir una estación de obtención de imágenes y de seguimiento del movimiento de crecimiento de muestras de plantas. En realizaciones concretas, una estación de obtención de imágenes y de seguimiento del movimiento de crecimiento de muestras de plantas puede comprender un volumen para muestras adaptado para contener al menos una muestra de planta (por ejemplo, una planta, parte de una planta, o tejido de una planta) que tiene al menos un marcador o marcadores que define(n) puntos físicos sobre la muestra de planta, una pluralidad de sensores de marcador situados en la periferia del volumen para muestras, y un procesador de captura de movimiento acoplado a la pluralidad de sensores de marcador para recibir datos de captura de movimiento procedentes de la pluralidad de sensores de marcador, y producir una representación digital que refleja el crecimiento de la muestra de planta. En estas realizaciones y en otras adicionales, una estación de obtención de imágenes y de seguimiento del movimiento de crecimiento de muestras de plantas puede producir una representación digital que comprende información espacial del crecimiento de la planta en tres dimensiones e información temporal del crecimiento de la planta.

Algunas realizaciones pueden incluir una estación de obtención de imágenes y de seguimiento del movimiento de crecimiento de muestras de plantas que comprende un volumen para muestras adaptado para contener más de una muestra de planta al mismo tiempo. Algunas realizaciones pueden incluir un procesador de captura de movimiento que es capaz de realizar funciones de captura de imágenes y de procesamiento de imágenes. En algunas realizaciones, una estación de obtención de imágenes y de seguimiento del movimiento de crecimiento de muestras de plantas comprende además una estación de trabajo y un dispositivo de almacenamiento de datos, estando la estación de trabajo y el dispositivo de almacenamiento acoplados al procesador de captura de movimiento.

En realizaciones concretas ejemplificadas en este documento, una estación de obtención de imágenes y de seguimiento del movimiento de crecimiento de muestras de plantas comprende sensores de marcador que pueden ser cámaras. Las muestras de plantas que se introducen en dicha estación de obtención de imágenes y de seguimiento del movimiento de crecimiento de muestras de plantas pueden tener uno o más marcadores que, o bien emiten luz que es detectada por las cámaras, o bien reflejan luz emitida en otro lugar hacia las cámaras para su detección. En estas realizaciones y en otras adicionales, una estación de obtención de imágenes y de seguimiento del movimiento de crecimiento de muestras de plantas puede comprender además un medio para mover el volumen para muestras sin mover los sensores de marcador con respecto al volumen para muestras. Un ejemplo de un medio de este tipo para mover el volumen para muestras sin mover los sensores de marcador con respecto al volumen para muestras es un pórtico elevado con el movimiento permitido que comprende al menos un sensor de marcador de la pluralidad de sensores de marcador.

En este documento también se describen métodos para monitorizar la cinética de crecimiento de una muestra de planta. Estos métodos pueden comprender en algunas realizaciones: definir un volumen para muestras adaptado para contener al menos una muestra de planta que tiene al menos un marcador o marcadores que define(n) puntos físicos sobre la muestra de planta; colocar una pluralidad de sensores de marcador en la periferia del volumen para muestras; adquirir datos de captura de movimiento utilizando la pluralidad de sensores de marcador; recibir datos de captura de movimiento procedentes de la pluralidad de sensores de marcador; y producir una representación digital que refleja el crecimiento de la muestra de planta. En realizaciones concretas, una representación digital comprende información espacial en tres dimensiones e información temporal.

También se describen métodos automáticos para monitorizar la cinética de crecimiento de una muestra de planta. Estos métodos pueden comprender en algunas realizaciones: definir un volumen para muestras adaptado para contener al menos una muestra de planta que tiene al menos un marcador o marcadores que define(n) puntos físicos sobre la muestra de planta; fijar una pluralidad de sensores de marcador a un medio para mover el volumen para muestras sin mover los sensores de marcador con respecto al volumen para muestras; colocar la pluralidad de sensores de marcador en la periferia del volumen para muestras; introducir en el volumen para muestras una muestra de planta que tiene al menos un marcador o marcadores que define(n) puntos físicos sobre la muestra de planta; adquirir datos de captura de movimiento utilizando la pluralidad de sensores de marcador; repetir la introducción de la muestra y la adquisición de datos con una siguiente muestra de planta; y recibir datos de captura de movimiento procedentes de la pluralidad de sensores de marcador y producir una representación digital que refleja el crecimiento de la muestra de planta.

Estos métodos manuales y automáticos se pueden utilizar en algunas realizaciones para examinar una muestra de planta por cribado de un rasgo de crecimiento de interés. En estas realizaciones y en otras, el método puede comprender: definir un volumen para muestras adaptado para contener al menos una muestra de planta que tiene al menos un marcador o marcadores que define(n) puntos físicos sobre la muestra de planta; colocar una pluralidad de

sensores de marcador en la periferia del volumen para muestras; introducir en el volumen para muestras una muestra de planta que tiene al menos un marcador o marcadores que define(n) puntos físicos sobre la muestra de planta; adquirir datos de captura de movimiento utilizando la pluralidad de sensores de marcador; recibir datos de captura de movimiento procedentes de la pluralidad de sensores de marcador y producir una representación digital que refleja el crecimiento de la muestra de planta; y analizar la reflexión digital para determinar si la muestra de planta comprende o no el rasgo de crecimiento de interés.

El uso de métodos de examen por cribado de acuerdo con algunas realizaciones puede facilitar en gran medida la identificación y el estudio de fenotipos de crecimiento de plantas, y el reconocimiento de plantas y cultivares de plantas que tengan tales fenotipos, incluso cuando tales fenotipos son difíciles o imposibles de reconocer mediante técnicas y métodos convencionales. Por ejemplo, pequeños cambios en partes o tejidos de plantas que son representativos de un crecimiento de la planta que se produce de forma transitoria o dinámica pueden ser percibidos, medidos, y modelados de acuerdo con realizaciones concretas de la presente invención, incluso cuando estos procesos transitorios o dinámicos son invisibles a simple vista o a técnicas de medida que tienen una baja frecuencia de muestreo.

Los rasgos anteriores y otros resultarán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de varias realizaciones, la cual procede con referencia a las figuras adjuntas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 incluye un diagrama de bloques que ilustra un aparato de acuerdo con algunas realizaciones.

La Figura 2 incluye una vista en planta de un volumen para muestras con una pluralidad de cámaras adaptadas para mejorar la obtención de imágenes de los marcadores para obtener imágenes del crecimiento de plantas situadas en el interior del volumen para muestras.

La Figura 3 incluye una vista lateral del volumen para muestras con una pluralidad de cámaras adaptadas para mejorar la obtención de imágenes de marcadores para obtener imágenes del crecimiento de plantas situadas en el interior del volumen para muestras.

La Figura 4 incluye una vista en planta del volumen para muestras que ilustra una disposición de ejemplo de la pluralidad de cámaras con respecto a un cuadrante del volumen para muestras.

La Figura 5 incluye una vista en planta del volumen para muestras que ilustra una disposición de ejemplo de la pluralidad de cámaras con respecto a esquinas del volumen para muestras.

La Figura 6a incluye una ilustración de un aparato de ejemplo de acuerdo con algunas realizaciones, que incluye una estación de obtención de imágenes y de seguimiento del movimiento, una matriz de cámaras conectadas a un pórtico elevado automático, equipo adjunto, y conexiones de equipos. La Figura 6b ilustra otro ejemplo de un aparato de este tipo, incluyendo una plataforma de automatización gravimétrica de alto rendimiento.

La Figura 7 incluye fórmulas útiles para cálculos de distancia y análisis de cinemática en coordenadas tridimensionales.

La Figura 8 incluye fotografías de captura de pantalla de las pantallas de la captura de imágenes con herramientas de seguimiento, y del conjunto de marcadores que se detecta en el campo de visión en relación con el plano a nivel de superficie establecido.

La Figura 9 incluye el cambio diario en la posición tridimensional en el espacio desde la ubicación inicial hasta la ubicación final.

La Figura 10 incluye desplazamiento acumulado (valores en metros) de marcadores fijados a tres hojas diferentes a lo largo del tiempo.

La Figura 11 incluye fotografías de capturas de pantalla de la captura de imágenes con herramientas de seguimiento a lo largo del transcurso de 12 días.

La Figura 12 incluye valores de desplazamiento diario de la hoja para múltiples plantas medidos utilizando las herramientas de seguimiento de movimiento.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

I. Visión general de varias realizaciones

En este documento se describe equipo de seguimiento de movimiento adaptado específicamente, y métodos para su utilización, para obtener imágenes, monitorizar, seguir, y/o determinar un parámetro de cinética de crecimiento de plantas. En algunas realizaciones, se utilizan marcadores en conjunto con un conjunto de sensores de marcador adaptados para mejorar la detección de los marcadores para determinar la posición de una ubicación fija sobre una planta, parte de planta o tejido de planta a lo largo del tiempo. A partir de estos datos de posición dependientes del tiempo se pueden calcular y extrapolar parámetros de cinética del crecimiento de la planta. En realizaciones concretas, una composición, un método y/o un aparato para capturar cinética del crecimiento de plantas mediante seguimiento de movimiento se puede utilizar para comparar el crecimiento de plantas individuales bajo condiciones ambientales iguales o diferentes, proporcionando de este modo un sistema relativamente barato, rápido, y/o de alto rendimiento para examinar plantas por cribado de rasgos agronómicos específicos.

La amplia utilidad del sistema descrito en el presente documento ha sido ejemplificada y validada detectando diferencias en las velocidades de crecimiento entre plantas bien regadas y plantas tratadas con falta de agua que

pueden haber evitado ser detectadas mediante herramientas y métodos convencionales. De esta manera, algunas realizaciones incluyen métodos para examinar plantas por cribado de un rasgo o fenotipo que tiene un efecto sobre el crecimiento de una planta. Estos rasgos y fenotipos incluyen, por ejemplo y sin limitación, tolerancia a la falta de agua, NUE, tolerancia al calor, y tolerancia a la sal.

En algunas realizaciones de ejemplo, se puede aplicar un material marcador reflectante a la superficie de una muestra de planta (por ejemplo, una planta, parte de planta, o tejido de planta). El marcador se puede aplicar sin dañar la muestra de planta, y el marcador puede permanecer visible para al menos un sensor de marcador bajo condiciones de invernadero durante el tiempo que dure un experimento de crecimiento planeado. La posición del marcador se puede determinar, por ejemplo y sin limitación, utilizando un flash de cámara digital estándar en condiciones de completa oscuridad. La posición del material del marcador a lo largo del tiempo se puede seguir mediante análisis de imágenes sobre un plano bidimensional, y/o dentro de un volumen tridimensional.

En estas y en otras realizaciones, el equipo y aparato de detección y seguimiento de movimiento puede ser automático, y puede facilitar la adquisición y análisis de datos de alto rendimiento con mínima interacción física entre el profesional y las plantas de muestra.

II. Abreviaturas

ATSC	estándares de transmisión de televisión digital desarrollados por el <u>Advanced Television Systems Committee</u>
CG	gráficos por ordenador
IR	infrarrojo
LED	diodo emisor de luz
NUE	eficiencia en el uso del nitrógeno
NTSC	estándares de transmisión de televisión analógica desarrollados por el <u>National Television Systems Committee</u>
V4	cuarta etapa de la hoja
V6	sexta etapa de la hoja

III. Términos

Marco temporal: Tal como se usa en este documento, el término “marco temporal” se refiere a un periodo de tiempo, o un grupo de diferentes periodos de tiempo, en el cual se calcula una posición de un marcador que se captura mediante seguimiento de movimiento. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un marco temporal puede ser un periodo que comienza en el instante en que se calcula la posición de un marcador, y que finaliza en el instante en que se calcula la posición de un siguiente marcador. En estas y en otras realizaciones, un marco temporal puede incluir cálculos de posición de marcadores adicionales entre los cálculos del punto de comienzo y del punto de fin. Por ejemplo, un marco temporal puede ser el periodo de tiempo durante el cual se realiza un estudio o experimento completo de seguimiento de movimiento. En algunos ejemplos, a este marco temporal completo se le puede denominar de forma alternativa el “periodo de muestreo completo”.

