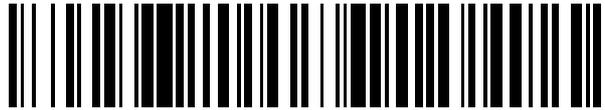


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 411**

51 Int. Cl.:

C12N 5/04 (2006.01)

C12M 1/00 (2006.01)

A01H 4/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2010 E 10821666 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2015 EP 2486125**

54 Título: **Dispositivo separador, dispositivo de deposición y sistema para manipular embriones vegetales somáticos**

30 Prioridad:

09.10.2009 SE 0950742
09.10.2009 US 250015 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.09.2015

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:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 546 411 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

Dispositivo separador, dispositivo de deposición y sistema para manipular embriones vegetales somáticos

5 **Antecedentes de la invención***Introducción general al área del problema*

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. De este modo, el proceso de embriogénesis somática ofrece una herramienta para obtener un gran número de plantas genotípicamente idénticas para la multiplicación de genotipos seleccionados de interés comercial, para la conservación de especies en peligro o para generar material vegetal genéticamente uniforme con fines de investigación.

15 *Antecedentes fisiológicos de los procedimientos relacionados con el problema*

20 Para producir plantas a partir de embriones somáticos de coníferas se aplica un procedimiento de múltiples etapas para cumplir las necesidades fisiológicas de las diferentes etapas de desarrollo, como se describe más adelante 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 regulador del crecimiento de plantas. Los embriones somáticos siguen formándose, normalmente en el mismo medio de cultivo de la composición, y una forma de cultivo embriogénico en proliferación. En la etapa de proliferación tienen lugar varias de las características clave consideradas generalmente beneficiosas para el proceso de la embriogénesis somática: (i) la propagación de masa de propágulos genotípicamente idénticos mediante una multiplicación sin límites de tejido embriogénico inmaduro; (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.

30 En la etapa siguiente del procedimiento, el embrión somático en proliferación se somete a un medio de crecimiento que desencadena que el desarrollo del embrión progrese a la etapa de maduración. La conversión de proliferación en maduración sólo se produce en una fracción de los embriones en proliferación en el cultivo: Se encuentran índices de conversión bajos con más frecuencia en genotipos de especies de coníferas recalcitrantes, pero son frecuentes en todas las especies de coníferas así como en otras especies de plantas. El trabajo manual necesario para recoger embriones aumenta con la disminución del índice de conversión y, de este modo, el coste y el riesgo de contaminación y otras inexactitudes. El índice de conversión bajo de proliferación a maduración es un cuello de botella principal para las aplicaciones comerciales a gran escala de procedimientos de embriogénesis somática. Para la germinación, los embriones somáticos maduros se someten a diferentes regímenes de cultivo para inducir la formación de raíces y de brotes, en una serie de etapas diferentes; desecación, tratamiento con sacarosa, inducción con luz roja y estimulación con luz azul. Después, los embriones germinados que se estime que se han desarrollado adecuadamente se transfieren a un material de abono y se transfieren gradualmente a un ambiente *ex vitro* durante el cual se reduce el contenido en sacarosa. Los diferentes tratamientos durante la germinación en una planta requieren la manipulación manual repetida de germinantes y plantas individuales, lo que añade un coste considerable al procedimiento global.

Producción de plantas a partir de embriones somáticos

50 El procedimiento de la técnica anterior para producir plantas a partir de embriones somáticos requiere la manipulación manual en varias etapas, lo que hace que el procedimiento requiera tiempo y sea caro e impreciso.

55 Para las especies de coníferas, los procedimientos estándar usados implican varias etapas cuando se requiere manipulación manual. El procedimiento general se indica 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, n.º 419, págs. 2355-2364).

60 Hay cuatro etapas que dependen de la manipulación manual para obtener una planta pequeña del embrión somático maduro como se observa en la Figura 1. La primera interacción manual se produce cuando [1] el embrión maduro se aísla de embriones inmaduros (120) y se coloca horizontalmente en un contenedor de plástico en condiciones estériles; la segunda [2] se produce tras 3-7 días de reposo (130), después, el embrión maduro se transfiere a un medio de cultivo en gel para el inicio de los procesos de germinación. El embrión somático germinado iniciará, en la composición del medio de cultivo y las condiciones de luz adecuadas, raíces (140). La tercera transferencia manual [3] es cuando el germinante que ha formado una raíz pequeña se transfiere a una posición vertical con la raíz parcialmente sumergida en medio de germinación líquido (150). La cuarta [4] y última transferencia es cuando el embrión germinado tiene una raíz primaria y pequeñas raíces laterales, después se transfiere a un sustrato sólido en

una maceta para la formación de la planta posterior (160).

Tabla 1 Lista de designaciones pertenecientes a la figura 1.

Elemento	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 de un embrión maduro
120	Fase de maduración
130	Fase de reposo
140	Fase de germinación
150	Fase de formación de planta <i>in vitro</i>
160	Fase de formación de planta <i>ex vitro</i>

5 En el procedimiento disponible hasta la fecha para producir plantas a partir de embriones somáticos, los embriones se recogen manualmente del tejido embriogénico inmaduro. Esto requiere tiempo y es ineficaz. Los documentos US06684564 y US7568309 de la técnica anterior enseñan la automatización de las transferencias manuales que
 10 substituyen al ojo humano, el brazo humano y las pinzas con sistemas de visión, cintas transportadoras y brazos robóticos automatizados con puntas de succión para recoger los embriones de cintas transportadoras porosas para depositarlos en un destino de un modo muy similar a como lo hace el ser humano. No obstante, este enfoque, análogo a la automatización del movimiento de un ala de un ave, por alas de robot para el vuelo, es demasiado complejo y poco práctico por varios motivos, como se indica más adelante. Por tanto, sería deseable proporcionar un modo simple y práctico para realizar la separación y la deposición de los embriones más rápido y más
 15 eficientemente. Los embriones somáticos maduros producidos están pegados inicialmente con tejido embriogénico inmaduro en racimos. Esto hace el proceso más complejo, ya que primero se tienen que separar los embriones del tejido embriogénico inmaduro en el racimo rompiendo el racimo. La técnica anterior no enseña cómo romper los racimos embriogénicos de un modo automático.

20 *Rotura de los racimos mediante un dispersor*

En la solicitud de patente PCT/US09/39981 se divulga un procedimiento de romper rápidamente los racimos basado en la suspensión de dichos racimos en medio líquido, tal como agua, y forzar los racimos en al menos una
 25 secuencia de dispersión, en la que los racimos de masa embriogénica quedan expuestos a fuerzas de flujo dinámico que causan la rotura de los racimos y la dispersión de los embriones individuales.

