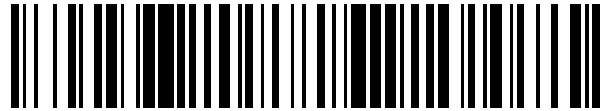


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 507 088**

51 Int. Cl.:

A01H 4/00 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.04.2009 E 09730557 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.07.2014 EP 2271200**

54 Título: **Métodos para dispersar embriones vegetales somáticos**

30 Prioridad:

10.04.2008 US 43851 P

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

14.10.2014

73 Titular/es:

**GEORGIA TECH RESEARCH CORPORATION
(100.0%)
Office Of Technology Licensing 505 10th Street
Atlanta GA 30332-0415, US**

72 Inventor/es:

AIDUN, CYRUS K.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 507 088 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

Métodos para dispersar embriones vegetales somáticos

5 Antecedentes de la invención

Introducción general al área problemática

10 La embriogénesis somática en plantas es un proceso en el que se forman embriones somáticos a partir de un explante inicial que es una célula en un tejido vegetal. Los embriones somáticos formados son copias genéticamente idénticas de la planta que proporciona el explante inicial. El proceso de embriogénesis somática ofrece por lo tanto una herramienta para obtener grandes números de plantas genotípicamente idénticas para multiplicación de genotipos seleccionados de interés comercial, para conservación de especies en peligro o para generar material vegetal genéticamente uniforme para fines de investigación.

15 Antecedentes fisiológicos de los procedimientos relacionados con el problema

Para producir plantas de embriones somáticos de coníferas, se aplica un procedimiento multietapa para cumplir las necesidades fisiológicas de los diferentes estadios de desarrollo como se describe posteriormente y se muestra en la Figura 1. El inicio de la embriogénesis somática comienza con la inducción de embriones somáticos a partir de un explante inicial, normalmente un embrión cigótico inmaduro, en un medio de cultivo solidificado que contiene un regulador del crecimiento de la planta. Los embriones somáticos continúan formándose, normalmente en el mismo medio de cultivo de composición, y una forma de cultivo embriogénica en proliferación. En el estadio de proliferación, tienen lugar varios de los elementos clave generalmente considerados beneficiosos para el proceso de embriogénesis somática: (i) la propagación en masa de propágulos genotípicamente idénticos a través de multiplicación ilimitada de embriones somáticos inmaduros; (ii) el almacenamiento criogénico de embriones en proliferación confirma un almacenamiento prácticamente eterno de clones, es decir, se establece un banco de clones, (iii) la modificación transgénica del embrión somático inmaduro permite la propagación a gran escala de propágulos mejorados genéticamente. En la siguiente etapa en el procedimiento, el embrión somático en proliferación se somete a un medio de crecimiento que desencadena desarrollo embrionario para progresar al estadio de maduración. La conversión de proliferación a maduración solamente se produce en una fracción de los embriones en proliferación en el cultivo. Se encuentran bajas tasas de conversión más frecuentemente en genotipos de especies coníferas recalcitrantes, pero son comunes en todas las especies de coníferas así como otras especies vegetales. El trabajo manual necesario para recoger embriones aumenta con la traducción de la tasa de conversión, y por lo tanto el coste y riesgo de contaminación y otras imprecisiones. La baja tasa de conversión de proliferación a maduración es un obstáculo importante para aplicaciones comerciales a gran escala de procedimientos de embriogénesis somática. Para la germinación, se someten embriones somáticos maduros a diferentes regímenes de cultivo para inducir la formación de raíz y brotes, en varias etapas diferentes; desecación, tratamiento con sacarosa, inducción con luz roja y estimulación con luz azul. A continuación, los embriones germinados que se considera que se han desarrollado de forma apropiada se transfieren a un material fertilizante y se transfieren gradualmente a un ambiente *ex vitro* durante el que se reduce el contenido de sacarosa. Los diferentes tratamientos durante la germinación en una planta requieren manipulación manual repetida de germinantes individuales y plantas lo que añade un coste considerable al procedimiento general.

45 Producción de plantas a partir de embriones somáticos

El procedimiento de la técnica anterior para producir plantas a partir de embriones somáticos requiere la manipulación manual en varias etapas haciendo el procedimiento largo, caro e impreciso.

50 Para especies de coníferas, los procedimientos convencionales usados implican varias etapas cuando se requiere manipulación manual. El procedimiento general se perfila en la Figura 1 (véase, por ejemplo, von Arnold S, Clapham D. Spruce embryogenesis. 2008. Methods Mol Biol. 2008; 427: 31-47; Belmonte M F, Donald G, Reid D M, Yeung E C y Stasolla C. 2005. Alterations of the glutathione redox state improve apical meristem structure and somatic embryo quality in white spruce (*Picea glauca*). J Exp Bot, Vol. 56, Nº 419, pp. 2355-2364).

55 Hay cuatro etapas que se basan en la manipulación manual para obtener una planta pequeña a partir del embrión somático maduro como se ve en la Figura 1. La primera interacción manual es cuando [1] el embrión maduro se aísla de embriones inmaduros (120), y se coloca horizontalmente en un recipiente de plástico en condiciones estériles; la segunda [2] se produce después de 3-7 días de reposo (130), después el embrión maduro se transfiere a un medio de cultivo gelificado para el inicio de los procesos de germinación. El embrión somático germinado iniciará las raíces en condiciones de composición del medio de cultivo y luz apropiadas (140). La tercera transferencia manual [3] es cuando el germinante que tiene una raíz pequeña formada se transfiere a una posición vertical con la raíz parcialmente sumergida en el medio de generación líquido (150). La cuarta [4] y última transferencia es cuando los embriones germinados tienen una raíz columnar y raíces pequeñas laterales, después se transfiere a un sustrato sólido en una maceta para formación vegetal adicional (160).

Tabla 1. Lista de designaciones concernientes a la Figura 1.

Artículo	Designación
100	Embrión maduro
101	Corona de un embrión maduro
102	Pie de un embrión maduro
103	Anchura de la corona de un embrión maduro
104	Longitud de un embrión maduro
120	Fase de maduración
130	Fase de reposo
140	Fase de germinación
150	Fase de formación vegetal <i>in vitro</i>
160	Fase de formación vegetal <i>ex vitro</i>

La conversión de proliferación a maduración solamente se produce en una fracción de los embriones en proliferación en el cultivo. Se encuentran bajas tasas de conversión más frecuentemente genotipos de especies de coníferas recalcitrantes, pero son habituales en todas las especies de coníferas así como en otras especies vegetales. El trabajo manual necesario para recoger embriones aumenta con la reducción de la tasa de conversión, y de este modo el coste y el riesgo de contaminación y otras imprecisiones. La baja tasa de conversión de proliferación a maduración es un obstáculo importante para aplicaciones comerciales a gran escala de procedimientos de embriogénesis somática. Para germinación, los embriones somáticos maduros se someten a diferentes regímenes de cultivo para inducir la formación de raíz y brotes, en varias etapas diferentes; desecación, tratamiento con sacarosa, inducción con luz roja y estimulación con luz azul. A continuación, los embriones germinados que se considera que están desarrollados de forma apropiada se transfieren a un material fertilizante y se transfieren gradualmente a un ambiente *ex vitro* durante el que se reduce el contenido en sacarosa. Los diferentes tratamientos durante la germinación en una planta requieren manipulación manual repetida de germinantes individuales y plantas añadiendo un coste considerable al procedimiento general.