Marcadores: Tal como se usa en este documento, el término “marcador” se refiere a un medio para marcar una ubicación específica sobre un objeto tridimensional en el espacio. La posición de un marcador en el espacio en un instante concreto puede ser determinada por un sensor de marcador (por ejemplo, una cámara). Los marcadores incluyen, pero no están limitados a, marcadores pasivos, marcadores activos, marcadores reflectantes, marcadores retrorreflectantes, marcadores LED, marcadores fotosensibles, marcadores radiotransmisores, marcadores acústicos, marcadores inerciales, marcadores magnéticos, y combinaciones de cualquiera de los anteriores. En algunas realizaciones, un marcador reflectante puede ser iluminado por luz de una longitud de onda concreta o de un rango de longitudes de onda concreto (por ejemplo, IR) emitida desde un LED montado alrededor de o sobre una lente de cámara (por ejemplo, con un filtro paso IR colocado sobre la lente de la cámara), y el marcador reflectante puede reflejar la luz hacia la lente de la cámara, la cual puede detectar la luz reflejada. En realizaciones concretas, se utilizan marcadores con forma de perla altamente reflectantes en conjunto con una o más cámaras adaptadas para mejorar la obtención de imágenes de los marcadores para obtener imágenes del crecimiento de plantas. Una cámara se puede adaptar para mejorar la obtención de imágenes de un marcador, por ejemplo, a través del uso de un filtro.

Centroide: El centroide de un marcador es una posición estimada dentro de una imagen bidimensional capturada. En realizaciones que utilizan una cámara como sensor de marcador, el valor de escala de grises de cada píxel adquirido por la cámara se puede utilizar para estimar la posición del centroide de un marcador concreto con precisión mayor que un píxel, encontrando el centroide de una función gaussiana ajustada de la posición del marcador.

Seguimiento de movimiento: Tal como se usa en este documento, el término “seguimiento de movimiento” abarca un grupo grande y variado de tecnologías para registrar y/o calcular el desplazamiento de una o más ubicaciones sobre un objeto tridimensional a lo largo del tiempo en un volumen para muestras (por ejemplo, sistemas basados en imagen, tales como sistemas ópticos). Los sistemas basados en imagen determinan la posición en tres dimensiones de puntos predeterminados (por ejemplo, ubicaciones de marcadores) sobre un objeto tridimensional utilizando múltiples cámaras para que cada una de ellas registre la posición de los puntos en una imagen bidimensional. El desplazamiento se registra/calcula a través de la captura de múltiples imágenes bidimensionales del volumen para

muestras, incluyendo el objeto, correspondientes a marcos temporales secuenciales. Técnicas estereométricas correlacionan puntos predeterminados sobre un objeto en cada imagen, y utilizan esta información correlativa con una relación conocida entre cada una de las imágenes y parámetros de la cámara para calcular la posición del punto.

Los sistemas ópticos de seguimiento de movimiento ("sistemas ópticos") utilizan datos capturados procedentes de sensores ópticos de marcador para triangular la posición tridimensional de un marcador dentro del campo de visión de una o más cámaras ("área de captura") calibradas para proporcionar proyecciones de imágenes bidimensionales que se solapan. El seguimiento de un gran número de objetos en el volumen para muestras, o la expansión del área de captura, se puede conseguir mediante la adición de más cámaras. En algunas realizaciones, un sistema óptico produce datos con tres grados de libertad para cada marcador, y de la orientación relativa de tres o más marcadores se puede inferir información rotacional. En las primeras etapas de la evolución de los sistemas ópticos de seguimiento de movimiento, dichos sistemas podían seguir a sólo aproximadamente una docena de marcadores dentro de un volumen para muestras. Sin embargo, los sistemas ópticos más recientes pueden seguir a más de 100 marcadores simultáneamente en tiempo real.

Los sistemas ópticos de seguimiento de movimiento pueden utilizar cualquier sistema de iluminación de los muchos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los "sistemas de luz estructurada" utilizan láseres o luz dirigida para crear un plano de luz que se mueve realizando un barrido a través del volumen para muestras. Los sistemas ópticos basados en LEDs pulsados miden luz emitida por uno o más LEDs colocados en puntos predeterminados sobre el objeto. Los sistemas ópticos basados en marcadores reflectantes miden luz reflejada por uno o más marcador(es), colocado cada uno de ellos en un punto predeterminado sobre el objeto. Los sistemas ópticos sufren potencialmente problemas de oclusión (línea de visión) cuando quiera que esté bloqueada una trayectoria de luz requerida (tal como la trayectoria desde un marcador reflectante hasta un sensor de marcador fotosensible). La interferencia provocada por otras fuentes o reflexiones de luz también puede ser un problema en realizaciones en las que dichas otras fuentes o reflexiones de luz son detectables en el volumen para muestras. Dicha interferencia puede producir como resultado "marcadores fantasma".

También son posibles sistemas ópticos basados en seguimiento de movimiento de cámara de un objeto sin el uso de marcadores ("seguimiento de movimiento sin marcadores"), pero por lo general son menos precisos que los sistemas basados en marcadores. No obstante, en algunas realizaciones puede ser deseable el seguimiento de movimiento sin marcadores, por ejemplo, en aquellas realizaciones en las que se desea evitar por completo el contacto físico de un objeto con un marcador. El seguimiento de movimiento sin marcadores se describe con mayor detalle más adelante.

Los "sistemas ópticos activos" triangulan posiciones de marcadores iluminando un marcador de fuente de luz (por ejemplo, un LED situado dentro de o sobre un marcador) en cada instante muy rápidamente, o iluminando múltiples marcadores de fuente de luz a la vez, y utilizando software para identificar los marcadores por sus posiciones relativas. En un sistema óptico activo, en vez de reflejar luz que es generada externamente, los mismos marcadores emiten su propia luz. Al proporcionar 1/4 de la potencia a dos veces la distancia (ley de la Inversa de los Cuadrados de la Distancia), los sistemas ópticos activos pueden incrementar las distancias y el volumen para muestras para captura de movimiento. A cada marcador se le puede proporcionar potencia secuencialmente en fase con el sistema de captura, proporcionando de este modo una identificación única de cada marcador para un marco temporal de captura dado. La capacidad de identificar cada marcador de esta manera puede ser útil en aplicaciones en tiempo real. Un método alternativo de identificar marcadores en un sistema óptico activo es hacerlo de forma algorítmica.

Los sistemas de marcadores activos se pueden refinar aún más iluminando un marcador en cada instante (es decir, "iluminando estroboscópicamente"), o siguiendo a múltiples marcadores a lo largo del tiempo y modulando la amplitud o la anchura de los pulsos para identificar de manera única marcadores concretos. Las identificaciones de marcadores únicos pueden reducir el tiempo necesario para el procesamiento de datos, por ejemplo, eliminando el intercambio de marcadores y proporcionando datos mucho más limpios que otras tecnologías. Los LEDs con procesamiento incorporado y sincronización por radio permiten captura de movimiento en exteriores con luz solar directa, a la vez que capturan al menos 480 fotogramas por segundo mediante el uso de un obturador electrónico de alta velocidad. El procesamiento informático de marcadores modulados permite menos "limpieza a mano" o resultados filtrados, y de esta forma puede conducir a costes operativos menores.

Los "sistemas ópticos pasivos" utilizan marcadores que están contruidos de, o recubiertos con, un material reflectante para reflejar luz emitida en otro lugar hacia las lentes de las cámaras. En realizaciones concretas, un umbral del sensor de marcador reflectante se puede ajustar, de tal manera que sólo se muestrearán los marcadores reflectantes, por ejemplo, hasta la exclusión de luz reflejada por material natural de planta. A diferencia de los sistemas activos y de los sistemas magnéticos, los sistemas pasivos no requieren que se fijen cables o equipos electrónicos al objeto sometido a seguimiento. En vez de esto, objetos pequeños (por ejemplo, bolas o perlas de goma) se pueden fijar sólo a una ubicación sobre el objeto que se mueve. Estos objetos pequeños se pueden fijar mediante cualquier medio de fijación apropiado (por ejemplo, cinta adhesiva, Velcro, cordones, etc.). Los objetos pequeños pueden ser ellos mismos reflectantes, o al objeto que se mueve se puede fijar un objeto no reflectante con unos medios de fijación reflectantes. Los marcadores reflectantes para ser utilizados en un sistema óptico pasivo

pueden ser más pequeños y más ligeros que los marcadores para sistemas activos, y de esta forma su uso puede producir como resultado menor alteración física para una planta en crecimiento. Por consiguiente, en algunas realizaciones, se prefieren los sistemas ópticos pasivos.

En algunas realizaciones también se puede utilizar "seguimiento de movimiento no tradicional", en el cual proyectores IR de LEDs múltiples construidos especialmente codifican ópticamente el volumen para muestras, y marcadores fotosensibles para decodificar las señales ópticas. Un ejemplo de uno de estos sistemas no tradicionales es Prakash™, el cual utiliza proyectores de alta velocidad de LEDs múltiples. Fijando "marcadores de decodificación" (llamados así porque estos marcadores decodifican señales, en lugar de transmitir una señal que es decodificada por equipos diferentes) con sensores de luz en ubicaciones sobre una planta situada dentro del volumen para muestras, los marcadores de decodificación pueden calcular, no sólo sus propias posiciones en el volumen para muestras a lo largo del tiempo, sino también sus orientaciones, iluminaciones incidentes, y reflectancias. Dichos marcadores de decodificación pueden trabajar en condiciones de iluminación natural, y se pueden fijar a una ubicación sobre una planta mediante cualquier medio de fijación apropiado. Los sistemas de seguimiento de movimiento no tradicionales pueden soportar un número ilimitado de marcadores dentro de un volumen para muestras, estando cada marcador identificado de forma única para eliminar problemas de readquisición de marcadores. Dado que un sistema como este puede eliminar la necesidad de disponer de una cámara de alta velocidad, y de un correspondiente flujo de imágenes de alta velocidad, requiere un ancho de banda de datos significativamente menor. Como se ha indicado anteriormente, los marcadores de decodificación también pueden proporcionar datos de iluminación incidente, los cuales se pueden utilizar para monitorizar cambios en la luz experimentada por la planta en la ubicación del marcador a lo largo del tiempo.

Captura de movimiento sin marcadores: recientemente se ha producido un rápido desarrollo en el área de la "captura de movimiento sin marcadores". Los sistemas sin marcadores actuales están basados en gran medida en técnicas de visión artificial de reconocimiento de patrones, y a menudo requieren considerables recursos computacionales. Se han diseñado algoritmos informáticos especiales para permitir que el sistema analice múltiples flujos de entrada óptica, identifique las formas de objetos contenidos en el volumen para muestras, y reduzca computacionalmente los objetos a sus partes constituyentes para realizar un seguimiento de ellas. Ejemplos de métodos para seguimiento de movimiento sin marcadores se describen, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. 7.257.237.

Rasgo: Tal como se utiliza en este documento, el término "rasgo" se refiere a una característica medible de un individuo. Algunos rasgos pueden ser útiles para agrupar o tipificar varios individuos en una única cohorte. En este documento los términos "rasgo" y "fenotipo" se utilizan de manera intercambiable. De particular interés en algunas realizaciones de la invención son los rasgos relacionados con el crecimiento y/o la morfología de las plantas.