Segregación de embriones mediante un separador

30 Cuando la masa embriogénica se dispersa en un líquido de acuerdo con el procedimiento presentado anteriormente, una mezcla de embriones inmaduros y maduros y tejido embriogénico inmaduro se suspenden en el medio líquido. En muchas aplicaciones es muy deseable segregar y recoger los embriones de la masa embriogénica dispersada antes del procesamiento adicional posterior. Por ejemplo, si la intención es formar una imagen y analizar la forma y el estado de los embriones, como en Harrell y col., 1993 (Computers and Electronic in Agriculture, 9), es muy deseable tener únicamente embriones suspendidos en líquido sin ningún tejido embriogénico inmaduro con el fin de
 35 evitar oscurecer la imagen. Las tareas de reconocimiento y análisis de imágenes se hacen más difíciles y tediosas si la imagen contiene más objetos que únicamente el embrión. Además, la tarea de procesar imágenes requerirá más tiempo y afectará de forma adversa al procesamiento y los índices de conversión. Por tanto, existe la necesidad de procedimientos y medios de un separador eficaz para segregar y eliminar selectivamente y guiar únicamente los embriones a partir de la masa embriogénica dispersa en una corriente de flujo aparte de un modo rápido y eficiente.
 40 Disponer de embriones individuales únicamente en una corriente de flujo facilitaría el procesamiento adicional de los embriones, que puede incluir la obtención de imágenes digitales de los embriones individuales, análisis de imágenes y caracterización de los embriones, incluida la identificación y el control de la orientación de los embriones antes de la deposición en un sustrato adecuado para la germinación y producción de plantas.

45 Es un objeto de la invención proporcionar un medio automático para segregar y separar suavemente los embriones somáticos dispersos del tejido embriogénico inmaduro y guiar los embriones recogidos a una corriente aparte de líquido de un modo rápido y eficiente.

Medio de deposición de embriones

Los procedimientos de la técnica anterior para producir plantas a partir de embriones somáticos requieren manipulación manual intensiva y son, por tanto, caros para la producción de plantas. Los intentos para automatizar las etapas usadas en la operación manual han fallado debido a los complejos dispositivos desarrollados para automatizar la transferencia manual y la liberación de embriones por medio de partes móviles tales como cintas transportadoras y brazos robóticos elaborados. Por ejemplo, los documentos de la técnica anterior US7568309 y US 6.684.564 enseñan medios de transferencia de embriones en una semilla artificial por medio de una cinta transportadora porosa y brazos robóticos móviles equipados con puntas de succión para recoger el embrión de la cinta transportadora y depositar el embrión por medio de un brazo robótico móvil fijado a un raíl en una semilla artificial. Dichos procedimientos requieren muchas partes móviles, tales como poleas y motores para impulsar la cinta transportadora, dispositivo(s) de succión para vaciar el exceso de líquido del embrión, y un montaje de brazo robótico elaborado fijado de manera móvil a un raíl con control de precisión para localizar y recoger el embrión de la cinta transportadora. Dado que el embrión es un objeto pequeño y delicado, el brazo robótico debe tener un medio sensible y preciso para recoger y transportar los embriones sin dañarlos. Como se explica en el documento US 6.684.564, la cinta transportadora debe dejar de moverse cuando se detecte un embrión con el fin de que se tome la imagen del embrión y se capture por el medio mecánico de un brazo robótico. Una cinta transportadora que tiene que moverse y detenerse cada vez que se detecta un embrión crea un proceso inherentemente ineficiente. En general, la técnica anterior enseña un enfoque que requiere muchas partes móviles, incluidas las cintas transportadoras y los montajes de brazos robóticos, lo que hace que el estado actual de la técnica sea poco práctico.

Por tanto, un objeto de la invención es proporcionar un procedimiento y un dispositivo ventajosos para liberar un embrión en un receptor de embriones deseado sin necesidad de poleas, cintas transportadoras, brazos robóticos o dispositivos con partes móviles.

Sistema

Es otro objeto de la invención proporcionar un sistema para procesar embriones somáticos vegetales realizando el proceso de separación y al menos una etapa de proceso adicional de todo el proceso desde un birreactor hasta un propágulo plantado, lo que proporciona un medio rentable de manipulación y producción a gran escala de plantas a partir de embriogénesis somática.

Definiciones

Para los fines del presente documento, las expresiones embrión somático, embrión y embrión somático vegetal se usan de forma intercambiable. Los términos se refieren a embriones vegetales derivados de tejido somático de una planta, ya sean maduros o inmaduros.

La expresión masa embriogénica se refiere, en conjunto, al material vegetal que consiste en tejido embriogénico inmaduro o embriones maduros y tejido embriogénico inmaduro, presente en el cultivo líquido o sólido de embriones somáticos. La expresión tejido embriogénico inmaduro se refiere a todo material distinto al embrión que está en la masa embriogénica. El término tejido se usa en el presente documento de un modo poco convencional que consiste en células en gran medida indiferenciadas, y no debe confundirse con la referencia normal al tejido vegetal con células especializadas.

Las expresiones *racimos embriogénicos*, *racimos de embriones* o *racimos* se usan de forma intercambiable. El término se refiere a ensamblajes de *masa embriogénica* vegetal mantenida junta como material sólido continuo de tamaño finito en medio sólido o en medio líquido.

La píce de Noruega es una especie de píce, cuyo nombre en latín es *Picea abies*, nativo de Europa.

Las direcciones ortogonales en las coordenadas polares se dan por dirección axial (z), radial (r) y angular (o azimutal) (θ). Estas direcciones corresponden al eje central de un cilindro que es normal a la sección transversal circular del cilindro. Las direcciones radial y angular apuntan a lo largo del radio y normal al radio sobre la superficie transversal respectivamente.

Flujo axisimétrico se refiere al flujo en el interior de un tubo en el que la superficie transversal del tubo siempre es circular y, por tanto, existe una simetría con respecto al eje del tubo. En otras palabras, nada cambia a lo largo de la dirección angular (o azimutal).

Gradiente de presión se refiere al índice de variación de presión con respecto a una dirección axial dada.

Gradiente de presión axial, radial, angular se refiere a las variaciones de presión (p) en las direcciones axial, radial, angular mostradas respectivamente en términos matemáticos como derivadas parciales $\frac{\partial p}{\partial z}$, $\frac{\partial p}{\partial r}$, $\frac{\partial p}{\partial \theta}$. El término vórtex (en plural vórtices), como se usa en el presente documento, es un término que hace referencia a un flujo que

posee vorticidad con un movimiento de centrifugación o giratorio alrededor de un eje central.

El flujo de vórtex se puede clasificar como vórtex libre (no rotatorio) o vórtex forzado (rotacional).

5 Como se usa en el presente documento, el término vorticidad en términos matemáticos, es la rotacional del campo de vectores de velocidad; por tanto, es una cantidad vectorial con magnitud y dirección. En otros términos, el valor de la vorticidad en un punto en el flujo está relacionado con la velocidad de rotación de las partículas de fluido en un punto en el campo de flujo.

10 El término vórtex libre, como se usa en el presente documento, se refiere al flujo de vórtex en el que las partículas de fluido retienen su orientación mientras el flujo rota alrededor de un eje (es decir, la vorticidad es cero) en todo el flujo a excepción de cerca del eje central (donde en términos matemáticos existe una singularidad). Al colocar una flecha hipotética que se mueve con las partículas de fluido, la flecha continua apuntando a la misma dirección mientras rota alrededor de eje con el flujo. Un vórtex colector no rotatorio ideal podría ser un ejemplo de un vórtex libre.