En el método disponible hasta la fecha para producir plantas a partir de embriones somáticos los embriones se seleccionan manualmente del tejido embriogénico inmaduro. Esto consume tiempo y es ineficaz. Sería por lo tanto deseable proporcionar un modo de realizar la separación de los embriones más eficaz. Los embriones somáticos producidos inicialmente se pegan entre sí por tejido embriogénico inmaduro en grupos. Es un objetivo de la invención proporcionar medios eficaces para producir embriones vegetales somáticos, un medio automático para dispersar suavemente los grupos de embriones somáticos en embriones individuales separados del tejido embriogénico. La invención se refiere a un método para dicha dispersión.

25 Sumario de la invención

La presente invención se refiere a métodos para dispersar suavemente grupos de embriones vegetales somáticos en embriones individuales y tejido embriogénico inmaduro.

30 Se desvela un método de dispersión de grupos de embriones vegetales suspendidos en un líquido en embriones vegetales individuales, incluyendo dicho método al menos una secuencia de dispersión, que comprende las siguientes etapas:

- 35 i) someter los grupos de embriones a fuerzas de dinámica de fluidos que provocan deformación de extensión axial y deformación de compresión radial;
 - ii) someter los grupos de embriones a fuerzas de dinámica de fluidos que provocan deformación de compresión axial y deformación de extensión radial de fuerzas de dinámica de fluidos;
- repetir dichas etapas en secuencia hasta que los embriones individuales se separan entre sí.

40 Preferentemente, la fuerza de las deformaciones de extensión y compresión aumenta con cada secuencia repetida.

El método puede implicar realizar las etapas i) y ii) usando un dispersador para separar embriones individuales contenidos en grupos de embriones, que comprende un canal de flujo que incluye al menos una constricción, de modo que los grupos de embriones que fluyen a través del canal de flujo se someten en primer lugar a deformación de extensión axial y deformación de compresión radial, y después a deformación de compresión axial y deformación de extensión radial de fuerzas de dinámica de fluidos.

El dispersador para separar embriones vegetales somáticos individuales contenidos en grupos de embriones puede comprender un canal de flujo que incluye 3-10 constricciones, en el que el canal de flujo incluye una parte intermedia que tiene una sección transversal esencialmente constante, entre cada constricción, que tiene una longitud de al menos 2,5 mm, en el que las constricciones tienen un área de sección transversal en el intervalo de 0,75 a 1300 mm² a condición de que la dimensión de sección transversal mínima del canal de flujo sea mayor que la dimensión mayor del embrión mayor para dispersar, de modo que los grupos de embriones que fluyen a través del canal de flujo se someten en primer lugar a deformación de extensión axial y deformación de compresión radial, y después a deformación de compresión axial y deformación de extensión radial de fuerzas de dinámica de fluidos.

Preferentemente, el canal de flujo comprende al menos dos constricciones, teniendo cada constricción un diámetro interno que es igual a o menor que el diámetro interno de la constricción inmediatamente corriente arriba del mismo.

Cada parte intermedia puede tener una longitud al menos igual a los grupos de embriones para dispersar.

Preferentemente, el canal de flujo incluye una parte intermedia que tiene una sección transversal constante, entre cada constricción.

Preferentemente, cada parte intermedia tiene un diámetro interno que es igual o menor que el diámetro interno de la parte intermedia inmediatamente corriente arriba de la misma.

Preferentemente, cada parte intermedia puede tener una longitud al menos igual a los grupos de embriones para dispersar. Preferentemente, la longitud de cada parte intermedia está en el intervalo de 2,5 mm a 60 mm, más preferentemente de aproximadamente 5 mm a aproximadamente 30 mm. El número de constricciones puede ser de 3-100, preferentemente 5-20, más preferentemente aproximadamente 10. Preferentemente, las constricciones tienen un área de sección transversal en el intervalo de 0,75 a 1300 mm², más preferentemente en el intervalo de 3 a 32 mm².

El canal de flujo puede tener sección transversal axisimétrica. El canal de flujo puede tener una sección transversal esencialmente circular u oval.

Al menos parte del canal de flujo puede tener una sección transversal no axisimétrica tal como una sección transversal rectangular. La sección transversal de cada constricción no axisimétrica, que tiene una dimensión máxima, puede orientarse preferentemente de tal modo que la dimensión máxima de cada constricción se rote, preferentemente al menos 30°, más preferentemente aproximadamente 90° en relación con la dimensión máxima de la siguiente constricción no axisimétrica en secuencia. La sección transversal de cada constricción puede representar un rectángulo, que tiene un primer y un segundo lado, en el que el primer lado es más largo que el segundo lado, y las constricciones se orientan de tal manera que el primer lado de cada constricción es perpendicular al primer lado de la siguiente constricción en secuencia que tiene una sección transversal rectangular.

Las ventajas del método de dispersión incluyen:

(1) No requerir partes móviles, por lo tanto ser robusto

(2) Ser aplicable de forma natural a un sistema de flujo continuo no requiriendo por lo tanto funcionamiento en modo discontinuo

(3) Ser suave para los embriones

(4) Ser rápido; la dispersión que usa el dispositivo requiere solamente algunos segundos para dispersar cientos de embriones

(5) Que el dispositivo usado sea compacto y completamente cerrado permite fácil esterilización.

DEFINICIONES

Las expresiones *embrión somático*, *embrión vegetal somático* y *embrión somático vegetal* se usan de forma intercambiable. Las expresiones se refieren a embriones vegetales derivados de tejido somático de una planta.

La *píceas de Noruega* es una especie de píceas con el nombre latino de *Picea abies* nativa de Europa.

Las expresiones *dinámica de fluidos* e *hidrodinámica* se usan de forma intercambiable y se refieren a los mismos principios físicos del flujo de fluidos.

Los términos *canal* y *tubo* se usan de forma intercambiable sin implicación específica acerca de la geometría del paso a no ser que se indique de otro modo.

5 Las *direcciones ortogonales* en coordenadas polares se proporcionan por direcciones *axial*, *radial* y *angular* (*acimutal*). Estas direcciones corresponden al eje central de un cilindro que es normal a la sección transversal circular del cilindro, y las direcciones radial y angular que apuntan a lo largo del radio y normal al radio en la superficie de sección transversal, respectivamente.

10 El *flujo axisimétrico* se refiere al flujo dentro de un tubo en el que en la superficie de sección transversal del tubo es siempre circular y, por lo tanto, hay simetría con respecto al eje del tubo. En otras palabras, no cambia nada a lo largo de la dirección angular (o acimutal).

La *tensión* es la fuerza por unidad de área.

15 La *deformación* es la medida geométrica de deformación que representa el desplazamiento relativo entre puntos en el cuerpo material; se representa como la relación o porcentaje de deformación en relación con la dimensión original.

20 La *deformación normal* define la relación o porcentaje de cantidad de extensión o compresión a lo largo de elementos lineales del material (relación de la deformación con la longitud original en la dirección de la deformación).

La *deformación por esfuerzo cortante* define la relación o porcentaje de cantidad de deformación en relación con la dimensión original asociada con el desplazamiento de capas del plano de material entre sí. La *deformación de extensión* es una deformación normal en la que el elemento se estira.

25 La *deformación de extensión axial* es un elemento que se estira a lo largo de la dirección axial.

La *deformación de extensión radial* es un elemento que se estira en la dirección radial.

30 La *deformación de compresión* es una deformación normal en la que el elemento se contrae.

La *deformación de compresión axial* se refiere a la deformación de un elemento que se contrae en la dirección axial.

35 La *deformación de compresión radial* se refiere a la deformación de un elemento que se contrae en la dirección radial.

La *tasa de deformación* es el cambio de deformación con respecto al tiempo.

40 El *diámetro hidráulico*, D_h , es una expresión usada para caracterizar el flujo en tubos y canales no circulares. Por definición, se proporciona por $D_h = 4 A / S$ en la que A es el área de sección transversal del tubo o canal no circular y S es el perímetro húmedo de la sección transversal.