Algunas realizaciones incluyen uno o más "rasgo(s) agronómicos". Tal como se utiliza en este documento, el término "rasgo agronómico" se puede referir a rasgos tales como, por ejemplo y sin limitación, características de crecimiento aumentadas o alteradas, tolerancia al estrés (por ejemplo, a falta de agua, NUE, al calor, al sal, etc.), resistencia a las enfermedades y a los insectos, composición del aceite de la semilla modificada, proteína de semilla modificada, y expresión de uno o más transgenes en un organismo transgénico. Algunos ejemplos incluyen rasgos agronómicos que producen como resultado un crecimiento de la planta aumentado o reducido en una condición ambiental concreta o en un conjunto de condiciones concreto.

IV. Captura de cinética de crecimiento de planta por seguimiento de movimiento y obtención de imágenes

Los métodos y composiciones descritos en este documento emplean detección y seguimiento de movimiento para abordar problemas de crecimiento, morfología, y fisiología de las plantas. En algunas realizaciones, se pueden utilizar equipos, software, y técnicas de detección y seguimiento de movimiento para cuantificar con precisión parámetros de crecimiento de plantas; por ejemplo, elongación de hojas de la planta, y altura de la planta. En realizaciones concretas, estos parámetros se pueden cuantificar en tiempo real, y opcionalmente de una manera totalmente automática.

Adquisición de Imágenes

Típicamente, el seguimiento de movimiento utiliza uno o más marcadores en un espacio tridimensional (denominado en algunos lugares de este documento el "volumen para muestras"), y el equipo de seguimiento de movimiento está configurado para localizar con precisión el marcador o los marcadores en ese espacio. El equipo de seguimiento de movimiento se puede utilizar para muestrear la ubicación del marcador o marcadores a alta frecuencia. Cuando se analizan una serie de muestras de este tipo, se puede reconstruir el movimiento del marcador o marcadores a lo largo de la duración del experimento. En sistemas ópticos, la selección del intervalo de tiempo para la obtención de imágenes depende, por ejemplo, de la velocidad necesaria para capturar el desplazamiento del objeto cuando éste se produce. Dependiendo de la fuente de luz utilizada, la selección del intervalo también puede depender de los requisitos del sistema (por ejemplo, mantener baja la luz del láser debido a su efecto dañino sobre las plantas). El tamaño del marcador o marcadores utilizado(s) puede influir en la sensibilidad del muestreo de ubicación del marcador o marcadores. Sin embargo, localizando el centroide del marcador, se pueden medir desplazamientos menores que el diámetro o la anchura del marcador.

En un sistema óptico de seguimiento de movimiento se produce oclusión cuando una trayectoria de luz deseada entre un marcador y un sensor de marcador está bloqueada, por ejemplo, por una parte de planta que se mueve colocándose entre el marcador y el sensor durante el crecimiento de la planta. La oclusión se puede solucionar utilizando más cámaras. Además, se puede utilizar post-procesamiento manual para recuperar trayectorias cuando un marcador se pierde de vista. La selección de una cámara concreta para su utilización en algunas realizaciones queda a discreción del profesional, y puede implicar consideración de muchas variables, incluyendo por ejemplo y sin limitación, compatibilidad con otros equipos, coste, campo de visión, espacio de movimiento, velocidad de adquisición de imágenes, y resolución. Por ejemplo, generalmente una cámara concreta puede proporcionar mayor resolución de desplazamiento si se enfoca sobre un campo de visión más pequeño, pero esto limita el tamaño de los desplazamientos cuyo seguimiento se puede realizar. En vista de estas limitaciones de sistemas concretos, con estos sistemas se pueden utilizar procedimientos de post-procesamiento para analizar, procesar, y limpiar datos antes de que se apliquen.

En algunas realizaciones que utilizan un sistema óptico, se puede utilizar un objeto con marcadores fijados en posiciones conocidas para calibrar las cámaras y obtener sus posiciones, y se puede medir la distorsión de la lente de cada cámara. Si dos cámaras calibradas pueden localizar un marcador concreto en cada uno de sus dos campos de obtención de imágenes bidimensionales, se puede obtener una posición tridimensional del marcador. En algunas realizaciones, un sistema óptico puede comprender aproximadamente dos, tres o más cámaras. Por ejemplo, en realizaciones concretas, un sistema óptico puede comprender entre aproximadamente 2 y aproximadamente 25 cámaras (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, y 27 cámaras). Existen sistemas de más de 100 cámaras para reducir el intercambio de marcadores. En algunos ejemplos puede ser necesaria la adición de más cámaras para proporcionar cobertura total del volumen para muestras y seguimiento de movimiento de múltiples plantas. El "intercambio de marcadores" se puede producir en realizaciones que utilizan marcadores que son idénticos con respecto a los sensores de marcador. Software restringido que reduce el intercambio de marcadores está disponible comercialmente de varias fuentes.

Los sistemas ópticos de seguimiento de movimiento pueden, en algunas realizaciones, capturar grandes números de marcadores a frecuencias de obtención de imágenes tal altas como, por ejemplo, 2000 Hz. La frecuencia de obtención de imágenes disponible para un dado es un compromiso entre resolución y velocidad. Típicamente, el vídeo NTSC proporciona una velocidad de muestreo de aproximadamente 30 Hz. Las personas con experiencia en la técnica apreciarán que la mayoría de los procesos de crecimiento de plantas se producen a velocidades que son suficientemente lentas para que se pueda realizar su seguimiento con éxito a velocidades de muestreo mucho menores. De esta manera, por lo general para la mayoría de las aplicaciones y en la mayoría de las realizaciones será suficiente vídeo NTSC o ATSC.

En realizaciones de la presente invención, se puede utilizar cualquier sistema de seguimiento de movimiento, y la selección de un sistema concreto queda a discreción del profesional, en vista del fenómeno de crecimiento de planta cuyo seguimiento se quiere hacer, y de otras consideraciones de diseño. Por ejemplo y sin limitación, en realizaciones concretas se pueden utilizar sistemas basados en imagen, sistemas ópticos, sistemas activos, sistemas pasivos, sistemas no tradicionales, sistemas ópticos sin marcadores, sistemas magnéticos, sistemas mecánicos, y sistemas de radiofrecuencia. Sistemas ópticos de seguimiento de movimiento que pueden ser útiles en realizaciones concretas incluyen, por ejemplo y sin limitación, un sistema de cámara MXTM (Vicon Peaks Inc.), un sistema OptiTrackTM (Natural Point Inc.), y un sistema Hawk Digital SystemTM (Motion Analysis Corp.).

45 Procesamiento de Imágenes

En algunas realizaciones, el procesamiento y el análisis de imágenes se puede utilizar en un sistema de seguimiento de movimiento, entre otras cosas, para determinar la forma y el tamaño de plantas y tejidos de plantas presentes en un volumen para muestras, y para determinar la relación espaciotemporal entre ubicaciones discretas sobre dichas plantas y tejidos de plantas. El procesamiento de imágenes puede producir datos para el diseño, validación, y optimización de modelos del proceso de crecimiento de las plantas. Estos datos, los cuales realizaciones de la invención permiten adquirir con una precisión sin precedentes para procesos de crecimiento de plantas macroscópicas, permiten el ensamblaje de representaciones informáticas realistas que representan la geometría de plantas, partes de plantas, y tejidos de plantas en crecimiento, y redes de conexiones entre ellas, que pueden formar la base para modelos mecánicos. En general, el procesamiento de imágenes puede proporcionar una descripción geométrica detallada de plantas, partes de plantas, y tejidos de plantas en crecimiento, necesaria para el redimensionamiento y reconformado de plantas a medida que van creciendo, la cual puede formar la base para modelos de crecimiento. Algunos aspectos de ejemplo del procesamiento de imágenes pueden incluir visualización de datos espaciotemporales; segmentación (extracción de rasgos a partir de imágenes); cálculo de crecimiento; y/o creación de una geometría realista para un modelo.

Visualización de datos espaciotemporales: Visualizar un conjunto de datos espaciotemporales producidos por un sistema óptico de seguimiento de movimiento requiere por lo general software especializado. Paquetes de análisis de imágenes con capacidades de renderización de volúmenes permiten la creación de visualizaciones tridimensionales que se pueden girar libremente y que se pueden recortar. Procedimientos de mejora del contraste, de reducción de ruido, de enfoque de imágenes borrosas, y procedimientos similares también pueden mejorar las imágenes en preparación para su segmentación.

Segmentación: El cálculo de forma y tamaño se puede determinar como la salida de un canal de procesamiento de imágenes que incluye segmentación. La segmentación de imágenes es el proceso de dividir una imagen en regiones distintas, cada una de las cuales representa un único objeto homogéneo. Gonzalez y Woods (2008) Digital Image Processing. Upper Saddle River, N.J.: Prentice Hall. Con respecto a la cuantificación de morfología, la segmentación genera máscaras digitales a partir de las cuales se pueden calcular propiedades de volumen, área, longitud, y forma para cada objeto segmentado (por ejemplo, una parte o un tejido de una planta). La segmentación también se puede utilizar para calcular la conectividad (topología) entre objetos, generando máscaras digitales para cada objeto, y encontrando posteriormente sus vecinos.

Traducción de la obtención de imágenes a geometría realista para modelos: La reconstrucción de la relación espaciotemporal entre geometría y topología de planta, de parte de planta, y/o de tejido de planta a partir de imágenes bidimensionales permite la construcción de mallas de elementos finitos que son necesarias para simulaciones de procesos de crecimiento de plantas.

V. Estación de obtención de imágenes y de seguimiento del movimiento de crecimiento de plantas

De acuerdo con lo anterior, algunas realizaciones incluyen un aparato y método para capturar datos de cinética de crecimiento de plantas, que comprenden un volumen para muestras adaptado para contener al menos una muestra de planta (por ejemplo, una planta, parte de planta, o tejido de planta) que tiene marcadores posicionales que definen una o más ubicaciones físicas sobre la muestra. El volumen para muestras puede tener cualquier forma geométrica deseada, por ejemplo y sin limitación, ovalada, redonda, rectangular, cuadrada, y poligonal. Una pluralidad de sensores de marcador (por ejemplo, cámaras) pueden estar situados alrededor, a lo largo, o en el interior de una periferia del volumen para muestras. Sensores de marcador pueden estar situados de tal manera que mientras la planta está creciendo los marcadores posicionales están dentro del campo de visión de al menos uno de los sensores de marcador substancialmente en todo momento durante un periodo de adquisición de datos. Un procesador de captura de movimiento puede estar acoplado a los sensores de marcador para producir un modelo digital que refleja el movimiento de los marcadores durante un periodo de adquisición de datos (es decir, el crecimiento de la muestra de planta durante este periodo).

En algunas realizaciones, el volumen para muestras puede comprender un área plana subdividida en una pluralidad de cuadrantes. Cada uno de los cuadrantes puede comprender además una pluralidad de bordes coincidentes con la periferia del volumen para muestras. La pluralidad de sensores de marcador puede comprender una primera parte de la pluralidad de sensores de marcador que están situados a una primera altura por encima del punto más bajo del volumen para muestras, y al menos una segunda parte de la pluralidad de sensores de marcador que están situados a una segunda altura por encima del punto más bajo del volumen para muestras que es mayor que la primera altura. En algunas realizaciones, el volumen para muestras también puede comprender al menos una fuente de luz (por ejemplo, una fuente de luz polarizada, y una fuente de luz filtrada) orientada para iluminar todo el volumen para muestras o una parte del mismo. Por ejemplo, una fuente de luz puede estar orientada para iluminar toda una planta en crecimiento o una parte de la misma dentro del volumen para muestras. En ejemplos concretos, cada sensor de marcador de la pluralidad de sensores de marcador puede comprender una fuente de luz. En estos ejemplos y en otros adicionales, cada sensor de marcador puede comprender un filtro polarizado para bloquear luz polarizada procedente de algunas o de todas las fuentes de luz adicionales situadas a través del volumen para muestras.