15 El término vórtex colector como se usa en el presente documento se refiere al campo de flujo real producido en las proximidades de una región de drenaje, dicho drenaje podría ser por cualquier medio, incluido drenaje natural dirigido hacia abajo por gravedad o el drenaje en cualquier dirección inducido por presión diferencial u otro medio.

20 El término vórtex forzado, como se usa en el presente documento, se refiere a un flujo de vórtex en el que el fluido se mueve en una rotación de cuerpo sólido, lo que significa que no hay cizalladura en el flujo y, por tanto, la vorticidad es constante en todas partes e igual a 2ζ donde ζ es la velocidad de rotación. Una flecha hipotética que apunta al eje de rotación y fijada a las partículas de fluido en un vórtex forzado continúa apuntando al eje de rotación al tiempo que rota alrededor del eje.

25 Cotiledón, una parte de un embrión vegetal (100) que se convierte en las primeras hojas embrionarias de una plántula. El cotiledón se localiza en un extremo de un embrión vegetal opuesto al extremo en el que en última instancia se formarán las raíces (pie (102)). Cuando hay varios cotiledones, pueden formar una estructura denominada corona (101). El diámetro de la corona se refiere al diámetro de una estructura de corona en su lado más ancho (103).

30 Longitud de un embrión vegetal se refiere a la distancia lineal desde la punta del extremo de la raíz a la punta del extremo del cotiledón medida a lo largo del eje longitudinal del embrión (104).

35 Los términos tubo, canal y canal de flujo se usan de forma intercambiable. Los términos se usan sin referencia específica a ninguna forma geométrica concreta de la sección transversal, a menos que se indique específicamente lo contrario.

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

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

50 Tensión normal define la proporción o porcentaje de la cantidad de estiramiento o compresión a lo largo de elementos de la línea del material (proporción entre la deformación y la longitud original en la dirección de la deformación).

Tensión de cizalladura define la proporción o porcentaje de la cantidad de deformación relativa a la dimensión original asociada con el deslizamiento de las capas del plano material una sobre otra.

55 Tensión de extensión es una tensión normal en la que el elemento se estira.

Tensión de extensión axial es un elemento que se estira a lo largo de una dirección axial.

Tensión de extensión radial es un elemento que se estira a lo largo de la dirección radial.

60 Tensión de compresión es una tensión normal en la que el elemento se contrae.

Tensión de compresión axial se refiere a la deformación de un elemento que se contrae a lo largo de la dirección axial.

65 Tensión de compresión radial se refiere a la deformación de un elemento que se contrae a lo largo de la dirección radial.

El índice de tensión es el cambio en la tensión con respecto al tiempo.

5 Diámetro hidráulico, D_h , es un término usado para caracterizar el flujo en tubos y canales no circulares. Por definición, viene dado por $D_h = 4 A / S$, en la que A es el área transversal del tubo o canal no circular y S es el perímetro mojado de la sección transversal.

10 La velocidad media en un canal se define como velocidad de flujo volumétrico dividido por el área transversal del canal.

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

15 La tensión media es la tensión promediada sobre una superficie.

El índice medio de tensión es el índice de la tensión promediada sobre una superficie.

20 La viscosidad dinámica de un fluido es la proporción entre la tensión de cizalladura y el índice de la tensión de cizalladura, una constante para un fluido newtoniano. Agua, glicerina, aceite de silicona son ejemplos de fluidos newtonianos.

El perfil del índice de tensión es un perfil que muestra la variación del índice de tensión.

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

La unidad del índice de tensión como inversa del segundo se abrevia como "1/s".

30 En general, un flujo con un índice de tensión promedio más alto impondrá una tensión promedio más alta sobre una partícula (o embrión) o sobre un racimo de partículas (o racimo de embriones) suspendido en el fluido.

Los términos capa límite, capa límite viscosa y capa límite fina se usan de forma intercambiable para querer decir la capa límite formada por un flujo rotatorio forzado dentro del contenedor circular con o sin la presencia de una capa límite de absorción.

35 **Breve descripción de las figuras**

Figura 1. Ilustra un procedimiento general de producción de embriones somáticos vegetales.

40 Figura 2. Ilustra la construcción de ciertos detalles de una realización determinada de un dispositivo separador de la invención.

Figura 3. Vista desde arriba y desde debajo de ciertas realizaciones de un dispositivo separador de la invención.

45 Figura 4. Muestra el nivel de líquido en el contenedor separador interno (5), antes de la operación (A) y durante la operación (8).

Figura 5. Ilustra diferentes realizaciones alternativas de las salidas del tubo de alimentación (14a, 14b, 14c).

50 Figura 6. Ilustra diferentes realizaciones alternativas para el medio de rotación (18a, 18b).

Figura 7. Ilustra una realización de un dispositivo separador de la invención adaptado para un uso continuo. A y B ilustran medios alternativos para regular el flujo a través del conducto (7).

55 Figura 8. Ilustra el flujo secundario asociado con la capa límite durante la operación.

Figura 9. Ilustra una realización de un sistema automático que divulga las unidades de operación.

60 Figura 10. Ilustra un sistema automático completamente integrado que comprende unidades de la invención como se verifica en la parte experimental.

Figura 11. Ilustración de la deposición para germinación y la unidad de germinación.

Figura 12. Ilustra la deposición de embriones orientados.

65 Figura 13. Ilustración de una unidad dispersora axisimétrica.

Figura 14. Ilustración de una unidad dispersora no axisimétrica.

Figura 15 a -f. Ilustración de una unidad de orientación-clasificación-detección

5 Tabla 2. Lista de designaciones pertenecientes a las figuras.

	1	Bastidor del alojamiento
	2	Estructura de soporte superior
10	3	Estructura de soporte inferior
	4	Contenedor externo
15	5	Contenedor separador
	6	Pared inferior del contenedor separador
	7	Conducto del contenedor separador
20	8	Sensor
	9	Conducto de alimentación
25	10	Centro axial del contenedor separador (5)
	11	Eje hueco
	12	Motor del eje hueco
30	13	Contenedor corriente arriba
	14	Salida del conducto de alimentación (9)
35	15	Barrera líquida del contenedor externo
	16	Abertura en el contenedor externo
	17	Tubo de drenaje del contenedor externo
40	18	Medio de rotación
	19	Bloque de la base
45	20	Capa límite
	21	Nivel de fluido en el contenedor separador al comienzo
	22	Nivel de fluido en el contenedor separador durante la operación
50	25	Salida secundaria
	30	Tercera salida del contenedor (5)
55	31	Tubo de drenaje del contenedor separador (5)
	32	Tubo de extracción
	33	Extremo inferior del tubo de extracción
60	34	Orificio en la estructura de soporte superior
	35	Actuador lineal
65	36	Válvula, como una válvula de asentamiento, pasante, rotatoria o de aguja o un conjunto de dichas válvulas (opcional)