La *velocidad media* en un canal se define como la tasa de flujo volumétrico dividida por el área de sección transversal del canal.

45 La *relación de contracción* se define como la relación de la velocidad media en la salida y la velocidad media en la entrada en un canal.

La *tensión media* es la tensión que se promedia sobre una superficie.

50 La *tasa media de tensión* es la tasa de tensión promediada sobre una superficie.

La *viscosidad dinámica* de un fluido es la relación de esfuerzo cortante y tasa de deformación por esfuerzo cortante en un elemento fluido newtoniano. El agua, glicerina, aceite de silicona son ejemplos de fluidos newtonianos.

55 La *tasa de perfil de deformación* es un perfil que muestra la variación de la tasa de deformación.

La unidad de longitud en milímetros se abrevia como "mm".

60 La unidad de tasa de deformación como segundo recíproco se abrevia como "1/s".

En general, un flujo con una tasa de deformación media mayor impondrá tensión media mayor en una partícula (o embrión) o en un grupo de partículas (o grupo de embriones) suspendidos en el fluido.

Breve descripción de los dibujos

65 La **Figura 1** ilustra un proceso general para producir embriones vegetales somáticos.

La **Figura 2** ilustra los parámetros coordinados usados en la descripción.

La **Figura 3** ilustra detalles de un dispositivo para su uso con los métodos de la invención en el que el canal de flujo es axisimétrico.

La **Figura 4** ilustra detalles de dispositivos o uso con los métodos de la invención en los que partes del canal de flujo son no axisimétricas.

Descripción detallada de la invención

Método para dispersar embriones somáticos

Se proporciona un método de dispersión de grupos de embriones vegetales suspendidos en un líquido en embriones vegetales individuales. Dicho método incluye al menos una secuencia de dispersión, que comprende las siguientes etapas:

- i) someter los grupos de embriones a fuerzas de dinámica de fluidos provocando deformación de extensión axial y deformación de compresión radial
- ii) someter los grupos de embriones a fuerzas de dinámica de fluidos provocando deformación de compresión axial y deformación de extensión radial de fuerzas de dinámica de fluidos.

Dichas etapas se repiten en secuencia hasta que los embriones individuales se separan de entre sí. La fuerza de las deformaciones de extensión y compresión pueden aumentarse con cada secuencia repetida.

Las etapas i) y ii) del método pueden realizarse usando un dispersador como se describe posteriormente.

Dispositivo para dispersar embriones somáticos

Para ilustrar la construcción del dispositivo dispersador, se desvelan en detalle ciertas realizaciones posibles. El nivel de detalle no debería interpretarse como limitante a no ser que se indique de forma explícita.

Construcción general

Se describe un dispositivo dispersador para separar embriones individuales contenidos en grupos de embriones. Los dispositivos desvelados son para su uso con grupos de embriones somáticos mantenidos juntos por tejido embriogénico y maduro suspendido en un líquido que fluye a través del dispositivo. El líquido puede ser cualquier líquido que no sea demasiado viscoso para fluir en el aparato, y que sea benigno para los embriones, preferentemente agua.

El dispositivo dispersador comprende un canal de flujo. El canal de flujo puede fabricarse como una única entidad o como dos o más partes que comprenden un segmento individual cada una. El canal de flujo puede por ejemplo construirse de dos partes, el primer segmento (1)/(81) y el segundo segmento (2)/(82), véase Figuras 3/4, respectivamente. Puede ser ventajoso fabricar el dispositivo con varios segmentos individuales ya que esto permitirá que el dispositivo se adapte más fácilmente a diferentes materiales de partida y simplificará la limpieza y el mantenimiento. Por ejemplo, los segmentos del canal de flujo del dispersador (1) y (2) pueden conectarse con una fuente de fluido que fluye que comprende grupos de embriones por un tubo (41) en la entrada (I). El primer segmento (1) del canal del flujo dispersador puede conectarse con el segundo segmento (2) por un tubo conector (41a). En este ejemplo, los embriones dispersados dejan el segundo segmento (2) en la salida (O) conectada con un tubo de salida (90).

El canal de flujo del dispositivo dispersador comprende al menos una constricción, de modo que los grupos de embriones que fluyen a través del canal de flujo se someten en primer lugar a deformación de extensión axial y deformación de compresión radial, y después a deformación de compresión axial y deformación de extensión radial de fuerzas de dinámica de fluidos. Cuando el canal de flujo comprende al menos dos constricciones, cada constricción puede tener un diámetro interno que es igual a o menor que el diámetro interno de la constricción inmediatamente corriente arriba del mismo para aplicar fuerzas de dispersión eficaces a los grupos de embriones. Preferentemente, el dispositivo dispersador tiene un conjunto de constricciones. El número de constricciones en un conjunto de constricciones puede variar por ejemplo de 1 a 100, de 1 a 20, de 4 a 16 o de 6 a 12, y el número preferido de constricciones es de aproximadamente 10, y depende de la naturaleza de los grupos para dispersar. Un número mayor proporciona dispersión más vigorosa pero aumenta la tensión en los embriones para dispersar.

El canal de flujo puede comprender una parte intermedia que tiene una sección transversal esencialmente constante, entre cada constricción. Cada parte intermedia puede tener un diámetro interno, que es igual a o menor que el diámetro interno de la parte intermedia inmediatamente corriente arriba de la misma, aumentando de este modo las fuerzas de dispersión etapa a etapa.

Preferentemente, los canales de flujo tienen una sección transversal esencialmente circular, excepto por las constricciones que están sujetas a consideraciones especiales, como se describe posteriormente. Pueden usarse otras geometrías (tales como oval, hexagonal, octogonal, rectangular con esquinas redondeadas o triangular con esquinas redondeadas) siempre que los embriones no se dañen durante su paso por los canales de flujo como resultado de la geometría. Los tubos que tienen secciones transversales circulares son fáciles de fabricar. Además preferentemente, los canales de flujo son suaves en el interior. Cualquier rugosidad en las superficies internas puede dañar fácilmente los delicados embriones y por lo tanto es mejor evitarlas.

Consideraciones de dinámica de fluidos

Es crítico evitar imponer demasiada tensión hidrodinámica que podría provocar daño a los embriones. Por otro lado, las tensiones deben ser suficientes para dispersar al menos una fracción significativa de los grupos. Puede ser necesario determinar los niveles óptimos de tensiones para los grupos de embriones de un tipo, línea celular o especie particular para dispersar experimentalmente. Una vez que se han determinado u obtenido los niveles óptimos, pueden calcularse en consecuencia los parámetros del dispositivo dispersador necesarios. Como alternativa, puede construirse un dispersador que tenga dimensiones mínimas y máximas dictadas por el tamaño del embrión y el tamaño del grupo, que ejerza tensión suave para determinar si dicha dispersión es eficaz para los embriones disponibles (véanse detalles posteriormente). Si no, puede construirse un dispersador con actividad de dispersión más rigurosa y ensayarse, y el proceso repetirse hasta que se obtenga un resultado satisfactorio.

Ciertas constantes se deciden preferentemente antes de calcular los parámetros restantes del diseño del dispersador. La viscosidad dinámica del fluido afecta a las fuerzas hidrodinámicas y debería elegirse el fluido pretendido. Preferentemente, el fluido es esencialmente agua, que tiene una viscosidad dinámica bien conocida que después se toma como una constante en un ambiente de temperatura constante para el diseño de un dispositivo dispersador. La viscosidad dinámica del agua generalmente no se ve afectada de forma significativa por cantidades pequeñas de sales, carbohidratos sencillos, aminoácidos o compuestos de bajo peso molecular similares. Si la viscosidad dinámica del fluido no puede obtenerse de la bibliografía, puede medirse experimentalmente por medios conocidos por los expertos en la materia.