Haciendo referencia en primer lugar a la Figura 1, un diagrama de bloques ilustra un sistema 10 de seguimiento de movimiento de ejemplo de acuerdo con algunas realizaciones. El sistema 10 de seguimiento de movimiento incluye un procesador 12 de captura de movimiento adaptado para comunicarse con una pluralidad de sensores de marcador (por ejemplo, cámaras) 14₁-14_n. El procesador 12 de captura de movimiento puede comprender un ordenador programable que tiene un dispositivo 16 de almacenamiento de datos adaptado para permitir el almacenamiento de archivos de datos asociados. Una estación de trabajo informática 18 puede estar acoplada al procesador 12 de captura de movimiento utilizando una red para facilitar la adquisición, el almacenamiento, y/o el análisis de datos. Los sensores de marcador 14₁-14_n pueden estar situados con respecto al volumen para muestras de tal manera que capturen la posición a lo largo del tiempo de puntos fijos sobre la superficie de una o más muestras de plantas que crecen en el interior del volumen para muestras.

Al menos una muestra de planta puede estar marcada con marcadores que son detectados por los sensores de marcador 14₁-14_n durante un periodo de tiempo en el cual la muestra de planta está situada en el interior del volumen para muestras. Los marcadores pueden ser, por ejemplo y sin limitación, elementos reflectantes (por ejemplo, perlas, cinta, y pintura), elementos retrorreflectantes, elementos iluminados, LEDs, y etiquetas radiotransmisoras (véase la Patente de EE.UU. 7.009.561). De forma alternativa, en otras realizaciones (por ejemplo, en aquellas que utilizan seguimiento de movimiento sin marcadores), al menos una muestra de planta que no está marcada con marcadores puede estar situada en el interior del volumen para muestras durante un periodo de tiempo de muestreo. En ejemplos concretos, una muestra de planta puede estar marcada con uno o más marcadores (por ejemplo, perlas reflectantes) situadas en una o más posiciones sobre la muestra de planta, por ejemplo y sin limitación, posiciones sobre el sistema de brote; sistema radicular (cuando el sistema radicular está creciendo en un medio a través del cual puede pasar una señal marcadora específica, tal como un medio de

crecimiento translúcido); punta del brote; yema apical; epidermis; flor, yema lateral; nudo; entrenudo; hoja; punta de la hoja; meristemas apicales; meristemas laterales; y tejido fundamental.

Para marcar una única muestra de planta se puede utilizar un marcador, o números crecientes de marcadores mayores de uno. Por ejemplo y sin limitación, en ciertas realizaciones se pueden utilizar 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, aproximadamente 20, aproximadamente 30, aproximadamente 40, aproximadamente 50, o más marcadores. El uso de números crecientes de marcadores puede proporcionar un incremento de resolución correspondiente en una medida de crecimiento de la planta que se ha obtenido finalmente. Los marcadores pueden tener una anchura o diámetro de, por ejemplo, al menos aproximadamente 2 milímetros (por ejemplo, aproximadamente 2 mm, aproximadamente 4 mm, aproximadamente 6 mm, aproximadamente 8 mm, aproximadamente 10 mm, aproximadamente 15 mm, aproximadamente 20 mm, aproximadamente 25 mm, aproximadamente 30 mm, aproximadamente 40 mm, aproximadamente 50 mm, aproximadamente 75 mm, o más). La posición del centroide de uno o más de los marcadores de cualquier diámetro se puede calcular por métodos conocidos para las personas con experiencia en la técnica de análisis de imágenes.

El procesador 12 de captura de movimiento procesa imágenes bidimensionales recibidas desde los sensores de marcador 14₁-14_n para producir una representación digital tridimensional del movimiento capturado. En particular, el procesador 12 de captura de movimiento puede recibir los datos bidimensionales procedentes de cada cámara, y guardar los datos en forma de múltiples archivos de datos en un dispositivo 16 de almacenamiento de datos como parte de un proceso de captura de imágenes. A continuación, los archivos de datos bidimensionales se pueden convertir en un único conjunto de coordenadas tridimensionales que están conectadas entre sí en forma de archivos de trayectoria que representan movimiento de marcadores individuales como parte de un proceso de procesamiento de imágenes. El proceso de procesamiento de imágenes utiliza imágenes procedentes de uno o más sensores de marcador para determinar la ubicación de cada marcador. Por ejemplo, un marcador puede ser visible sólo para un subconjunto de los sensores de marcador debido a oclusión por partes de la planta u otros elementos situados dentro del volumen para muestras. En ese caso, la función de procesamiento de imágenes del procesador 12 de captura de movimiento utiliza imágenes procedentes de otros sensores de marcador que tienen una vista sin obstrucciones de ese marcador para determinar la ubicación del marcador en el espacio.

Utilizando imágenes procedentes de múltiples cámaras para determinar la ubicación de un marcador, la función de procesamiento de imágenes evalúa la información de la imagen desde múltiples ángulos y utiliza un proceso de triangulación para determinar la ubicación espacial. A continuación se realizan cálculos cinéticos sobre los archivos de trayectoria para generar la representación digital que refleja, por ejemplo, extensión o desplazamiento de parte(s) de planta y/o tejidos de planta correspondientes a crecimiento de la planta. Utilizando la información espacial a lo largo del tiempo, los cálculos determinan el avance de cada marcador a medida que se va moviendo a través del espacio. Para controlar el almacenamiento y la recuperación del gran número de archivos asociados con todo el proceso en/desde el dispositivo 16 de almacenamiento de datos se puede utilizar un proceso de gestión de datos apropiado. El procesador 12 de captura de movimiento o una estación de trabajo 18 conectada puede utilizar un paquete software comercial (tal como los que se pueden obtener de las empresas Vicon Motion Systems, Motion Analysis Corp., etc.) para realizar estas y otras funciones de procesamiento de datos.

Las Figuras 2 y 3 ilustran un volumen 20 de muestra de ejemplo de acuerdo con algunas realizaciones rodeado por una pluralidad de cámaras de captura de movimiento. El volumen 20 de muestra incluye un borde 22 periférico. El volumen 20 de muestra se ilustra como una zona de forma rectangular subdividida por líneas de cuadrícula. Se debería apreciar que el volumen 20 de muestra comprende en realidad un espacio tridimensional, definiendo la cuadrícula un punto más bajo (por ejemplo, una superficie en sección transversal más baja) del volumen 20 de muestra. El movimiento se capturaría en el interior del espacio tridimensional por encima del punto más bajo (o de la superficie más baja). En algunas realizaciones, el volumen 20 de muestra comprende una superficie más baja de aproximadamente 4 pies por aproximadamente 4 pies (aproximadamente 1,2192 m por aproximadamente 1,2192 m), con una altura de aproximadamente 8 pies (2,4384 m) por encima de la superficie más baja. También se pueden seleccionar, a discreción del profesional, volúmenes de muestra con otro tamaño y volumen para su utilización en aplicaciones concretas en vista de los requisitos de las mismas (por ejemplo, el tamaño de las plantas que se quieren cultivar en el volumen para muestras, y el tamaño del desplazamiento del marcador que se va a medir).

La Figura 2 ilustra una vista en planta del volumen 20 de muestra de acuerdo con algunas realizaciones con la pluralidad de cámaras de captura de movimiento situadas alrededor del borde 22 periférico en una matriz generalmente circular. Sin embargo, también se pueden utilizar otros patrones (por ejemplo, una o más matrices lineales o rectangulares). Sensores de marcador individuales se ilustran como triángulos, con el ángulo agudo representando la dirección de la lente de la cámara, de modo que se debería apreciar que la pluralidad de sensores de marcador están dirigidos hacia el volumen 20 de muestra desde una pluralidad de direcciones distintas. En realizaciones concretas, la pluralidad de sensores de marcador incluye, por ejemplo y sin limitación, al menos tres sensores de marcador (por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o más cámaras). En realizaciones adicionales, se pueden utilizar dos sensores de marcador con al menos un marcador de referencia fijo (es decir, un marcador que no está sometido a desplazamiento durante el periodo de muestreo) en el interior del volumen para muestras que es visible para ambos sensores de marcador.

La Figura 3 ilustra una vista lateral del volumen 20 de muestra de acuerdo con realizaciones concretas, estando la pluralidad de cámaras de captura de movimiento situadas en aproximadamente dos niveles por encima de la superficie más baja del volumen para muestras. Un nivel inferior incluye una pluralidad de sensores de marcador 14₁-14_n situados a lo largo o por fuera de los bordes 22 periféricos del volumen 20 de muestra. En algunos ejemplos, cada uno de los sensores de marcador 14₁-14₃ del nivel inferior apunta ligeramente hacia arriba para no incluir un sensor de marcador situado aproximadamente enfrente del volumen 20 de muestra que esté incluido dentro del campo de visión. Los sensores de marcador pueden incluir una fuente de luz (por ejemplo, una matriz de diodos emisores de luz) utilizada para iluminar el volumen 20 de muestra. Puede ser deseable no hacer que un sensor de marcador "vea" la fuente de luz de otro marcador, por ejemplo, dado que la fuente de luz de una primera cámara de captura de movimiento puede aparecer para una segunda cámara de captura de movimiento como una reflectancia brillante que machacará datos procedentes de los marcadores reflectantes. Este problema se puede evitar o mitigar mediante la disposición física de sensores de marcador situados unos enfrente de otros a través del volumen 20 de muestra, y/o mediante el uso de filtros polarizados situados delante de las lentes de los sensores de marcador. Un nivel superior incluye una pluralidad de sensores de marcador 14₄-14₆ situados a lo largo o por fuera de los bordes 22 periféricos del volumen 20 de muestra. En algunos ejemplos, cada uno de los sensores de marcador 14₄-14₆ apuntan ligeramente hacia abajo para no incluir una cámara situada aproximadamente enfrente del volumen 20 de muestra que esté incluida dentro del campo de visión.

Cada uno de los sensores de marcador de un primer nivel de sensores de marcador puede tener un campo de visión más amplio que los de un segundo nivel de sensores de marcador, permitiendo cada sensor de marcador del primer nivel incluir una mayor cantidad del volumen 20 de muestra dentro de su respectivo campo de visión. Se debería apreciar que en ejemplos concretos también se pueden utilizar de manera ventajosa numerosas realizaciones alternativas de los sensores de marcador. Por ejemplo, se puede utilizar un número mayor o menor de niveles diferentes de sensores de marcador, y se puede variar la altura real de cada sensor de marcador dentro de un nivel individual.

En algunas realizaciones, los sensores de marcador registran imágenes de los marcadores desde muchos ángulos diferentes, de manera que substancialmente todas las superficies laterales de la muestra de planta están expuestas a al menos un sensor de marcador en todo momento. Más específicamente, la disposición de sensores de marcador puede hacer que substancialmente todas las superficies laterales de la muestra de planta estén expuestas a al menos tres sensores de marcador en todo momento. Colocando los sensores de marcador a múltiples alturas, se pueden modelar superficies irregulares ya que cada marcador en la muestra de la planta en crecimiento se mueve en el interior del campo 20 de captura de movimiento.

La Figura 4 es una vista en planta del volumen 20 de muestra de acuerdo con algunas realizaciones que ilustra una disposición de ejemplo de sensores de marcador (por ejemplo, 14₁-14_n). El volumen 20 de muestra está dividido gráficamente en cuadrantes, etiquetados A, B, C, y D. Ventajosamente, en ejemplos adicionales también se pueden utilizar otras disposiciones de sensores de marcador 14₁-14_n. En el ejemplo ilustrado, los sensores de marcador 14₁ y 14₂ están situados físicamente contiguos el uno al otro, aunque separados horizontalmente el uno con respecto al otro por una distancia discernible. Cada uno de los sensores de marcador 14₁ y 14₂ está enfocado sobre el borde delantero del cuadrante D formando un ángulo de aproximadamente 45°. El primer sensor 14₁ de marcador tiene un campo de visión que se extiende desde parcialmente el interior del borde delantero del cuadrante B hasta el extremo derecho del borde delantero del cuadrante D. El segundo sensor 14₂ de marcador tiene un campo de visión que se extiende desde el extremo izquierdo del borde delantero del cuadrante D hasta parcialmente el interior del borde delantero del cuadrante C. De esta manera, los respectivos campos de visión de los sensores de marcador primero 14₁ y segundo 14₂ se solapan sobre la longitud substancial del borde delantero del cuadrante D. Se puede incluir una disposición similar de sensores de marcador (por ejemplo, 14₃-14_n) para cada uno de los bordes exteriores (coincidentes con el borde 22 periférico) de los cuadrantes A, B, C y D.