ES 2 546 411 T3

	37	Válvula de drenaje (opcional)
5	38	Unidad de control (opcional)
	50	Diámetro interno de una realización circular de un conducto (7)
	51	Diámetro interno de una realización circular de un contenedor separador (5)
10	52	Diámetro interno de una realización de medio de rotación 18a
	53	Diámetro de una realización de medio de rotación 18b
15	54	Altura del contenedor separador (5)
	200	Biorreactor
	205	Sistema para procesar los embriones somáticos vegetales
20	210	Extracción de racimos embriogénicos
	215	Transferencia de racimos embriogénicos
	220	Dispensor
25	225	Transferencia de la masa embriogénica dispersada
	230	Separador
30	233	Transferencia de tejido embriogénico inmaduro
	235	Transferencia de embriones separados
	240	Diluidor
35	245	Transferencia de embriones diluidos
	247	Deposición para clasificación
40	249	Sección de prueba
	250	Sistema de orientación-clasificación-detección
	255	Transferencia de embriones orientados
45	260	Deposición de embriones maduros orientados en los receptores de embriones
	263	Fluido y embriones rechazados
50	265	Transferencia de embriones maduros aceptados
	270	Germinación
	280	Vivero
55	290	Fluido de dilución
	300	Placa con contenedores de embriones
60	305	Perforaciones en la placa
	310	Deposición de rechazo
	315	Accionador lineal de la tabla x-/y-
65	320	Sustrato

	325	Cavidad en el sustrato
5	330	Espacio abierto entre contenedores de embriones
	335	Conectores entre contenedores de embriones
	340	Contenedor de embriones
10	345	Perforaciones en el contenedor de embriones
	350	Orificio estrecho
15	360	Longitud del chorro libre
	365	Salida
	370	Sección recta del tubo antes de la salida 365
20	375	Dirección del flujo del fluido y embriones orientados
	380	Diámetro del tubo
	381	Líquido de encapsulación
25	382	Chorro de liberación del líquido de encapsulación
	383a	Embrión orientado dentro del chorro de liberación
30	383b	Embrión dentro de un chorro de liberación inestable
	385	Chorro de liberación sustancialmente estable
	386	Chorro de liberación sustancialmente inestable
35	387	Vaso de liberación del líquido de encapsulación (tubo)
	388	Tubo de liberación interno
40	401	Segmento de un canal axisimétrico
	402	Segmento de un canal axisimétrico
45	403 a 440	Dimensiones de acuerdo con la tabla 5
	441	Tubo conector
	481	Segmento de un canal no axisimétrico
50	481a	Sección transversal de 481
	482	Segmento de un canal no axisimétrico
	482a	Sección transversal de 482
55	442 a 490	Dimensiones de acuerdo con la tabla 6
	501	Entrada de fluido
60	502	Tubo de entrada
	503	Salida de fluido
	504	Tubo de salida
65	505	Tino deposición

ES 2 546 411 T3

- 506 Dispositivo de deposición
- 507 Intersección
- 5 Válvula de entrada (opcional)
- 509 Válvula de salida (opcional)
- 10 510 Detector de orientación
- 511 Detector del tubo de deposición (opcional)
- 512 Detector del tubo de salida (opcional)
- 15 518 Dirección del flujo
- 519 Válvula de intersección de tres vías (opcional)
- 20 521 Placa de destino secundaria (opcional)
- 522 Tubo de salida secundario (opcional)
- 523 Intersección secundaria (opcional)
- 25 524 Drenaje de líquido (opcional)
- 530 Aberturas de entrada o salida de la válvula de intersección
- 30 531 Alojamiento de la válvula de intersección
- 532 Rotor de la válvula de intersección
- 533 Canal de flujo del rotor de la válvula de intersección
- 35 534 Diámetro de entrada/salida
- 540 Dispositivo de la tabla móvil x, y (opcional)
- 40 541 Dispositivo para el tubo de salida móvil x, y (504) (opcional)
- 550 Válvula de tres vías en la intersección secundaria (523) (opcional)
- 560 Tubo de entrada/salida de aire al dispositivo de deposición (opcional)
- 45 561 Entrada/salida de aire (opcional)
- 562 Filtro de aire (opcional)
- 50 Tabla 5. Lista de designaciones de dimensiones pertenecientes a la figura 13.

Posición de sección transversal	Diámetro interno [mm]	Diámetro interno preferido para píceas de Noruega
(403)	3,0 – 10,0	9,0 - 9,5
(404)	2,0 – 9,0	5,0 - 5,5
(405)	3,0 – 10,0	9,0 - 9,5
(406)	2,0 – 9,0	4,75 - 5,0
(407)	3,0 – 10,0	9,0 - 9,5
(408)	2,0 – 9,0	4,0 - 4,25
(409)	3,0 – 10,0	9,0 - 9,5
(410)	2,0 – 9,0	5,5 - 6,0
(411)	2,0 – 9,0	5,75 - 6,0
(412)	1,0 – 8,0	3,25 - 3,5

ES 2 546 411 T3

(413)	2,0 – 9,0	5,75 - 6,0
(414)	1,0 – 8,0	3,0 - 3,25
(415)	2,0 – 9,0	5,75 - 6,0
(416)	1,0 – 8,0	2,5 - 2,75
(417)	2,0 – 9,0	5,75 - 6,0
(418)	1,0 – 8,0	2,5 - 2,75
(419)	2,0 – 9,0	5,75 - 6,0
(420)	2,0 – 9,0	5,75 - 6,0
Longitud en los detalles	Longitud [mm]	
(421)	30,0	
(422)	10,0	
(423)	30,0	
(424)	5,0	
(425)	30,0	
(426)	5,0	
(427)	20,0	
(428)	10,0	
(429)	20,0	
(430)	30,0	
(431)	5,0	
(432)	30,0	
(433)	5,0	
(434)	30,0	
(435)	5,0	
(436)	30,0	
(437)	5,0	
(438)	20,0	
(439)	10,0	
(440)	10,0	

Tabla 6. Lista de designaciones de dimensiones pertenecientes a la figura 14.

Ejemplos de dimensiones transversales internas

5

	Forma de la sección interna	Dimensiones internas [mm]		Lado de la flecha negra [mm] (483)-(490)		Lado de anchura [mm]	
		Alt. 1	Alt. 2	Alt. 1	Alt. 2	Alt. 1	Alt. 2
(442)	circular	9,5	9,5				
(443)	Rectangular			(483) 5,0	(483) 4,75	9,5	9,5
(444)	circular	9,5	9,5				
(445)	Rectangular			(484) 9,5	(484) 9,5	5,0	4,25
(446)	circular	9,5	9,5				
(447)	Rectangular			(485) 5,0	(485) 3,75	9,5	9,5
(448)	circular	9,5	9,5				
(449)	Rectangular			(486) 9,5	(486) 9,5	5,0	3,5
(450)	circular	9,5	9,5				
(451)	circular	6,0	6,0				
(452)	circular	6,0	6,0				
(453)	Rectangular			(487) 3,5	(487) 3,25	6,0	6,0
(454)	circular	6,0	6,0				
(455)	Rectangular			(488) 6,0	(488) 6,0	3,5	3,25
(456)	circular	6,0	6,0				