El caudal también afecta a las fuerzas hidrodinámicas. El caudal deseado puede depender en parte de la capacidad deseada del dispositivo dispersador, en el que un flujo más rápido puede permitir mayor capacidad. Para simplificar, el diseño del dispersador se basa preferentemente en un caudal constante, que puede tomarse como otra constante para el diseño de un dispositivo dispersador. Variando el caudal, las fuerzas hidrodinámicas pueden entonces ajustarse sin tener que modificar las dimensiones del dispositivo.

De acuerdo con la invención, las dimensiones internas de los canales de flujo varían a lo largo de la dirección del flujo formando al menos una constricción, preferentemente un conjunto de constricciones. Las dimensiones internas en estas constricciones son un parámetro crítico, ya que es el valor de las dimensiones internas en la constricción lo que dicta la magnitud de las deformaciones hidrodinámicas de extensión y compresión, y son dichas deformaciones hidrodinámicas de extensión y compresión lo que impone las tensiones de extensión y compresión en los grupos de embriones, forzando suavemente a los embriones a separarse entre sí.

De acuerdo con la invención, las dimensiones de las constricciones se seleccionan de acuerdo con el nivel de tensión de extensión y compresión que se requiere para imponer en el grupo de embriones y el tamaño del grupo y la especie específica de embrión para dispersar, teniendo en cuenta el tipo de fluido y caudal previamente seleccionados. Preferentemente, las dimensiones internas de las constricciones se reducen secuencialmente de las dimensiones mayores en el lado de entrada corriente arriba del tubo al diámetro más pequeño en la salida corriente abajo del tubo. Las dimensiones internas más pequeñas en el lado del extremo corriente abajo (en la salida en la que se han dispersado completamente los embriones) tienen que ser al menos suficientemente grandes para permitir que pase un único embrión sin dañar al embrión. Una dimensión mínima preferida es igual a o mayor que la parte más ancha de un embrión para dispersar.

Dimensiones clave

Considerando lo anterior, es necesario considerar varias dimensiones clave para los canales de flujo:

- I. Dimensiones de sección transversal interna y geometría de constricciones
- II. Longitud de las constricciones
- III. Dimensiones de sección transversal interna y geometría fuera de las constricciones
- IV. Longitud de las secciones fuera o entre las constricciones.

La dimensión de sección transversal mínima del canal de flujo debería ser mayor que la dimensión mayor del embrión mayor para dispersar. La dimensión de sección transversal máxima del canal de flujo no tiene que ser

mayor que la mayor dimensión del grupo mayor para dispersar. Las dimensiones de la parte intermedia (entre constricciones) del canal de flujo no tiene que ser mayor que la dimensión mayor del grupo mayor para dispersar.

5 Para fines ilustrativos, se define un sistema de coordenadas cilíndrico, como se ilustra en la figura 2. La dirección general del flujo en un dispositivo dispersador es en la dirección axial designada por el eje z. El flujo también tiene un componente radial de velocidad en la dirección r a medida que se expande y se contrae a través del dispositivo dispersador. Los componentes axial, radial y angular (en la dirección de θ) de la velocidad del fluido se definen como u_z , u_r y u_θ , respectivamente.

10 Se define que la expresión flujo axisimétrico significa que no cambia nada en la dirección angular, o de forma más precisa $\frac{\partial(\bullet)}{\partial\theta} = 0$ en la que (\bullet) representa cualquier flujo variable. La expresión $\frac{\partial}{\partial\theta}$ es el símbolo habitual usado en matemáticas para indicar la derivada parcial que mide la tasa de cambio de una variable dependiente con respecto a la variable independiente en el denominador manteniendo todas las otras variables independientes constantes. En una realización axisimétrica del dispositivo dispersador, el flujo es axisimétrico y el componente de velocidad angular u_θ es cero.

La tasa de deformación axial en el flujo en la línea central de un tubo axisimétrico se define por $\frac{\partial u_z}{\partial z}$, en la que cuando esta cantidad es positiva el flujo es en deformación de extensión y cuando es negativa el flujo es en deformación de compresión. De forma similar, la tasa de deformación radial se mide por $\frac{\partial u_r}{\partial r}$ en la que en general cuando es positiva representa extensión radial y cuando es negativa representa compresión radial.

25 Siguiendo la misma definición anterior para extensión y compresión axisimétricas, para un dispositivo dispersador no axisimétrico, el flujo no es axisimétrico, y por lo tanto todos los componentes de la tasa del tensor de deformación serán distintos de cero.

Determinación de las longitudes de constricciones y partes intermedias

La longitud de diferentes partes del dispersador pueden calcularse basándose en diversos perfiles axiales para la tasa media de deformación, $\frac{dU}{dz}$, variación, en la que U es el símbolo para la velocidad medida definida como el caudal volumétrico dividido por el área de sección transversal del tubo en el plano $r-\theta$. La tasa de deformación a lo largo de la dirección de flujo puede ser constante, variar linealmente con z, variar de forma cuadrática con z, variar a medida que la tasa de deformación varía a lo largo de un canal con "paredes planas", o tener otra dependencia funcional en z.

35 La dependencia funcional y la variación precisas de la tasa media de deformación en z no son tan significativas como la magnitud real de la tasa de deformación media. Para simplificar, se usa el caso en el que la tasa de deformación media, B , definida por $B \equiv \frac{dU}{dz}$, es una constante. Por lo tanto, la longitud de cada sección (tal como por ejemplo $i= 61, \dots, 80$ en la Figura 4), simbolizada por L_i para el tubo axisimétrico puede calcularse basándose en la tasa de deformación media constante en esa sección, B_i , proporcionada por

40

$$L_i = \frac{Q}{\pi B_i} \left[\frac{1}{R_{1,i}^2} - \frac{1}{R_{0,i}^2} \right] \quad \text{Ecuación 1}$$

en la que Q es el caudal volumétrico que siempre es constante a lo largo del canal (basándose en el principio de conservación de la masa), R es el radio del tubo, y los subíndices "0" y "1" asociados con el radio R definen el radio de entrada y salida de cada sección, respectivamente. Esta relación para longitud se denomina de ahora en adelante Ec. (1). La tasa de deformación media B_i puede ser positiva o negativa, lo que significa que el grupo de embriones experimenta una tasa media de deformación de extensión para B_i positiva y una tasa media de deformación de compresión para el valor negativo de B_i . Son posibles un gran número de combinaciones para la longitud L_i y la tasa de deformación media B_i .

50

Ec. (1) puede generalizarse para el caso no axisimétrico usado el concepto de radio hidráulico, R_h , para cada caso, que se define como la mitad del diámetro hidráulico, o se indica matemáticamente $R_h \equiv D_h / 2$ en la que D_h es el diámetro hidráulico como se ha definido anteriormente.

5 Las ecuaciones para determinar la longitud de la sección de contracción o expansión basándose en formulación lineal, cuadrática o “de paredes planas” también pueden considerarse. Dichas ecuaciones pueden encontrarse en la bibliografía para diversos tipos de contracciones (para referencia, véase por ejemplo, Parsheh M., Brown, M., y Aidun, C. K., “Fiber Orientation in a Planar Contraction: Shape Effect” Int. J. Multiphase Flow, 32, 1354-1369, 2006).

10 El caso de la tasa de deformación media lineal o cuadrática puede considerarse si hay limitaciones para la longitud de la unidad del dispersador. Sin embargo, la tasa de deformación media constante será suficiente para dispersar el grupo si se aplica en una magnitud que crece gradualmente de la tasa de deformación media.