La Figura 5 es una vista en planta del volumen 20 de muestra que ilustra otra disposición de ejemplo de sensores de marcador (por ejemplo, 14₁-14_n). Como en la Figura 4, el volumen 20 de muestra está dividido gráficamente en cuadrantes A, B, C, y D. Como en la realización de la Figura 4, los sensores de marcador 14₁-14_n pueden estar situados a diferentes alturas. En el ejemplo ilustrado en la Figura 5, los sensores de marcador 14₁ y 14₂ están situados en esquinas del volumen 20 de muestra mirando hacia el interior del volumen para muestras. Estos sensores de marcador 14₁ y 14₂ registrarían imágenes que no son recogidas por los otros sensores de marcador (por ejemplo, 14₃-14_n), por ejemplo debido a oclusión. Otros sensores de marcador similares (por ejemplo, 14₃-14_n) también pueden estar situados en las otras esquinas del volumen 20 de muestra.

En algunas realizaciones, todos los sensores de marcador permanecen fijos en su sitio, con respecto al volumen para muestras del que se están obteniendo imágenes. De esta manera, el procesador 12 de captura de movimiento tiene un punto de referencia fijo contra el cual se puede medir el movimiento de los marcadores. En realizaciones alternativas, una parte de los sensores de marcador permanecen fijos, mientras que otros se pueden mover con respecto al volumen para muestras. Las cámaras móviles se pueden mover utilizando servomotores controlados por ordenador, o se pueden mover manualmente. En estas últimas realizaciones, el procesador 12 de captura de movimiento puede seguir el movimiento de los sensores de marcador, y eliminar este movimiento en el posterior

procesamiento de los datos capturados para generar la representación digital tridimensional del movimiento del marcador.

Algunas realizaciones proporcionan un aparato y un método automáticos para capturar datos de cinética de crecimiento de plantas. Estas realizaciones pueden estar adaptadas para adquisición y análisis de datos de imagen de alto rendimiento, y de este modo pueden reducir en gran medida el coste y/o el esfuerzo necesario para la medida de cinética de crecimiento de plantas. En realizaciones concretas, los sensores de marcador se pueden mover (por ejemplo, montándolos de forma fija sobre un elemento móvil), o se pueden mover muestras de planta concretas. En algunos ejemplos, sin embargo, los sensores de marcador y/o las muestras de plantas en estos sistemas automáticos permanecen fijos con respecto al volumen para muestras. Los principios implicados en estos sistemas automáticos se ilustran a modo de ejemplo en la Figura 6.

La Figura 6a muestra una ilustración de una realización de ejemplo que incluye una matriz de cámaras 14_1 - 14_3 conectada a un pórtico 24 elevado asociado con un procesador 12 de captura de movimiento (que puede ser capaz de realizar captura de imágenes, procesamiento de imágenes, y ensamblaje de un modelo digital), una estación de trabajo 18 conectada, un dispositivo 16 de almacenamiento de datos, y conexiones de equipos. La Figura 6b ilustra una realización que incluye una plataforma de automatización gravimétrica de alto rendimiento. En esta realización, el pórtico 24 elevado puede tener permitido el movimiento (por ejemplo, de una manera automática) en al menos una dimensión, con respecto a la superficie 26 que sostiene a las muestras de plantas. En estas y en otras realizaciones, la superficie 26 puede tener permitido el movimiento (por ejemplo, de una manera automática) en al menos una dimensión, con respecto al pórtico 24 elevado.

Se apreciará que un sistema de seguimiento de movimiento automático, como el ilustrado por los ejemplos representados en la Figura 6, limita los posibles tamaños de los marcos temporales asociados y las posibles velocidades de muestreo de imagen asociadas. Por ejemplo, el tiempo necesario para adquirir una imagen para cada muestra en un sistema automático de este tipo proporcionará típicamente un límite inferior para la velocidad de muestreo de imágenes para cada muestra concreta. Sin embargo, este no es necesariamente el caso, ya que se pueden adquirir múltiples imágenes para una muestra antes de que el sistema se ajuste para permitir la medida de la siguiente muestra. La mayoría de los procesos de crecimiento de plantas se producen con una cinética suficientemente lenta para que un sistema automático pueda estar diseñado para admitir un gran número de muestras, y también para adquirir imágenes con una frecuencia suficientemente alta para proporcionar información espaciotemporal detallada relacionada con el proceso analizado. La utilización de este rasgo de la cinética de las plantas que es peculiar con respecto a los tipos de movimiento que típicamente se busca capturar en tiempo real es un rasgo concreto de algunas realizaciones de la presente invención.

VI. Examen por cribado de plantas que tienen un rasgo de crecimiento de interés

En realizaciones concretas, una composición, un método, y/o un aparato para capturar cinética de crecimiento de plantas mediante seguimiento de movimiento se puede utilizar para comparar el crecimiento de plantas individuales bajo condiciones ambientales iguales o diferentes, proporcionando de este modo un sistema relativamente barato, rápido, y/o de alto rendimiento para examinar plantas por cribado de sus rasgos agronómicos específicos. De esta manera, algunas realizaciones incluyen métodos para examinar plantas por cribado de un rasgo o fenotipo que tiene un efecto sobre el crecimiento de una planta. Dichos rasgos y fenotipos incluyen, por ejemplo y sin limitación, tolerancia a la falta de agua, NUE, tolerancia al calor, y tolerancia a la sal. Muchos fenotipos de plantas deseables implican cambios en el crecimiento y el desarrollo de la planta más allá de lo que se muestra en plantas de tipo salvaje u otros cultivares.

La obtención de imágenes en vivo es un primer paso en la medida y modelización del crecimiento y desarrollo de plantas vivas. Los modelos matemáticos espaciotemporales permiten el ensayo de hipótesis de crecimiento de plantas a través de simulaciones dinámicas de crecimiento, Y por último, los modelos de crecimiento de plantas y sus predicciones se pueden validar mediante experimentos de obtención de imágenes en vivo adicionales. Por consiguiente, en algunas realizaciones, se utiliza seguimiento de movimiento de cinética de crecimiento de plantas para medir un parámetro cinético de crecimiento de plantas en una pluralidad de muestras de plantas. En estas y en otras realizaciones, se pueden construir modelos matemáticos para describir proceso(s) de crecimiento de plantas, por ejemplo, para extrapolar los efectos de dichos procesos a diferentes plantas de la misma especie o de una especie relacionada.

En una planta se pueden introducir rasgos y fenotipos de plantas, por ejemplo, por medio de reproducción convencional de plantas o transformación genética. Típicamente, estas dos metodologías producen un gran número de plantas candidatas (progenie y transformantes putativos, respectivamente) que deben ser examinadas por cribado de la aparición del rasgo o fenotipo. Incluso el examen por cribado de rasgos o fenotipos que son visibles por simple inspección puede ser un proceso largo y caro. Los fenotipos de crecimiento de plantas pueden ser visibles sólo mediante técnicas convencionales después de largos periodos de tiempo, tras los cuales el efecto del fenotipo sobre la morfología global de la planta se puede poner de manifiesto.

Utilizando composiciones, aparatos, y métodos de algunas realizaciones de la presente invención, fenotipos de crecimiento de plantas que aparecen demasiado lentamente para ser observables a simple vista por el ojo humano,

pero los cuales también están apareciendo antes de cualquier efecto definitivo sobre la morfología de la planta, se pueden poner de manifiesto, se pueden medir y modelar en tiempo real, con mínima manipulación de la muestra de planta durante el periodo de adquisición de datos. Por ejemplo, utilizando un sistema automático de seguimiento de movimiento de acuerdo con algunas realizaciones, se pueden analizar un gran número de muestras de plantas en una única plataforma de una manera con alto rendimiento.

Todas las publicaciones y patentes citadas en este documento se incorporan completamente mediante dicho documento.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar algunos rasgos y/o realizaciones concretas, tales como los descritos anteriormente. No se debería interpretar que los ejemplos limitan la invención a los rasgos o realizaciones concretas ejemplificados.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Materiales y Métodos

Crecimiento y Cuidados de Material de Plantas

Plántulas de líneas consanguíneas de *Zea mays* c.v. B104, cultivadas bajo condiciones óptimas de riego y nutrientes, se utilizaron para hacer un seguimiento de medidas de cinética de plantas. Las plántulas se cultivaron en macetas de tubería para aguas residuales de PVC blanco (United Pipe Supply, Boise, ID), con las dimensiones de 15" de alto por 6" de ancho (381 mm de alto por 152,4 mm de ancho), en sustrato para cultivo (Tualatin Valley Landscape Supply, Tualatin, OR) mezclado con HP Promix (Growers Nursery Supply, Salem, OR) en un ratio 1:1, y se fertilizaron con Osmocote™ Plus 15-9-12 NPK, fertilizantes de liberación lenta en 3-4 meses (Scott's Company, Marysville, OH). La semilla se sembró a 1,5" (38,1 mm) de profundidad, y el suelo se mantuvo saturado con eventos regulares de irrigación con agua limpia que se realizaron cada 3 días desde la siembra. Tras la germinación, las plántulas se regaron lo necesario para mantener condiciones de suelo saturado.

Las plántulas se cultivaron bajo condiciones estándar de invernadero. Las condiciones incluyeron aproximadamente 50% de luz incidente media, 50% de humedad relativa media, y un ciclo de temperatura diurna de entre 28 °C y 35 °C, con un ciclo de luz solar de 16 horas. La fuente de luz consistió en un sistema de bombillas halógenas y de sodio de alta presión configurado para un mínimo de 350 PAR a 1 metro por encima del banco sobre el que se colocaron las plantas. Aproximadamente en la etapa V4 de desarrollo, se utilizaron las plántulas para experimentos de obtención de imágenes, como se describe posteriormente.

Descripción de la Estación de Obtención de Imágenes y Configuración del Equipo

Obtención de Imágenes Digitales. Se realizó un seguimiento de los cambios de posición de marcadores reflectantes colocados sobre hojas individuales de planta, monitorizando de este modo medidas de cinética de la planta. Las medidas de cinética de la planta registraron y monitorizaron características de crecimiento de la planta, tales como movimiento y elongación de las hojas. El experimento se realizó utilizando obtención de imágenes con cámara digital de los marcadores reflectantes colocados sobre hojas de la planta para hacer un seguimiento de cambios de posición bidimensionales. La captura de imágenes se produjo utilizando una estructura de pórtico de obtención de imágenes con bastidor de aluminio que se puede hacer maniobrar a mano, dotado de un bloque de montaje capaz de realizar movimientos horizontales. Esta estructura fue capaz de admitir el montaje de una cámara digital estándar apuntada formando un ángulo de 90° con respecto al plano de la copa de la planta. Durante la obtención de imágenes se desactivó la opción de flash de la cámara para impedir una iluminación excesiva de superficies brillantes de las hojas, y evitar de esta manera oclusión de la visibilidad de marcadores durante el procesamiento de las imágenes. En el mismo plano que la copa de la planta se montaron dos escalas graduadas perpendiculares para ayudar con la calibración de escala de imagen para procesamiento de imágenes digitales.