(457)	Rectangular			(489) 3,5	(489) 2,75	6,0	6,0
(458)	circular	6,0	6,0				
(459)	Rectangular			(490) 6,0	(490) 6,0	3,5	2,75
(460)	circular	6,0	6,0				

Resumen de la invención

5 En el primer aspecto, la invención proporciona un dispositivo para separar embriones vegetales suspendidos en fluido y tejido embriogénico inmaduro entre sí, que comprende:

- 10 a) un contenedor separador (5), que, durante la operación, contiene fluido que tiene una densidad menor que la densidad de los embriones a separar, teniendo dicho contenedor una forma esencialmente cilíndrica, teniendo una pared inferior esencialmente plana (6), un eje esencialmente vertical y comprendiendo un conducto de fluido (7) en comunicación con el interior del contenedor, localizado en la región axial de la pared inferior (6);
- 15 b) un medio de inducción de un flujo de rotación axisimétrico en el fluido relativo a la pared inferior (6), que es un objeto en rotación colocado dentro del contenedor (5), de modo que durante la operación:
 - i) se cree una capa límite viscosa (20) en la pared inferior (6);
 - ii) se cree un gradiente de presión radial en el contenedor separador (5);
- 20 c) medios de introducción de los embriones suspendidos en fluido y el tejido embriogénico inmaduro a separar en fluido presente en el contenedor separador (5) en una ubicación alejada de la pared inferior (6), de modo que durante la operación
 - 25 i) los embriones sedimenten sustancialmente más rápido que el tejido embriogénico inmaduro;
 - ii) los embriones entren en la capa límite viscosa (20), mientras que el tejido embriogénico inmaduro permanece sustancialmente fuera de la capa límite viscosa (20);
- 30 d) los embriones que entran en la capa límite viscosa (20) se extraen dentro de la región axial de la pared inferior (6) y hacia el interior del conducto (7); y
 - medios para recoger embriones de dicho conducto (7);

35 de modo que los embriones recogidos se separan esencialmente del tejido embriogénico inmaduro.

Preferentemente, el dispositivo del primer aspecto es un dispositivo en el que el conducto (7) está colocado y dimensionado de forma tal que los embriones que son arrastrados dentro de la región axial de la pared inferior (6) durante la operación entren dentro del conducto (7) por sedimentación rotacional.

40 Preferentemente, el dispositivo del primer aspecto es un dispositivo en el que el medio de recolección de embriones comprende medios de recolección de embriones del conducto (7) sin alterar sustancialmente el volumen de fluido en el contenedor.

45 Preferentemente, el dispositivo del primer aspecto es un dispositivo en el que el medio de retirada de los embriones del conducto (7) sin alterar el volumen de fluido en el contenedor comprende una válvula o un conjunto de válvulas (36).

50 Preferentemente, el dispositivo del primer aspecto es un dispositivo en el que

- i) el dispositivo comprende medios de drenar fluido de dicho conducto (7), en el que durante la operación se crea un vórtex colector en la región axial de la pared inferior (6); y
- 55 ii) el medio de recolección de embriones comprende medios de recolección de embriones del vórtex colector en el fluido drenado del conducto (7).

60 Preferentemente, el dispositivo del primer aspecto es un dispositivo en el que el dispositivo está adaptado para operar de forma discontinua y comprende además medios de recolección selectiva de embriones durante un periodo de tiempo tras la sedimentación de los embriones pero antes de que el tejido embriogénico inmaduro haya tenido tiempo de sedimentar.

- 5 Preferentemente, el dispositivo del primer aspecto es un dispositivo en el que el dispositivo está adaptado para operar de forma continua y comprende además un contenedor separador (5) que comprende una segunda salida (25) en la parte superior del contenedor separador (5) y medios de alimentar fluido dentro del contenedor separador (5) a una velocidad superior a la velocidad del flujo del fluido desde el conducto (7), preferentemente por un factor dentro del intervalo de 2-100, más preferentemente por un factor dentro del intervalo de aproximadamente 5-20.
- 10 Preferentemente, el dispositivo del primer aspecto es un dispositivo en el que la segunda salida (25) se implementa por medio de un contenedor separador (5) que está abierto por la parte superior.
- 15 Preferentemente, el dispositivo del primer aspecto es un dispositivo en el que el dispositivo comprende adicionalmente medios de sustituir el fluido en el contenedor separador (5).
- 20 Preferentemente, el dispositivo del primer aspecto es un dispositivo en el que el dispositivo comprende medios de drenar fluido de la región axial de la pared inferior (6) durante la operación, que comprende un conducto extendido desde arriba o en cualquier otra dirección hacia las proximidades de la región axial de la pared inferior (6).
- 25 Preferentemente, el dispositivo del primer aspecto puede comprender un contenedor separador (5) que tiene un diámetro en el intervalo de 5-30 cm, más preferentemente 10-25 cm, 10-25 cm o 18-22 cm, lo más preferentemente de aproximadamente 20 cm.
- 30 Preferentemente, el dispositivo del primer aspecto puede comprender un conducto de fluido (7) que tiene un área de 0,01-1,0%, más preferentemente de 0,01-1%, incluso más preferentemente de 0,1-0,15% y, lo más preferentemente de aproximadamente 0,125% del área de la pared inferior (6).
- 35 Preferentemente, el dispositivo del primer aspecto puede comprender un medio de inducir un flujo de rotación axisimétrico que tiene como resultado una velocidad rotacional en el intervalo de 5-1200 rpm, más preferentemente de 30 a 360 rpm en el fluido.
- 40 Preferentemente, el dispositivo del primer aspecto puede comprender un medio de inducir un flujo de rotación axisimétrico que comprende un objeto de forma cilíndrica o en disco rotatorio.
- 45 Preferentemente, el dispositivo del primer aspecto puede comprender un medio de alimentar embriones y tejido embriogénico localizado en una ubicación axial cerca de la superficie del fluido presente durante la operación.
- 50 Preferentemente, el dispositivo del primer aspecto puede comprender un medio de mantener un fluido estático, siendo la altura de 0, 1-1,0 veces, más preferentemente 0,8-2 veces el diámetro del contenedor separador (5).
- 55 En un segundo aspecto de la invención se proporciona un procedimiento para separar embriones vegetales suspendidos en fluido y tejido embriogénico inmaduro, que comprende las etapas de:
- 45 a) proporcionar un contenedor separador (5) adecuado, en el que dicho contenedor que contiene fluido tiene una densidad inferior a la de los embriones a separar, teniendo una forma esencialmente cilíndrica, teniendo una pared inferior esencialmente plana (6) y un eje esencialmente vertical; y comprendiendo además un conducto (7) en comunicación con el fluido en el contenedor en la región axial de la pared inferior (6) durante la operación y un medio de inducción de un flujo de rotación (18) axisimétrico que es un objeto en rotación colocado dentro del contenedor (5);
 - 50 b) crear un vórtex colector en la región axial de la pared inferior (6) drenando fluido de dicho conducto (7); e inducir un flujo de rotación axisimétrico en el fluido relativo a la pared inferior (6) mediante el medio de rotación (18), de modo que:
 - 55 i) se cree una capa límite viscosa (20) en la pared inferior (6); y
 - ii) se cree un gradiente de presión radial en el contenedor separador (5);
 - 60 c) alimentar los embriones suspendidos en fluido y el tejido embriogénico inmaduro a separar dentro del fluido presente en el contenedor separador (5) en una ubicación alejada de la pared inferior (6), de modo que:
 - 65 i) los embriones sedimenten más rápido que el tejido embriogénico inmaduro;
 - ii) los embriones puedan entrar en la capa límite viscosa (20), mientras que el tejido embriogénico inmaduro no puede entrar en la capa límite viscosa (20);

iii) se arrastren los embriones que entran en la capa límite viscosa (20) dentro de la región axial de la pared inferior (6) y

d) recoger embriones de dicha región axial de la pared inferior (6) en el fluido drenado del conducto (7);

5

de modo que los embriones recogidos se separen esencialmente del tejido embriogénico inmaduro.