15 La longitud de las partes intermedias (partes entre constricciones) del canal de flujo se determina basándose en el tamaño del grupo de embriones para dispersar y debería ser al menos igual a la dimensión mayor de cualquier grupo para dispersar. Por ejemplo, en el caso del grupo de píceas de Noruega madurado en placa de Petri en laboratorio, es necesario que la sección del tubo recto sea de al menos 10 mm de longitud dado que el grupo es de aproximadamente 10 mm de tamaño. Para grupos de embriones madurados en un biorreactor, en los que el tamaño del grupo es mayor, la longitud del tubo y el diámetro inicial deberían ajustarse para acomodar el tamaño mayor del grupo. A medida que los grupos se hacen más pequeños según progresa la dispersión, la longitud de las partes intermedias también puede reducirse sucesivamente. Por ejemplo, la longitud de las partes intermedias puede ser de aproximadamente 60 mm (preferentemente aproximadamente 30 mm) al comienzo del canal del flujo del dispersador y de aproximadamente 2,5 mm (preferentemente aproximadamente 5 mm) al final del canal de flujo.

25 Determinación de las dimensiones de sección transversal

La tensión hidrodinámica media es proporcional a la tasa de deformación media a través de la viscosidad dinámica del fluido, que es preferentemente agua.

30 La *relación de contracción*, CR_i , se define como la relación del área de sección transversal de entrada y salida o velocidad media, o se escribe con respecto al radio hidráulico, pudiéndose esto indicar como,

$$CR_i \equiv \frac{R_{o,i}^2}{R_{l,i}^2}, \quad \text{Ecuación 2,}$$

35 dado que el área es proporcional al radio al cuadrado. Esta relación se denomina de ahora en adelante Ec. (2). Se muestran ejemplos de estos parámetros calculados para varios casos en la Tabla 5. Para píceas de Noruega, la relación de contracción de 3 corresponde a una tasa de deformación media, B de 11 segundos recíprocos (1/s) para diámetro de contracción de 9,5 milímetros (mm) a 5,5 mm que se considera que ejerce tensión de extensión y compresión suave en el grupo de embriones. Cuando la relación de contracción de 7 se corresponde con una tasa de deformación media de 36 (1/s) para el diámetro de contracción de 9,5 mm a 3,5 mm se considera que es una tensión de extensión y compresión relativamente fuerte. Siempre que el flujo se encuentre con un paso convergente o denominado de otro modo una contracción caracterizada por el área de sección transversal del paso que se reduce en la dirección del flujo, el flujo en general experimentará una tasa de deformación de extensión axial y una tasa de deformación de compresión radial. La condición opuesta es cuando el flujo se encuentra con un paso divergente o denominado de otro modo una expansión caracterizada por el área de sección transversal del paso que aumenta en la dirección del flujo, el flujo en general experimentará una tasa de deformación de compresión axial y una tasa de deformación de extensión radial. Los términos “axial” y “radial” se refieren a las direcciones espaciales a lo largo del eje central del tubo en la dirección general del flujo (axial), y a lo largo del radio del tubo del centro hacia la superficie del tubo normal a la dirección axial (radial). Cuando el grupo entra en una contracción, se elonga en la dirección del flujo. A medida que el grupo deja una contracción y entra en la expansión, se comprime a lo largo del flujo y se estira a lo largo de la dirección radial. Esta elongación y compresión repetidas a través del dispersador imponen una fuerza suave en los embriones individuales entre sí. Por ejemplo, cuando dos embriones unidos en un grupo entran en una contracción, el primer embrión se ve obligado a moverse más rápido que el embrión de cola debido a que el fluido que rodea al primer embrión se mueve más rápido corriente abajo que el fluido que rodea al embrión de cola. Esta acción da como resultado una tracción suave pero finita impuesta sobre un embrión en relación con el otro que promueve que los embriones se separen. Por otro lado, cuando el par de embriones entra en una expansión, los embriones se presionan entre sí a lo largo de la dirección axial pero se tiran en direcciones opuestas entre sí en la dirección radial promoviendo adicionalmente que los embriones se separen.

60

Secciones transversales axisimétricas

El canal de flujo puede tener una sección transversal esencialmente axisimétrica en toda la longitud. Por ejemplo, el canal de flujo puede tener una sección transversal esencialmente circular.

5

Secciones transversales no axisimétricas

Al menos parte del canal de flujo puede tener una sección transversal no axisimétrica. El dispositivo dispensador no axisimétrico (véase por ejemplo Figura 4), tiene un interior similar al del dispositivo dispersador simétrico con la diferencia de que el interior en las constricciones no es esencialmente circular.

10

El interior puede ser de cualquier forma de sección transversal no circular, como oval, hexagonal, octogonal, triangular, elíptica, oval, cuadrada o rectangular en secciones transversales (43a), (45a), (47a), (49a), (53a), (55a), (57a) o (59a). Pueden usarse incluso secciones transversales de forma irregular.

15

Pueden combinarse secciones transversales axisimétricas y secciones transversales no axisimétricas en el mismo dispersador.

20

Preferentemente, la sección transversal de cada constricción no axisimétrica, que tiene una dimensión máxima, se orienta de modo que la dimensión máxima de cada constricción se rote, preferentemente al menos 30 °C, más preferentemente aproximadamente 90 °C en relación con la dimensión máxima de la siguiente constricción no axisimétrica en secuencia. Dichas secciones transversales orientadas diferencialmente proporcionan dispersión más eficaz que las secciones transversales orientadas de forma similar.

25

Preferentemente, al menos parte del canal de flujo tiene una sección transversal rectangular. Una forma preferida de constricciones es una forma rectangular con esquinas redondeadas.

30

Preferentemente, la sección transversal de cada constricción representa un rectángulo, que tiene un primer y segundo lados, en el que el primer lado es más largo que el segundo lado, y las constricciones se orientan de tal modo que el primer lado de cada constricción sea perpendicular al primer lado de la siguiente constricción en secuencia que tiene una sección transversal rectangular. Dichas secciones transversales alternantes rectangulares proporcionan dispersión más eficaz que las secciones transversales constantes. Las esquinas de las secciones transversales son preferentemente redondeadas para minimizar las tensiones para los embriones.

35

Un modo de expresar el tamaño de las secciones transversales es su área de sección transversal (perpendicular a la dirección del flujo). Las constricciones pueden tener un área de sección transversal en el intervalo de 0,75 a 1300 mm², preferentemente en el intervalo de 3 a 32 mm².

40

Ciertas realizaciones específicas

Se presentan dimensiones ejemplares para un dispersador axisimétrico en las Tablas 2 y 3. Las Tablas 2 y 3 proporcionan una combinación preferida de dimensiones para grupos de embriones de píceas de Noruega que se maduran en un protocolo de laboratorio típico o con un biorreactor parcialmente sumergido.

45

Se presentan dimensiones ejemplares para un dispersador no axisimétrico adecuado para embriones de píceas de Noruega en las Tablas 4 y 5. En la Tabla 4, se presentan dos realizaciones alternativas designadas Alt 1 y Alt 2. Las constricciones son esencialmente rectangulares y se orientan de una manera alternante. El dispersador en Alt 1 impone una tensión de extensión y compresión más gradual en el grupo de embriones mientras que Alt 2 impone una tensión de extensión y compresión mayor. Alt 1 y Alt 2 se usan dependiendo del proceso de maduración de los embriones. Cuando el grupo de embriones se desarrolla de tal manera que el grupo está empaquetado suelto, Alt 1 en combinación con el dispersador axisimétrico sería suficiente para dispersar los embriones. De otro modo, es necesario usar Alt 2.