Captura de Imágenes de Seguimiento de Movimiento OPTITRACK™. Para experimentos de seguimiento de movimiento, se montaron tres cámaras OPTITRACK™ FLEX:V100R2 (Natural Point, Corvallis, OR) en el techo (aproximadamente a 8' (2,4384 m) del nivel del suelo) de una estación de obtención de imágenes (8'H x 4'W x 4'L; 2,4384mH x 1,2192 mW x 1,2192 mL). El interior de la estación de obtención de imágenes se pintó totalmente con un acabado negro mate, y la entrada delantera se tapó con una lona negra flexible para impedir iluminación o reflectancia desde fuentes de luz o superficies brillantes exteriores. Las cámaras se colocaron equidistantes unas de otras con cada cámara angulada para quedar orientada hacia el suelo central de la cabina de obtención de imágenes, produciendo como resultado un volumen de captura de aproximadamente 3 m³ con mínima cobertura de cámara de 2 m³. Las cámaras se conectaron unas a otras utilizando el USB OPTIHUB™ incluido, el cual se conectó a continuación a un ordenador portátil PANASONIC TOUGHBOOK™ (Panasonic, Kadoma, Osaka, Japón) en el que se había instalado el software OPTITRACK™ Tracking Tool para captura de archivos de datos/secuencias. La velocidad de captura se estableció en aproximadamente 1 fotograma por segundo, durando las grabaciones generalmente no más de 5-10 segundos por cada evento de obtención de imágenes. El nivel de exposición de la cámara se estableció en 55 lúmenes, el umbral en 160 (sin unidades) y la intensidad en 15 ms. Un esquema de esta configuración se ilustra en la Figura 6. La calibración se realizó antes de cada evento de medida utilizando la varilla de calibración OPTITRACK™ durante 10 segundos para definir y capturar tantos puntos únicos dentro del volumen

medido, y para garantizar que los límites del volumen medido estaban definidos. El nivel de la superficie se identificó utilizando la herramienta de escuadra de referencia OPTITRACK™. Las cámaras y el software estuvieron funcionando activamente sólo durante el periodo de medida. En otros momentos, el equipo estuvo apagado.

- 5 Ensayo de Prueba de Concepto de Obtención de Imágenes Digitales. Se monitorizaron y se midieron los cambios cinéticos en elongación de las hojas y movimiento general de plantas de *Zea mays* utilizando marcadores reflectantes y obtención de imágenes digitales. Los cambios cinéticos en elongación de las hojas y movimiento general en un subconjunto de plantas cultivadas bajo condiciones estándar, bien regadas, se compararon con plantas cultivadas bajo condiciones de estrés hídrico por falta de agua (descrito más adelante). En la etapa de desarrollo V6, se colocaron marcadores reflectantes de 3 mm a cada lado de la hoja emergente más reciente (típicamente la hoja 11-12), a aproximadamente 0,5 cm de la punta de la hoja. Se colocaron las plantas debajo del pórtico manual de obtención de imágenes, y se dejó que crecieran y se desarrollaran bajo condiciones estándar de invernadero. La obtención de imágenes comenzó con todas las plántulas mantenidas bajo condiciones bien regadas. Entonces se retiró el agua de las plántulas del bloque de falta de agua, y a lo largo de los 6 días siguientes se tomaron imágenes en oscuridad entre las 5:00 a.m. y las 6:15 a.m. hora estándar del pacífico (PST) para minimizar las fuentes de luz exteriores que pudieran interferir con la detección de marcadores (en este estudio preliminar las plantas se mantuvieron sobre partes superiores de bancos y no colocadas en una estación de obtención de imágenes oscurecida).
- 10
- 15
- 20 Procesamiento de Imágenes Digitales. La obtención de imágenes cesó cuando las plántulas cultivadas en condiciones de falta de agua se habían enrollado y marchitado completamente. Las imágenes digitales se procesaron dibujando a mano líneas de cuadrícula de una métrica establecida calibrada a la escala graduada visible en cada imagen. Para valoración preliminar, las imágenes se marcaron utilizando software gráfico, y se evaluaron visualmente los cambios entre marcos temporales.
- 25

- Procesamiento de Secuencias de Imágenes. Después de la captura de la secuencia de imágenes, se convirtieron los datos al formato .csv para procesarlos en Microsoft EXCEL™ (Microsoft, Seattle, WA). A cada marcador detectado durante el periodo de medida se le dio una coordenada tridimensional (x, y, z) específica para cada marco temporal. Las diferencias entre puntos en el tiempo entre estos puntos de coordenadas se calcularon para cada marcador de cada plántula y de cada hoja utilizando una fórmula de distancia tridimensional estándar. Figura 7.
- 30

Ejemplo 2: Ensayo de Obtención de Imágenes de Seguimiento del Movimiento OPTITRACK™

Se ensayaron tres diseños consecutivos para validar la utilidad de seguimiento de movimiento en medidas de invernadero, cada uno con distintos objetivos de complejidad creciente.

- 35 *Seguimiento de una única planta, una única hoja por planta*
El primer diseño midió el desplazamiento de marcadores sobre una única hoja de una plántula individual en el espacio tridimensional. Las medidas de cinética de plantas comenzaron en la etapa V4 del desarrollo. A cada lado de la punta de la hoja emergente más reciente (típicamente la hoja número 8 ó 9) se colocaron dos marcadores de seguimiento reflectantes (de 4 mm de longitud), con al menos 1 cm de punta de la hoja sobresaliendo desde el verticilo primario. Se tomaron medidas entre las 6:00 a.m. y las 12:00 del mediodía PST, durante un periodo de 7 días. La plántula se colocó sobre un carrito multiusos rodante de plataforma baja, y el carrito se movió cada día hasta el centro de la estación de obtención de imágenes, y se empujó contra bloques de posicionamiento para garantizar un posicionamiento idéntico con cada evento de medida. Con una lona de entrada a la estación de obtención de imágenes completamente cerrada, se realizó la captura de datos durante aproximadamente 10 segundos. Inmediatamente después de la captura de datos, la plántula se volvió a colocar en el interior del ambiente de crecimiento de invernadero estándar.
- 40
- 45

- El movimiento de las hojas de la planta y la medida cuantificable de desplazamiento a lo largo del tiempo se capturaron utilizando las cámaras y el software de la herramienta de seguimiento. La Figura 8 ilustra las fotografías de captura de pantalla que fueron monitorizadas con la herramienta de seguimiento. La Figura 9 ilustra el cambio diario de la posición tridimensional en el espacio desde la ubicación inicial hasta la ubicación final, medido en metros (convertido a cm).
- 50

- 55 *Seguimiento de movimiento de tres hojas diferentes de una única planta en el espacio tridimensional*
A continuación, se midió el desplazamiento en espacio tridimensional de marcadores fijados a tres hojas diferentes de madurez creciente de una plántula individual. Las medidas de cinética de la planta comenzaron en la etapa V4 del desarrollo. El primer conjunto de marcadores de seguimiento se colocó (utilizando técnicas similares a las del primer experimento) en uno de los dos lados de la punta de la hoja emergente más reciente, sobresaliendo al menos 1 cm de punta de la hoja (típicamente la hoja 8-9) desde el verticilo primario. El segundo conjunto se colocó a 1 cm del extremo de la punta de la hoja sobre la hoja más reciente (típicamente la hoja 7-8), y un tercer conjunto se colocó sobre la siguiente hoja más reciente (típicamente la hoja 6-7). Se tomaron medidas entre las 6:00 a.m. y las 12:00 del mediodía PST, durante un periodo de 7 días. Como se ha descrito anteriormente, las plántulas se colocaron sobre el carrito multiusos rodante y se midieron en la estación de obtención de imágenes oscurecida durante 10 segundos cada día, después de lo cual las plántulas se devolvieron al ambiente de crecimiento estándar.
- 60
- 65

Se observó que la detección y la medida cuantificable del desplazamiento de marcadores colocados en las puntas de tres hojas emergentes consecutivamente más recientes de una única planta eran posibles utilizando este sistema de seguimiento de movimiento. La Figura 10 ilustra el desplazamiento acumulado de marcadores fijados a tres hojas diferentes a lo largo del tiempo.

Múltiples plantas, una única hoja por planta

A continuación, se midió el desplazamiento en espacio tridimensional de marcadores fijados a una única hoja en una fila de 9 plántulas diferentes. El inicio de las medidas comenzó en la etapa V4 del desarrollo. Se colocaron marcadores sobre hojas (utilizando técnicas similares a las del primer experimento), típicamente sobre la hoja 8-9 de cada plántula. Se tomaron medidas entre las 6:00 a.m. y las 12:00 del mediodía PST, durante un periodo de 7 días. Las plántulas se alinearon (estaban alineadas) en una única fila sobre el carrito multiusos, sin huecos entre bordes de las macetas, y se tomaron medidas una vez posicionadas en la estación de obtención de imágenes oscurecida durante 10 segundos cada día, después de lo cual las plántulas se devolvieron al ambiente de crecimiento estándar.

Se observó que era posible seguir marcadores reflectantes en múltiples plantas en espacio tridimensional. La Figura 11 ilustra fotografías de captura de pantalla de la captura de imagen con herramientas de seguimiento a lo largo del transcurso de 12 días. La Figura 12 ilustra los valores diarios de desplazamiento de hoja para múltiples plantas medidos utilizando las herramientas de seguimiento de movimiento.

Ejemplo 3: El Seguimiento Digital Distingue Diferencias Visuales en Elongación de Hojas Entre Plantas Bien Regadas y Plantas con Estrés Hídrico

Las plantas *Z. mays* que fueron sometidas a estrés hídrico por falta de agua o que fueron mantenidas bajo condiciones óptimas de riego se monitorizaron en busca de movimiento y elongación de hojas reducidos. Los resultados de los experimentos utilizando fotografía digital y marcadores altamente reflectantes colocados sobre una única hoja mostraron diferencias cualitativas en elongación de hojas de la planta a lo largo del tiempo entre los dos grupos de tratamiento. Las plantas sometidas a estrés hídrico por falta de agua inicialmente mostraron patrones de crecimiento similares a los controles bien regados. Sin embargo, al cabo de 4-5 días de condiciones de falta de agua aguda, las plantas sometidas a estrés hídrico por falta de agua mostraron movimiento y desplazamiento de los marcadores sobre la superficie de la hoja visualmente reducidos, que condujeron en última instancia a un posicionamiento completamente estático de los marcadores en relación con el fondo. Para el día 6, pareció que el crecimiento había cesado en las plantas sometidas a estrés hídrico por falta de agua, mientras que las plantas bien regadas siguieron mostrando elongación de hojas que se extendía más allá del campo de visión.

Este estudio se realizó también para determinar la logística de utilización de marcadores reflectantes, el posicionamiento óptimo, y para comprobación de la visibilidad de marcadores en una cubierta vegetal de múltiples plantas para identificar posibles problemas de obstrucción relacionados con cubiertas vegetales excesivamente pobladas. Se realizó un seguimiento de imágenes digitales que representaban cambios diarios en marcadores reflectantes seleccionados de plantas bien regadas y de plantas con estrés hídrico. Se encontró que, aunque algunos marcadores desaparecían temporalmente de la vista, la mayoría de los marcadores permanecían visibles a lo largo del transcurso del experimento.