Preferentemente, el método comprende además

10 a) proporcionar un contenedor separador adecuado (5) que además comprende un conducto (7) en comunicación con el fluido en el contenedor en la región axial de la pared inferior (6) durante la operación, en el que el conducto (7) está colocado y dimensionado de un modo tal que los embriones arrastrados dentro de la región axial de la pared inferior (6) durante la operación entren en el conducto (7) mediante sedimentación gravitacional; y

15

b) recoger embriones de dicho conducto (7).

Más preferentemente, el método comprende además la etapa de modular la velocidad de sedimentación de los embriones en el conducto (7) por medio de inducción del flujo del fluido a través del conducto (7) hacia el interior del contenedor separador (5).

20

El procedimiento del segundo aspecto puede estar adaptado, preferentemente, para operar de forma discontinua y comprende además medios de recolección selectiva de embriones durante un periodo de tiempo tras la sedimentación de los embriones pero antes de que el tejido embriogénico inmaduro haya tenido tiempo de sedimentar. El procedimiento del segundo aspecto adaptado para operar de forma discontinua puede comprender, adicional y preferentemente, la etapa de sustituir el fluido en el contenedor separador (5) tras el procesamiento de un lote de embriones con fluido fresco.

25

El procedimiento del segundo aspecto puede estar adaptado, preferentemente, para operar de forma continua, de modo que comprende alimentar fluido dentro del contenedor separador (5) a una velocidad que supera la velocidad del fluido desde el conducto (7), preferentemente por un factor en el intervalo de 1, 1-1000, más preferentemente 2-100, incluso más preferentemente 2-50, 2-30, 3-20 o 5-15, más preferentemente aproximadamente 10.

30

El procedimiento del segundo aspecto puede comprender, preferentemente, que la recolección de embriones se realiza permitiendo que los embriones entren en el fluido que sale del conducto (7) y recoger el fluido que contiene los embriones.

35

En un tercer aspecto de la invención se proporciona un sistema para procesar embriones vegetales suspendidos en un fluido, comprendiendo un dispositivo separador (230) de acuerdo con el primer aspecto de la invención, y al menos uno de los siguientes:

40

a) una unidad dispersora (220) para dispersar los embriones y el tejido embriogénico suspendido en un fluido, localizado corriente arriba del dispositivo separador y, opcionalmente, un biorreactor (200), como fuente de embriones, localizado corriente arriba de la unidad dispersora (220);

45

b) unidad de orientación y clasificación (250) para orientar y clasificar los embriones suspendidos en un fluido, localizado corriente abajo del dispositivo separador (230) y, opcionalmente, un dispositivo de deposición (260), localizado, preferentemente, corriente abajo de la unidad de orientación y clasificación (250).

50

En un cuarto aspecto de la invención, se proporciona un sistema que comprende un dispositivo separador de acuerdo con el primer aspecto de la invención, y un dispositivo para depositar embriones vegetales suspendidos en fluido al tiempo que se mantiene la orientación del embrión, que comprende

55

i) un canal de flujo dimensionado de modo que los embriones puedan desplazarse con el fluido que fluye a través del canal pero que estén restringidos a desplazarse en una orientación de la primera corona o la última corona por restricciones dimensionales, emanando dicho canal de flujo a una salida (365);

ii) un receptor de embriones (340); y

60

iii) medios de formar un chorro libre de fluido que emana de la salida, en el que el chorro libre durante la operación se alinea con un receptor de embriones (340) lo cual permite depositar los embriones suspendidos en el fluido en el receptor de embriones (340);

65

en el que los medios de formar un chorro libre comprenden una sección de canal de flujo inmediatamente corriente arriba de la salida (365), teniendo una sección recta (370) con una longitud al menos igual a la dimensión interna transversal más grande del canal de flujo (380).

Descripción detallada de la invención

5 Los embriones somáticos producidos sobre medio sólido o líquido en placas Petri o biorreactores se juntan inicialmente mediante tejido embriogénico inmaduro en racimos embriogénicos o grupos de un diámetro de normalmente de hasta 50 mm o incluso mayor. La técnica anterior enseña procedimientos de capturar embriones individuales manualmente con pinzas o automáticamente con cintas transportadoras y brazos robóticos y alimentar el embrión en una semilla artificial. La técnica anterior no enseña cómo romper rápido y eficazmente los racimos embriogénicos y separar el embrión maduro y juntarlo con los embriones maduros y viables, cada uno en orientación derecha, en un contenedor individual, que podría ser una semilla artificial u otro tipo, en cuestión de segundos. Para proporcionar un medio eficiente para la producción a gran escala de plantas de embriones somáticos vegetales, se requiere un medio automático para separar de forma rápida y barata los embriones maduros a partir de dichos racimos embriogénicos y para depositar rápidamente los embriones maduros en orientación correcta en un sustrato adecuado para la germinación. Para ello, se necesita cuatro etapas operacionales principales, como se divulga en el presente documento.

En primer lugar, una suave dispersión de los racimos de embriones somáticos en embriones individuales desunidos del tejido embriogénico inmaduro, que se realiza de forma ventajosa cuando está suspendida en un medio líquido.

En segundo lugar, el procedimiento implica segregar y separar los embriones del tejido embriogénico inmaduro ahora disperso, pero todavía se tienen que mezclar en el medio líquido. La segunda etapa es útil, por ejemplo, para proporcionar un acceso ópticamente transparente para los embriones suspendidos en un medio líquido transparente sin la presencia del tejido embriogénico. La necesidad de dicho acceso óptico es establecer el nivel de madurez e idoneidad de los embriones para germinación y producción de plantas.

En tercer lugar, el procedimiento implica la identificación de la orientación de los embriones maduros antes de la deposición y la corrección de una orientación no deseada, lo que se realiza con el embrión del donante todavía suspendido en medio líquido.

En cuarto lugar, el procedimiento implica depositar los embriones maduros en la orientación correcta en un sustrato adecuado para la germinación y formación de plantas.

La combinación eficaz de las cuatro etapas corriente arriba es en un sistema automático basado en dinámica de fluidos capaz de transportar rápida y eficazmente los embriones por cada etapa, como se divulga en el presente documento, proporciona un medio para la producción eficiente a gran escala de planta a partir de embriones somáticos.