50

55

La Tabla 5 proporciona un ejemplo del cálculo basado en Ec. (1), en el que la longitud de cada contracción se determina basándose en una tasa de deformación deseada fija o la tasa de deformación se calcula basándose en una longitud fija L_c . La primera columna de esta tabla es el diámetro hidráulico de entrada, la segunda columna es el diámetro hidráulico de la salida o la contracción. La tercera columna es la relación de contracción calculada a partir de Ec. (2). La cuarta columna es el caudal volumétrico con un valor típico de 4000 mm³/s que es igual a 4 mililitros/s. La quinta columna es la tasa de deformación deseada de 10 (1/s). La sexta columna es la longitud calculada de la contracción basándose en la tasa de deformación fija en la quinta columna, en este caso 10 (1/s). La séptima columna es la tasa de deformación media calculada basándose en la longitud igual de 10 mm a partir de la siguiente relación derivada de Ec. (1).

60

$$B_i = \frac{Q}{\pi L_i} \left[\frac{1}{R_{1,i}^2} - \frac{1}{R_{0,i}^2} \right] \quad \text{Ecuación (3).}$$

Esta relación derivada de Ec. (1) se denominará Ec. (3) de ahora en adelante. Por ejemplo, $i=61, \dots, 80$ para un dispositivo de la figura 4.

5

Ejemplos

Ejemplo 1: dimensiones preferidas del dispersador

10

Tabla 2. Medidas del diámetro interno del canal de flujo

Posición de sección transversal en referencia a la Figura 3.	Diámetro interno [mm]	Diámetro interno preferido para picea de Noruega (véase ejemplo 2)
(3)	3,0-10,0	9,0-9,5
(4)	2,0-9,0	5,0-5,5
(5)	3,0-10,0	9,0-9,5
(6)	2,0-9,0	4,75-5,0
(7)	3,0-10,0	9,0-9,5
(8)	2,0-9,0	4,0-4,25
(9)	3,0-10,0	9,0-9,5
(10)	2,0-9,0	5,5-6,0
(11)	2,0-9,0	5,75-6,0
(12)	1,0-8,0	3,25-3,5
(13)	2,0-9,0	5,75-6,0
(14)	1,0-8,0	3,0-3,25
(15)	2,0-9,0	5,75-6,0
(16)	1,0-8,0	2,5-2,75
(17)	2,0-9,0	5,75-6,0
(18)	1,0-8,0	2,5-2,75
(19)	2,0-9,0	5,75-6,0
(20)	2,0-9,0	5,75-6,0

Tabla 3. Longitudes preferidas ejemplificadas para Picea de Noruega de las diferentes partes de un canal de flujo axisimétrico.

Longitud en detalles en la Figura 3.	Longitud [mm]
(21)	30,0
(22)	10,0
(23)	30,0
(24)	5,0
(25)	30,0
(26)	5,0
(27)	20,0

(28)	10,0
(29)	20,0
(30)	30,0
(31)	5,0
(32)	30,0
(33)	5,0
(34)	30,0
(35)	5,0
(36)	30,0
(37)	5,0
(38)	20,0
(39)	10,0
(40)	10,0

Tabla 4. Dimensiones de la sección transversal interna ejemplificada para picea de Noruega, en referencia a la figura 4.

	Forma de la sección interna	Dimensiones internas [mm]		Lateral de flecha negra [mm] (83)-(90)		Anchura del lateral [mm]	
		<i>Alt. 1</i>	<i>Alt. 2</i>	<i>Alt. 1</i>	<i>Alt. 2</i>	<i>Alt. 1</i>	<i>Alt. 2</i>
(42)	circular	9,5	9,5				
(43)	Rectangular			(83) 5,0	(83) 4,75	9,5	9,5
(44)	circular	9,5	9,5				
(45)	Rectangular			(84) 9,5	(84) 9,5	5,0	4,25
(46)	circular	9,5	9,5				
(47)	Rectangular			(85) 5,0	(85) 3,75	9,5	9,5
(48)	circular	9,5	9,5				
(49)	Rectangular			(86) 9,5	(86) 9,5	5,0	3,5
(50)	circular	9,5	9,5				
(51)	circular	6,0	6,0				
(52)	circular	6,0	6,0				
(53)	Rectangular			(87) 3,5	(87) 3,25	6,0	6,0
(54)	circular	6,0	6,0				
(55)	Rectangular			(88) 6,0	(88) 6,0	3,5	3,25
(56)	circular	6,0	6,0				
(57)	Rectangular			(89) 3,5	(89) 2,75	6,0	6,0
(58)	circular	6,0	6,0				
(59)	Rectangular			(90) 6,0	(90) 6,0	3,5	2,75
(60)	circular	6,0	6,0				

Tabla 5. Ejemplos de parámetros de dimensiones calculados basándose en la tasa de deformación media deseada y/o basándose en una longitud fija aplicando el radio del tubo hidráulico también a la sección no axisimétrica del dispersador

Diámetro del tubo, $2R_0$ (mm)	Diámetro de contracción, $2R_1$ (mm)	Relación de contracción, CR como se ha definido anteriormente	Caudal volumétrico (mm^3/s)	B ; Tasa de deformación fija (1/s)	Longitud calculada, L (mm) para tasa de deformación fija igual a 10,0 (1/s) basado en Ec. (1)	Tasa de deformación media calculada (1/s) Basada en la Longitud Fija de 10 mm basada en Ec. (3)
9,50	5,50	2,98	4000	10,00	11,2	11,19
9,50	4,50	4,46	4000	10,00	19,5	19,51
9,50	3,50	7,37	4000	10,00	35,9	35,93
6,00	3,50	2,94	4000	10,00	27,4	27,43
6,00	3,25	3,41	4000	10,00	34,1	34,07
6,00	2,75	4,76	4000	10,00	53,2	53,20

5

Ejemplo 2: dispersión de embriones somáticos de Picea de Noruega

10 Uno de los sistemas dispersadores construidos de acuerdo con la presente divulgación consiste en dimensiones similares a la Tabla 3 caso Alt. 2 con 6 secciones no axisimétricas y 4 axisimétricas situadas en serie una después de la otra en un área de sección transversal decreciente de la constricción.