REIVINDICACIONES

1. Una estación de obtención de imágenes y de seguimiento del movimiento de crecimiento de muestras de plantas, que comprende:
5 un volumen (20) para muestras adaptado para contener al menos una muestra de planta que tiene al menos un marcador que define puntos físicos sobre la muestra de planta;
 una pluralidad de sensores (14_1 - 14_n) de marcador situados en la periferia del volumen para muestras; y
10 un procesador (12) de captura de movimiento acoplado a la pluralidad de sensores de marcador para recibir datos de captura de movimiento procedentes de la pluralidad de sensores de marcador, y producir una representación digital que refleja el crecimiento de la muestra de planta.
2. La estación de obtención de imágenes y de seguimiento del movimiento de crecimiento de muestras de plantas de la reivindicación 1, en la cual la representación digital comprende información espacial en tres dimensiones e información temporal.
3. La estación de obtención de imágenes y de seguimiento del movimiento de crecimiento de muestras de plantas de la reivindicación 2, en la cual al menos uno de los sensores de marcador es una cámara.
- 20 4. La estación de obtención de imágenes y de seguimiento del movimiento de crecimiento de muestras de plantas de la reivindicación 3, en la cual el volumen para muestras está adaptado para contener al menos una muestra de planta que tiene al menos un marcador que comprende un elemento reflectante.
- 25 5. La estación de obtención de imágenes y de seguimiento del movimiento de crecimiento de muestras de plantas de la reivindicación 4, en la cual el al menos un marcador que comprende un elemento reflectante es una perla.
6. La estación de obtención de imágenes y de seguimiento del movimiento de crecimiento de muestras de plantas de la reivindicación 4, en la cual cada uno de los al menos un marcador tiene una anchura o un diámetro de entre aproximadamente 2 y aproximadamente 10 milímetros.
- 30 7. La estación de obtención de imágenes y de seguimiento del movimiento de crecimiento de muestras de plantas de la reivindicación 4, en la cual el volumen para muestras está adaptado para contener al menos una muestra de planta que tiene 2 o más marcadores.
- 35 8. La estación de obtención de imágenes y de seguimiento del movimiento de crecimiento de muestras de plantas de la reivindicación 2, en la cual el volumen para muestras está adaptado para contener al menos dos plantas.
9. La estación de obtención de imágenes y de seguimiento del movimiento de crecimiento de muestras de plantas de la reivindicación 1, en la cual el procesador de captura de movimiento es capaz de realizar captura de imágenes y procesamiento de imágenes.
- 40 10. La estación de obtención de imágenes y de seguimiento del movimiento de crecimiento de muestras de plantas de la reivindicación 1, que comprende además una estación de trabajo (18) y un dispositivo (16) de almacenamiento de datos, en la cual la estación de trabajo y el dispositivo de almacenamiento de datos están acoplados al procesador de captura de movimiento.
- 45 11. La estación de obtención de imágenes y de seguimiento del movimiento de crecimiento de muestras de plantas de la reivindicación 2, que comprende además un pórtico (24) elevado con el movimiento permitido que comprende al menos un sensor de marcador de la pluralidad de sensores de marcador.
- 50 12. La estación de obtención de imágenes y de seguimiento del movimiento de crecimiento de muestras de plantas de la reivindicación 11, en la cual el pórtico elevado con el movimiento permitido comprende toda la pluralidad de sensores de marcador.
- 55 13. Un método para monitorizar la cinética de crecimiento de una muestra de planta, comprendiendo el método:
 definir un volumen (20) para muestras adaptado para contener al menos una muestra de planta que tiene al menos un marcador que define puntos físicos sobre la muestra de planta;
 colocar una pluralidad de sensores (14_1 - 14_n) de marcador en la periferia del volumen para muestras;
60 adquirir datos de captura de movimiento utilizando la pluralidad de sensores de marcador; y
 recibir datos de captura de movimiento procedentes de la pluralidad de sensores de marcador y producir una representación digital que refleja el crecimiento de la muestra de planta.
- 65 14. El método de acuerdo con la reivindicación 13, en el cual la representación digital comprende información espacial en tres dimensiones e información temporal.

15. El método de acuerdo con la reivindicación 14, en el cual al menos uno de los sensores de marcador es una cámara.
- 5 16. El método de acuerdo con la reivindicación 13, que comprende además:
introducir en el volumen para muestras una muestra de planta que tiene dos o más marcadores que definen puntos físicos sobre la muestra de planta.
- 10 17. El método de acuerdo con la reivindicación 13, que comprende además:
introducir en el volumen para muestras al menos dos muestras de plantas que tienen al menos un marcador que define puntos físicos sobre la muestra de planta.
- 15 18. El método de acuerdo con la reivindicación 13, en el cual al menos uno de sensores de marcador de la pluralidad de sensores de marcador está fijado a unos medios para mover el volumen para muestras sin mover los sensores de marcador con respecto al volumen para muestras.
- 20 19. El método de acuerdo con la reivindicación 18, en el cual los medios para mover el volumen para muestras sin mover los sensores de marcador con respecto al volumen para muestras son un pórtico (24) elevado con el movimiento permitido, y en el cual los sensores de marcador están fijados al pórtico.
- 25 20. El método de acuerdo con la reivindicación 18, en el cual los medios para mover el volumen para muestras sin mover los sensores de marcador con respecto al volumen para muestras están controlados por un sistema automático.
- 30 21. Un método para examinar una muestra de planta por cribado de un rasgo de crecimiento de interés, comprendiendo el método:
definir un volumen (20) para muestras adaptado para contener al menos una muestra de planta que tiene al menos un marcador que define puntos físicos sobre la muestra de planta;
colocar una pluralidad de sensores (14_1 - 14_n) de marcador en la periferia del volumen para muestras;
introducir en el volumen para muestras una muestra de planta que tiene al menos un marcador que define puntos físicos sobre la muestra de planta;
35 adquirir datos de captura de movimiento utilizando la pluralidad de sensores de marcador; y
recibir datos de captura de movimiento procedentes de la pluralidad de sensores de marcador y producir una representación digital que refleja el crecimiento de la muestra de planta; y
analizar la reflexión digital para determinar si la muestra de planta comprende el rasgo de crecimiento de interés.
- 40 22. El método de acuerdo con la reivindicación 21, en el cual la muestra de planta es una planta entera.
23. El método de acuerdo con la reivindicación 21, en el cual el rasgo de crecimiento de interés es un rasgo que proporciona crecimiento aumentado de la planta en una condición de estrés.
- 45 24. El método de acuerdo con la reivindicación 23, en el cual la condición de estrés se selecciona de un grupo que comprende falta de agua, poca luz, mucha sal, poco nitrógeno, exposición a un producto químico, e infestación por una plaga.