Una realización del sistema automático basado en dinámica de fluidos para dispersión, separación, clasificación y orientación y deposición de forma rápida y eficaz de embriones vegetales en un sustrato para la germinación se divulga en la figura 10. El sistema automático implica varias etapas innovadoras, como se ha divulgado, en el orden del proceso indicado en la figura 10 y resumido en el presente documento:

1. La unidad dispersora (220) por referencia a la solicitud de patente PCT/US09/39981 y también divulgada en el presente documento,

2. La unidad separadora (230), como se ha divulgado en el presente documento,

3. La unidad de detección y orientación (250) por referencia a la solicitud de patente PCT/US09/39982 y también divulgada en el presente documento.

4. El dispositivo de deposición para germinación (260), como se ha divulgado en el presente documento.

1. Unidad dispersora

La descripción detallada de una unidad dispersora para el medio para dispersar el racimo embriogénico en medio líquido se proporciona en la solicitud de patente PCT/US09/39981.

Unidad dispersora del sistema

El documento PCT/US09/39981 se refiere a procedimientos y dispositivos para dispersar suavemente racimos de embriones somáticos vegetales en embriones individuales y tejido embriogénico inmaduro útiles en el sistema de la invención.

Un procedimiento de dispersión de racimos de embriones vegetales suspendidos en un medio líquido en embriones vegetales se divulga en el documento PCT/US09/39981, incluyendo dicho procedimiento al menos una secuencia de

dispersión, que comprende las etapas siguientes:

5 i) someter los racimos de embriones a fuerzas de dinámica de fluidos, que produce tensión de extensión axial y tensión de compresión radial;

ii) someter los racimos de embriones a fuerzas de dinámica de fluidos, que produce tensión de compresión radial y tensión de extensión axial por las fuerzas de dinámica de fluidos;

repetir dichas etapas en secuencia hasta que los embriones individuales se separan unos de otros.

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

15 En el documento PCT/US09/39981 se divulga un dispersor para separar embriones individuales contenidos en racimos de embriones, que comprende un canal de flujo que incluye al menos una constricción, de modo que los racimos de embriones que fluyen a través del canal de flujo se someten primero a tensión de extensión axial y tensión de compresión radial y, después, a tensión de compresión axial y tensión de extensión axial por fuerzas de dinámica de fluidos.

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

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

25 Preferentemente, cada porción intermedia tiene un diámetro interno que es igual o menor al diámetro interno de la porción intermedia inmediatamente antes de la misma.

30 Preferentemente, cada porción intermedia puede tener una longitud al menos igual a los racimos de embriones que se van a dispersar. La longitud de cada porción intermedia puede estar en el intervalo de 2,5 mm a 60 mm, tal como de desde aproximadamente 5 mm hasta aproximadamente 30 mm. El número de constricciones puede ser 3-100, preferentemente 5-20, tal como aproximadamente 10. Las constricciones pueden tener un área transversal en el intervalo de 0,75 a 1300 mm², tal como en el intervalo de 3 a 32 mm².

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

40 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 estar orientada, preferentemente, de modo tal que la dimensión máxima de cada constricción esté rotada, tal como 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 primero y un segundo lado, en el que el primer lado es más largo que el segundo lado y las constricciones están orientadas de un modo tal que el primer lado de cada constricción es perpendicular al primer lado de la siguiente constricción en secuencia que tiene una sección transversal rectangular.

45 Las ventajas del procedimiento y el dispositivo de dispersión divulgados en el documento PCT/US09/39981 incluyen:

(1) No requiere partes móviles y, por tanto, es robusto

50 (2) Es naturalmente aplicable a un sistema de flujo continuo por lo que no requiere operación en modo discontinuo

(3) Es suave para los embriones

55 (4) Es rápido, la dispersión que usa el dispositivo solo requiere unos segundos para dispersar cientos de embriones

(5) El dispositivo es compacto y completamente encerrado permite una fácil esterilización.

2. Unidad separadora

60 *Dispositivo para segregar y separar embriones somáticos a partir de tejido embriogénico*

65 Una vez que un racimo embriogénico se ha dispersado en líquido, crea una mezcla de embriones maduros, embriones inmaduros y tejido embriogénico inmaduro suspendido en líquido. Los embriones somáticos tienen que segregarse y separarse del tejido embriogénico inmaduro para su posterior procesamiento y sembrado. En un sistema automático, es muy deseable realizar este proceso de separación rápida, eficazmente y sin producir ninguna interrupción en la operación continua del sistema. Dicho dispositivo separador de la invención se divulga en el

presente documento.

El dispositivo separador y el procedimiento de la invención aprovechan la diferencia en el coeficiente de arrastre de los embriones en oposición al tejido embriogénico inmaduro (en lo sucesivo en el presente documento "tejido" o "tejido embriogénico") en la suspensión, para proporcionar un dispositivo y procedimiento de separar embriones somáticos de tejido embriogénico.

Construcción general y operación del dispositivo

Para facilitar la discusión teórica que sigue, a continuación se presenta una breve descripción general de un dispositivo de la invención.

El dispositivo separador de la invención tiene un contenedor separador (5) esencialmente cilíndrico que contiene medio líquido durante la operación y medio de inducción de un flujo de rotación axisimétrico en el fluido dentro del contenedor separador (5). Hay una pared inferior (6) que es, preferentemente, esencialmente plana. El medio fluido tiene una densidad que es inferior a la de los embriones y el tejido que se van a separar. El medio fluido puede ser, preferentemente, agua.

El medio fluido dentro del contenedor separador (5) se induce para que rote (en relación a la pared inferior (6)) alrededor del eje central del contenedor separador (5), con una velocidad rotacional esencialmente homogénea dentro de todo el contenedor separador (5), a excepción de cerca de una capa límite fina que se forma en la superficie de la pared inferior (6) en la que la velocidad rotacional se acerca rápidamente a cero en la pared inferior (6). Debido a la rotación del fluido, la presión aumenta a lo largo de la dirección radial en otros lugares del contenedor separador (5), incluido el interior de la capa límite fina en la pared inferior (6), en una cantidad sustancialmente homogénea. Más exactamente, la presión aumenta en la dirección radial de un modo tal que la velocidad de cambio de la presión con respecto a la distancia radial desde el eje central (10) es independiente de la localización axial y depende cuadráticamente de la velocidad de rotación y depende linealmente de la distancia radial desde el eje central.

Existe un conducto (7) en la región axial (centro) de la pared inferior (6) a partir de la cual se pueden retirar y recoger los embriones somáticos.