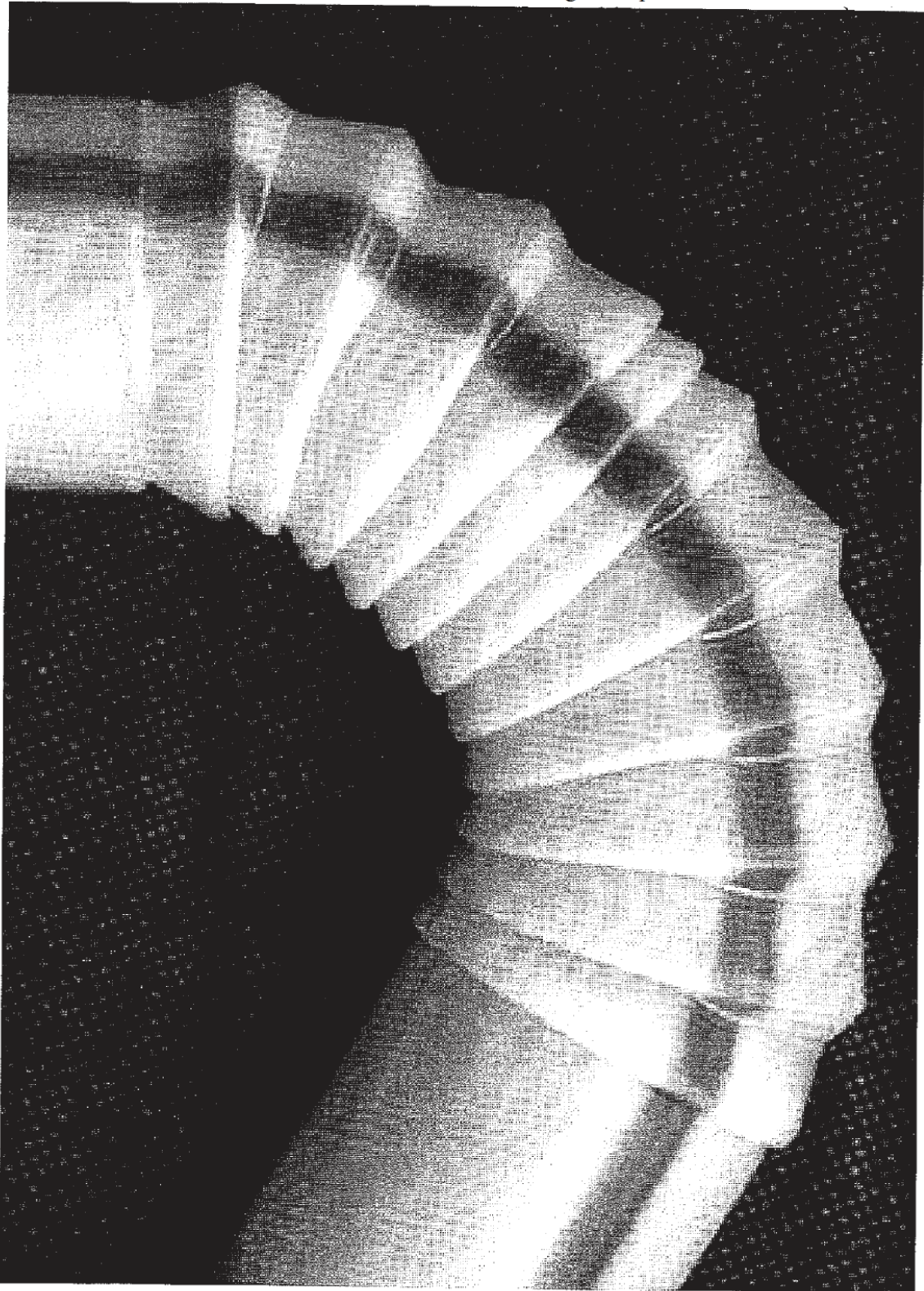
15 Se recogieron varios grupos de masa embrionaria de Picea de Noruega (línea celular 06:28:05) con el diámetro hidráulico medio de la sección transversal tomado de la sección media del grupo que varía de 5 mm a 30 mm de un biorreactor periódicamente y parcialmente sumergido y suministrado a un dispersador de la presente divulgación descrito anteriormente. Se unieron un total de diez (10) secciones de tubo por pliegues de tubo circular de 180° en un patrón espiral. La sección inferior de los pliegues de tubo se fijó en plástico de modo que la estructura completa se mantuvo fija en el sitio. A media que se inició el flujo por una bomba peristáltica, se observó que los grupos entraban en el dispersador y a través de las secciones con secciones de contracción y expansión axisimétricas y no axisimétricas. Se observó que los embriones se dispersaban completamente a medida que pasaban a través de la última sección del dispersador, mostrando la eficacia de la presente divulgación para dispersar completamente el grupo. Los embriones no se dañaron físicamente por la dispersión.

20

REIVINDICACIONES

1. Un método de dispersión de grupos de embriones vegetales suspendidos en un líquido en embriones vegetales individuales, incluyendo dicho método al menos una secuencia de dispersión, que comprende las siguientes etapas:
- 5 i) someter los grupos de embriones a fuerzas de dinámica de fluidos que provocan deformación de extensión axial y deformación de compresión radial;
- ii) someter los grupos de embriones a fuerzas de dinámica de fluidos que provocan deformación de compresión axial y deformación de extensión radial de fuerzas de dinámica de fluidos; repetir dichas etapas en secuencia hasta que los embriones individuales se separan entre sí.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, **en el que** la fuerza de las deformaciones de extensión y de compresión aumenta con cada secuencia repetida.
- 15 3. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **en el que** las etapas i) y ii) se realizan usando un dispersador para separar embriones individuales contenidos en grupos de embriones, **caracterizado por que** el dispersador comprende un canal de flujo que incluye al menos una constricción, de modo que los grupos de embriones que fluyen a través del canal de flujo se someten en primer lugar a deformación de extensión axial y deformación de compresión radial, y después a deformación de compresión axial y deformación de extensión radial de fuerzas de dinámica de fluidos.
- 20 4. El método de la reivindicación 3, **en el que** el dispersador para separar embriones vegetales somáticos individuales contenidos en grupos de embriones se **caracteriza por que** comprende un canal de flujo que incluye 3-100 constricciones,
- 25 **en el que** el canal de flujo incluye una parte intermedia que tiene una sección transversal esencialmente constante, entre cada constricción, que tiene longitud de al menos 2,5 mm,
- en el que** las constricciones tienen un área de sección transversal en el intervalo de 0,75 a 1300 mm² a condición de que la dimensión de sección transversal mínima del canal de flujo sea mayor que la dimensión mayor del embrión mayor que hay que dispersar,
- 30 de modo que los grupos de embriones que fluyen a través del canal de flujo se someten en primer lugar a deformación de extensión axial y deformación de compresión radial, y después a deformación de compresión axial y deformación de extensión radial de fuerzas de dinámica de fluidos.
- 35 5. El método de la reivindicación 4, **en el que** cada parte intermedia tiene un diámetro interno, que es igual a o menor que el diámetro interno de la parte intermedia inmediatamente corriente arriba de la misma.
6. El método de las reivindicaciones 4-5, **en el que** cada parte intermedia tiene una longitud al menos igual a los grupos de embriones para dispersar.
- 40 7. El método de la reivindicación 6, **en el que** la longitud de cada parte intermedia está en el intervalo de 2,5 mm a 60 mm, preferentemente de aproximadamente 5 mm a aproximadamente 30 mm.
8. El método de las reivindicaciones 4-7, **en el que** el número de constricciones es 5-20, más preferentemente aproximadamente 10.
- 45 9. El método de las reivindicaciones 4-8, **en el que** la constricción tiene un área de sección transversal en el intervalo de 3 a 32 mm².
- 50 10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 4-9, **en el que** el canal de flujo tiene sección transversal axisimétrica.
11. El método de las reivindicaciones 4-9, **en el que** el canal de flujo tiene una sección transversal esencialmente circular u oval.
- 55 12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 4-9, **en el que** al menos parte del canal de flujo tiene una sección transversal no axisimétrica tal como una sección transversal rectangular.
- 60 13. El método de la reivindicación 12, **en el que** la sección transversal de cada constricción no axisimétrica, que tiene una dimensión máxima, se orienta de modo que la dimensión máxima de cada constricción está girada al menos 30°, preferentemente aproximadamente 90° en relación con la dimensión máxima de la siguiente constricción no axisimétrica en secuencia.
- 65 14. El método de la reivindicación 12, **en el que** la sección transversal de cada constricción representa un rectángulo, que tiene un primer y un segundo lados, en donde el primer lado es más largo que el segundo lado, y las constricciones se orientan de tal manera que el primer lado de cada constricción es perpendicular al primer lado de la siguiente constricción en secuencia que tiene una sección transversal rectangular.