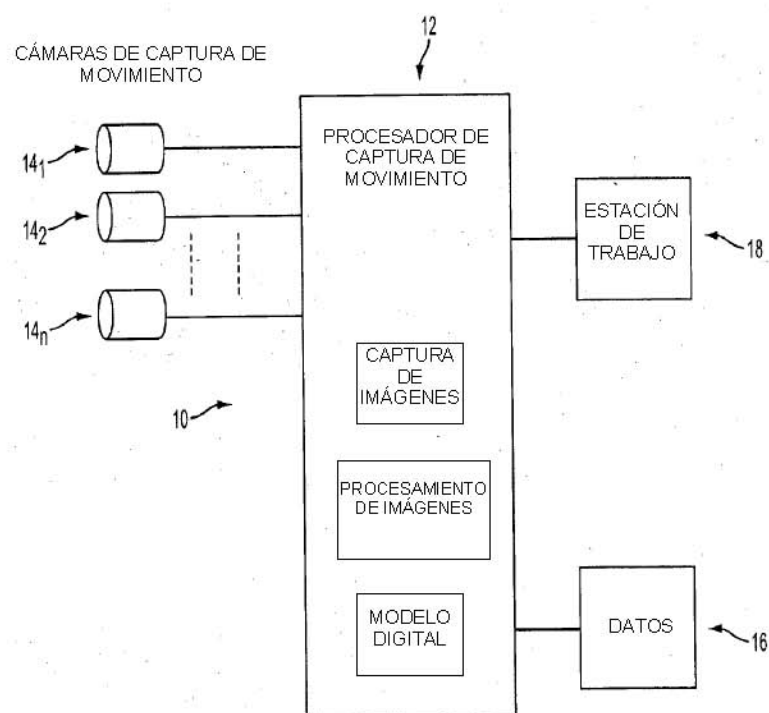


FIG. 1

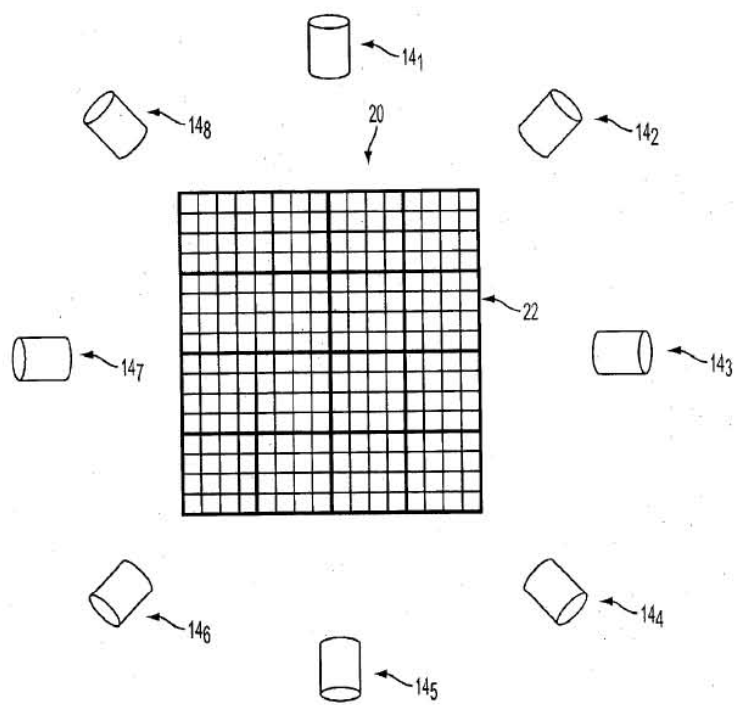


FIG. 2

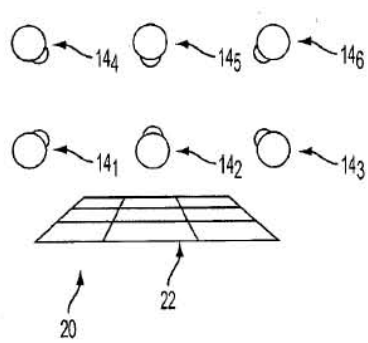


FIG. 3

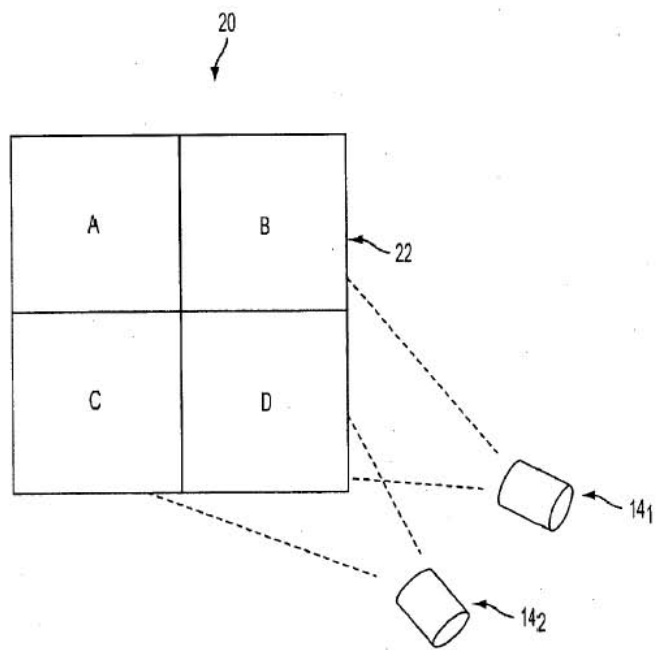


FIG. 4

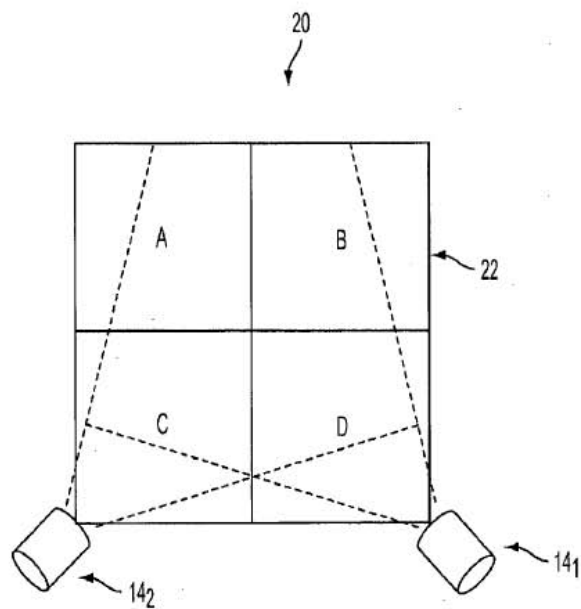
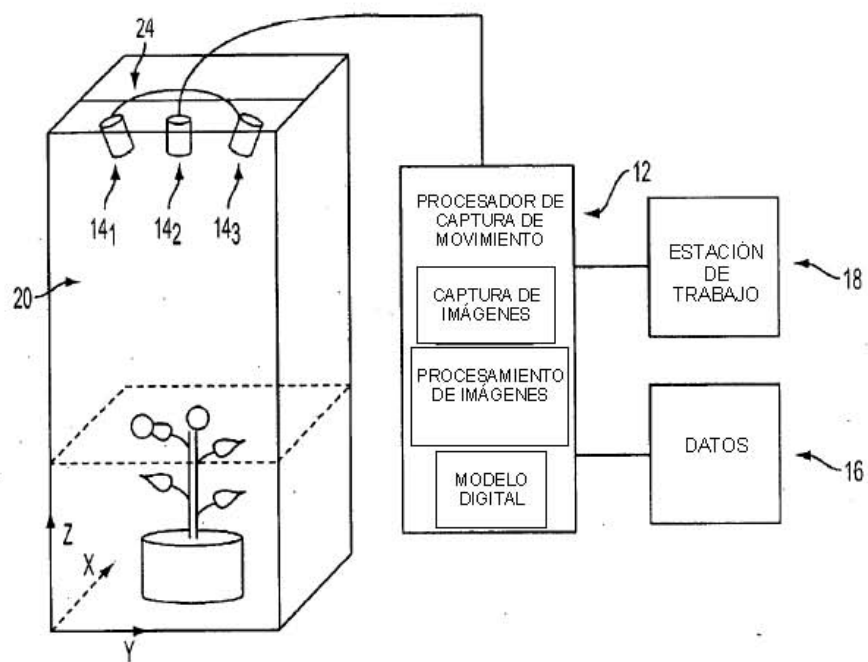


FIG. 5



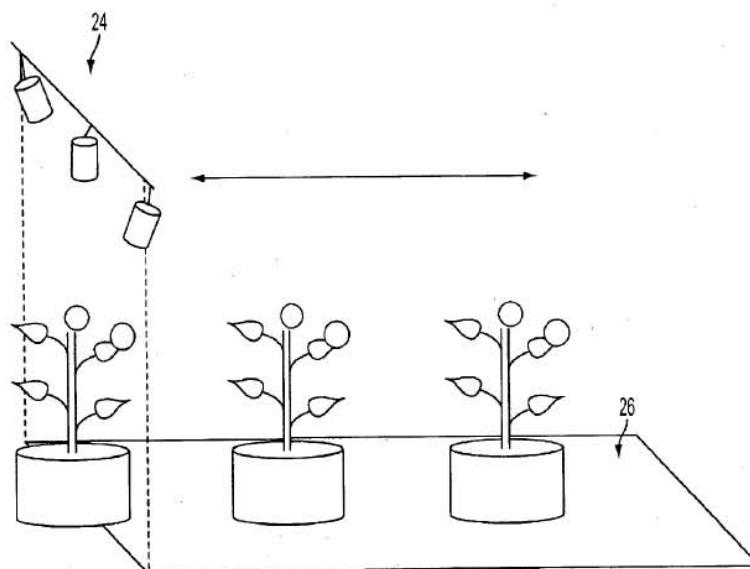


FIG. 6B

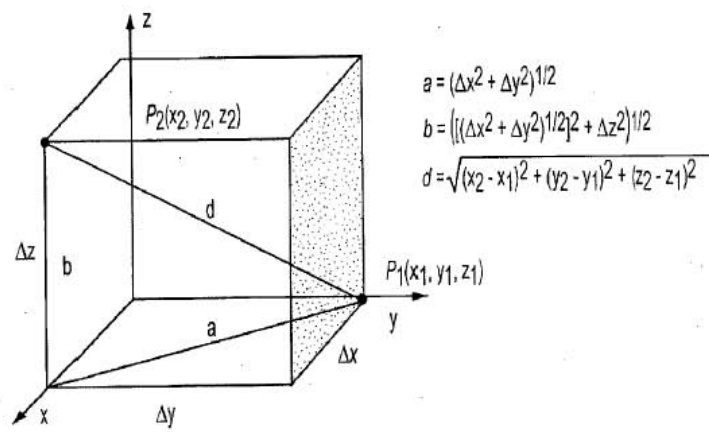


FIG. 7

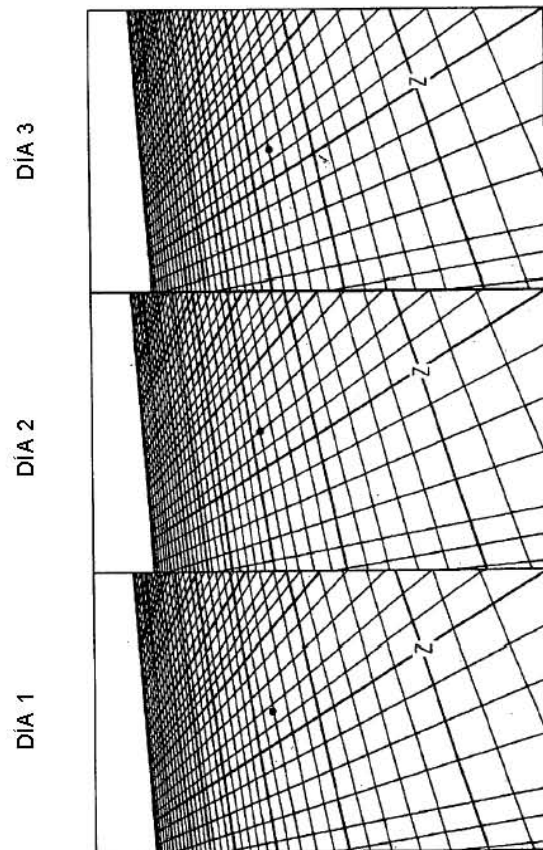


FIG. 8

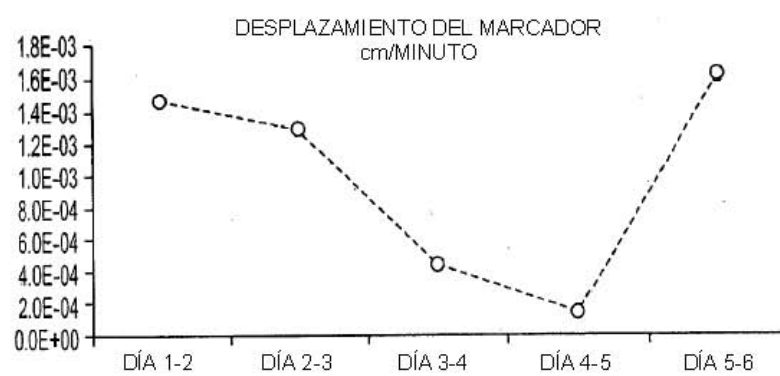


FIG. 9

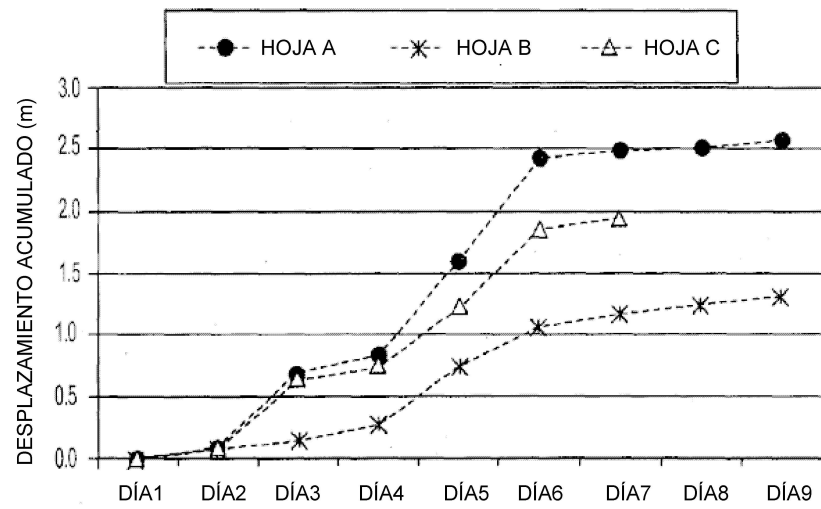


FIG. 10

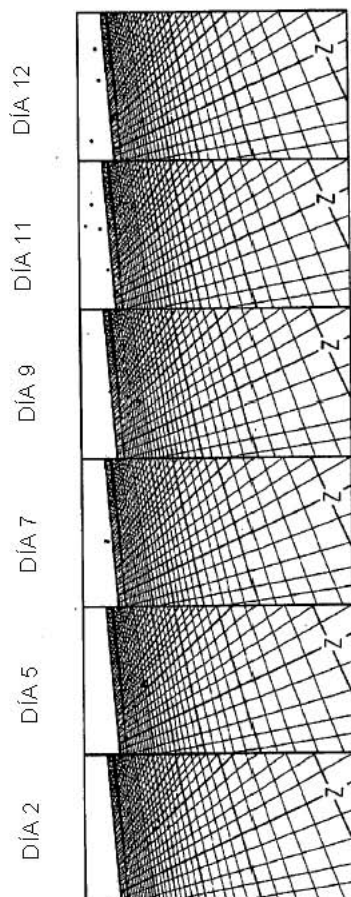


FIG. 11

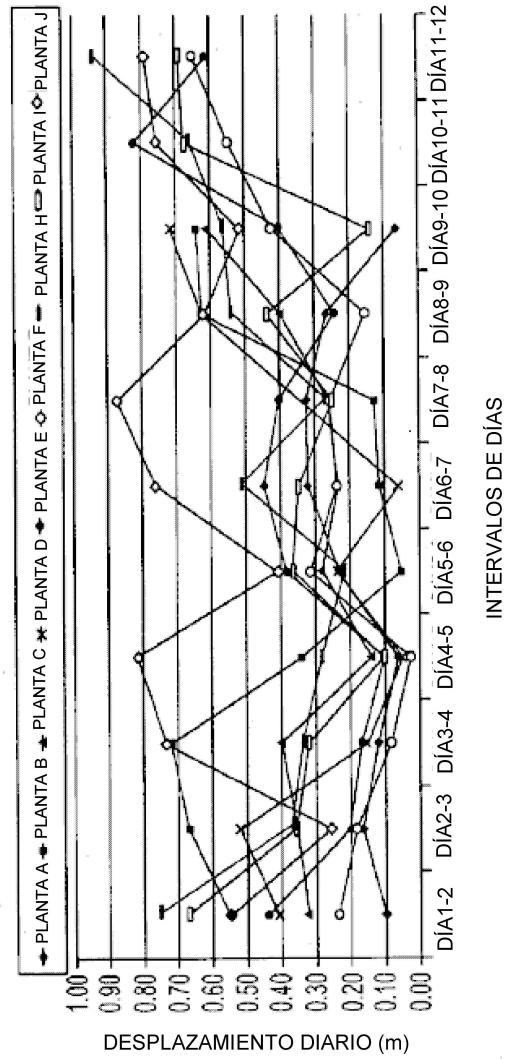


FIG. 12