Fig. Complementaria A



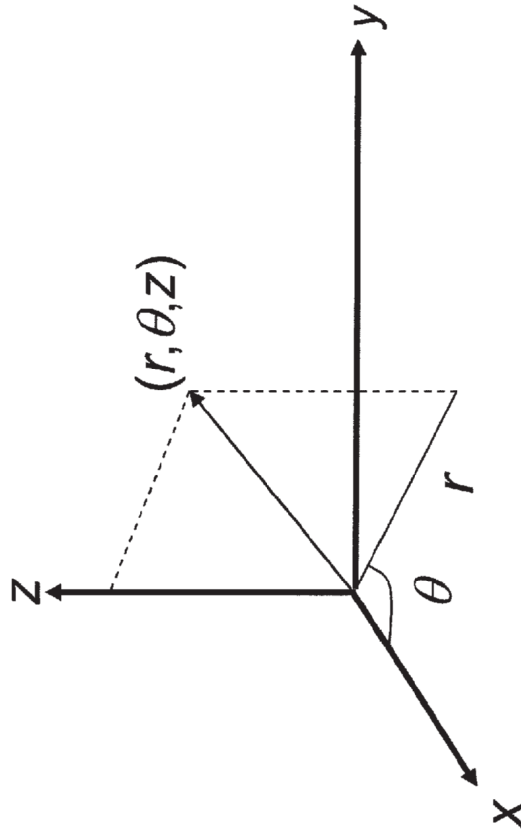


Fig 2

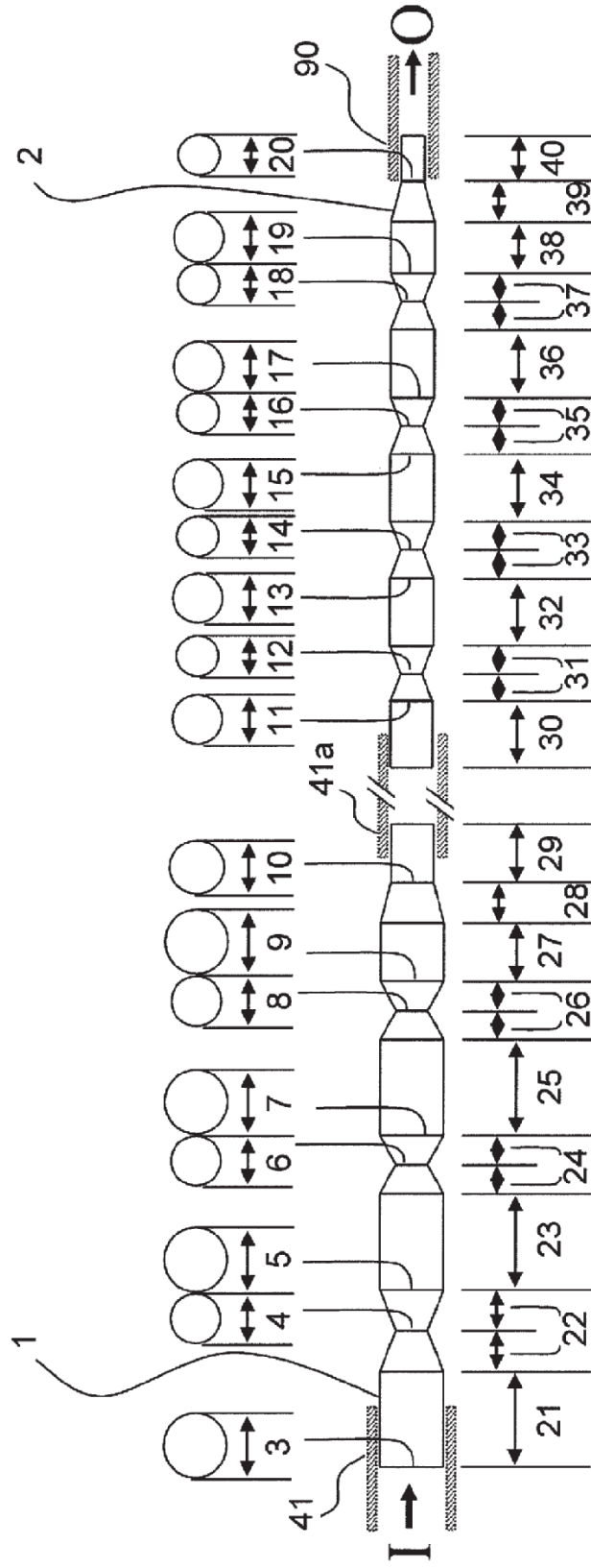
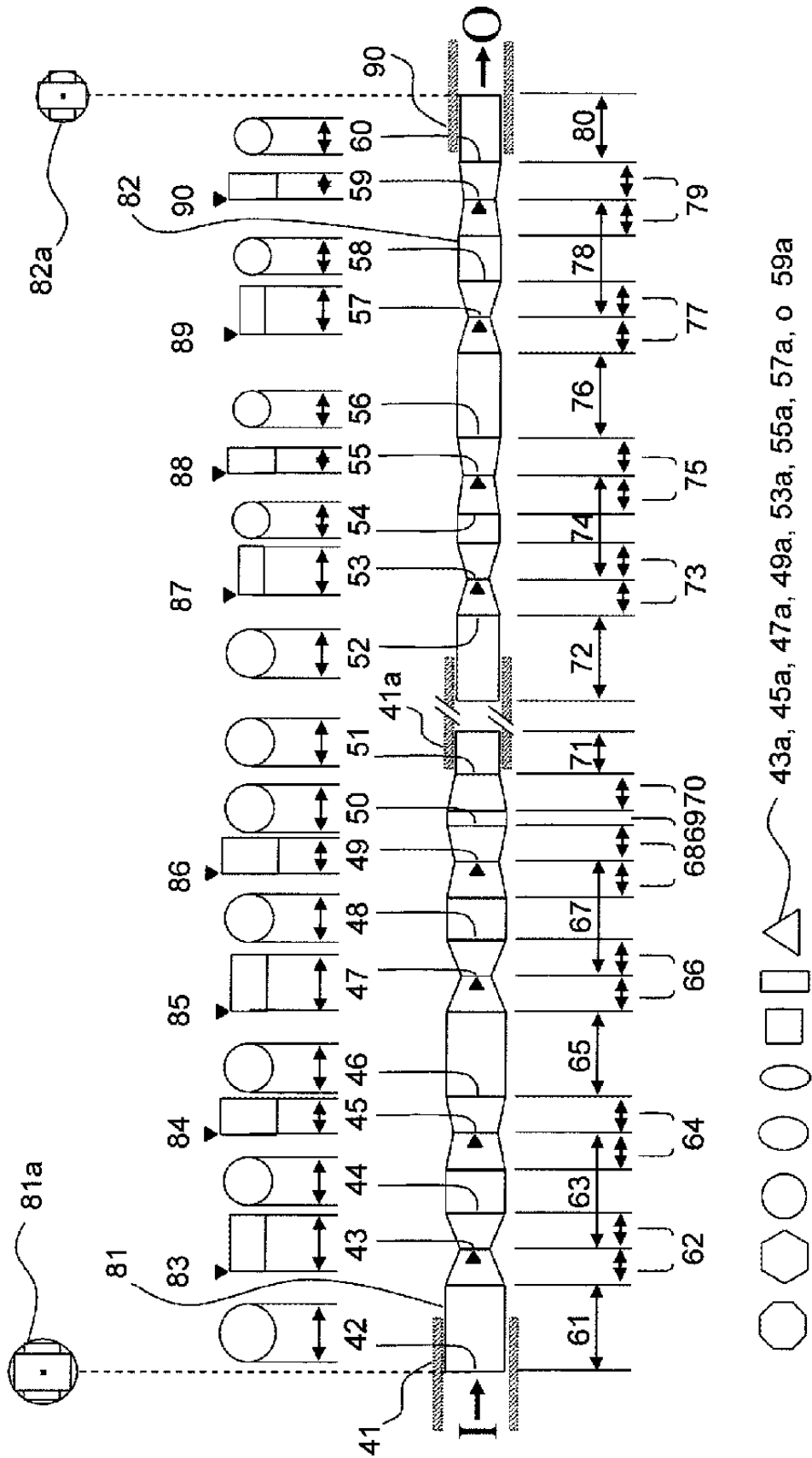


Fig 3



43a, 45a, 47a, 49a, 53a, 55a, 57a, o 59a

Fig 4