Los embriones mezclados con tejido embriogénico inmaduro (en lo sucesivo tejido) se introducen en el contenedor separador (5), a una distancia suficiente lejos de la pared inferior (6). Los embriones y el tejido se atrapan y se dispersan rápidamente en el fluido rotatorio con la fuerza centrífuga empujándolos hacia fuera y la fuerza de presión hacia dentro empujándolos hacia dentro. Las dos fuerzas se contrarrestan y los embriones y el tejido encuentran, en última instancia, una órbita equilibrada para rotar a su alrededor. No obstante, los embriones sedimentan más rápido que el tejido mientras rotan. El tejido que tiene un arrastre relativamente más grande permanecerá sustancialmente más atrapado y suspendido rotando a lo largo de la órbita equilibrada y exhibe una velocidad de sedimentación mucho menor. Tras la sedimentación hacia el fondo, los embriones entran en dicha capa límite mientras el tejido permanece sustancialmente fuera de la capa límite por motivos que se elaboran más adelante. Tras entrar en la capa límite, la velocidad de rotación de los embriones se ralentizará sustancialmente. No obstante, la fuerza de presión hacia dentro permanece sustancialmente igual. Por tanto, para los embriones dentro de la capa límite (20), la fuerza de presión hacia dentro pasa a dominar a la fuerza centrífuga, empujando los embriones hacia el centro; en consecuencia, los embriones son empujados hacia la región axial de la pared inferior (6) y hacia el interior del conducto (7) una vez que han alcanzado la capa límite. Los embriones pueden recogerse del conducto (7) usando un medio de recolección, por ejemplo recogiendo fluido que sale del conducto (7) (véase una descripción más detallada del medio de recolección más adelante).

El tejido que tiene una proporción entre la superficie y el volumen mayor que el embrión está sometido a mayor arrastre y, por tanto, es sustancialmente más susceptible a quedar atrapado en el flujo de rotación primario que el embrión. Cuando el tejido se acerca a la capa límite en el fondo del contenedor, es fácilmente arrastrado de nuevo al flujo de rotación debido al mayor arrastre.

Una característica principal de la invención es la creación de la capa límite fina sobre la superficie de la pared inferior (6) debajo de un fluido en rotación axisimétrica de modo que los embriones pueden sedimentar y entrar en la capa límite mientras el tejido que tiene un arrastre mayor no puede entrar en la capa límite por el atrapamiento repetido en el flujo de rotación primario. La (i) segregación de los embriones del tejido en la capa límite debido al arrastre diferencial y (ii) el desequilibrio de la fuerza de presión respecto a la fuerza centrífuga dentro de la capa límite son características importantes que, en combinación, proporcionan un medio único y eficaz para segregar y separar rápidamente los embriones del tejido. Además, (iii) la presencia de un vórtex colector puede ser una característica útil de la invención, como se elabora más adelante. El uso de este efecto combinado es una característica que distingue claramente el dispositivo de la invención de dispositivos conocidos, tales como hidroclones o limpiadores de ciclona.

Consideraciones de dinámica de flujo con respecto al procedimiento y al dispositivo para separar embriones

somáticos de la masa embriogénica

La invención se basa en crear una combinación de efectos que tiene como resultado la segregación de los embriones del tejido embriogénico inmaduro. Dichos efectos comprenden:

- 5 a) crear una capa límite viscosa en la pared inferior (6), que se consigue induciendo un flujo de rotación axisimétrico en el fluido (en relación con la pared inferior (6)), usando un medio de rotación (18);
- 10 b) dirigir únicamente los embriones para que entren en dicha capa límite viscosa, que se consigue porque el tejido tiene una velocidad de sedimentación mucho más lenta y un arrastre mucho más alto;
- c) crear un gradiente de presión radial en el contenedor separador (5), que se consigue mediante el efecto centrífugo de la rotación;
- 15 d) crear un vórtex colector cerca del centro de la pared inferior (6), que se consigue drenando fluido del conducto (7) durante la operación.

En consecuencia, los embriones se separarán del tejido y se dirigirán a la región axial (centro) de la pared inferior (6) y hacia el interior del conducto (7), donde pueden recogerse después usando un medio de recolección, por ejemplo, simplemente, recogiendo el fluido que sale del conducto (7). La base teórica y la practicidad de dichos efectos se tratan más adelante.

25 Cuando el medio de rotación no está activo, se puede crear un vórtex Libre (véase Definiciones) en el contenedor separador (5) drenando fluido del conducto (7). En este caso, la superficie libre del fluido estará casi equilibrada a excepción de cerca del centro, donde la superficie del fluido se dobla abruptamente hacia abajo. El flujo de absorción crea un vórtex libre a lo largo del contenedor separador (5) y forma una capa límite de absorción en la superficie del fondo. Las partículas de fluido fuera de la capa límite de absorción se mueven a lo largo de una trayectoria casi circular creada por un equilibrio de la fuerza centrífuga en dirección hacia fuera sobre dichas partículas de fluido y la fuerza de dirección hacia dentro debida al gradiente de presión radial en el flujo en el contenedor separador (5). Las partículas de fluido dentro de la capa límite de absorción rotan a una velocidad de rotación relativamente menor que las partículas de fluido fuera de la capa límite de absorción, por lo que las partículas de fluido dentro de la capa límite de absorción entran en la absorción debido a la falta de suficiente fuerza centrífuga para mantener dichas partículas de fluido en una trayectoria casi circular en comparación con las partículas de fluido fuera de la capa límite de absorción. La fuerza hacia dentro debido al gradiente de presiones gana a la fuerza centrífuga hacia fuera.

30

35

El vórtex de absorción es muy eficiente en la captura y drenaje de las partículas que están cerca del centro, ya que la velocidad angular aumenta rápidamente a medida que la partícula se mueve hacia el centro. No obstante, en un vórtex de absorción, las partículas de fluido que no están cerca del centro experimentan un vórtex de movimiento lento con velocidad angular decreciente. Recuérdese, fuera de la singularidad en el centro, la velocidad angular (o tangencial), definida como v_{θ} , en un vórtex de succión disminuye casi como $1/r$, donde r es el radio desde el eje central (10). Por tanto, el flujo se mueve muy despacio a medida que se aleja del centro. Este lento movimiento permite que los embriones y el tejido embriogénico sedimenten en la capa límite de absorción y se drenen hacia el conducto (7) juntos.

40

45

Una clave de la presente invención es crear un estado de flujo para separar los embriones del tejido embriogénico inmaduro antes de que entren en el conducto (7).

Combinación de vórtice libre y forzado

50 Esto se puede conseguir combinando los efectos corriente arriba de un vórtice libre con los efectos de un vórtex forzado en un contenedor separador (5) cargado de fluido mediante:

- 55 a) creación de un vórtex libre drenando fluido del conducto (7); y, simultáneamente
- b) creación de un vórtex forzado induciendo flujo de rotación axisimétrico en el fluido usando un medio de rotación (18).

60 Los fenómenos clave que surgen de la combinación del vórtex forzado y del vórtex libre se explican en los párrafos siguientes.

En esencia, ciertas realizaciones de la invención aprovechan la ventaja de la característica común de los dos flujos de vórtex, que es la formación de una capa límite viscosa relativamente fina en la pared inferior (6) del contenedor separador (5).

65

La tensión de cizalladura ejercida sobre el líquido por el medio de rotación (18) crea un vórtex forzado superpuesto

al vórtex libre del flujo de absorción. Recuérdese que en el vórtex forzado, en el que el fluido rota casi en rotación de cuerpo sólido, la vorticidad ζ_z es constante y la velocidad angular viene dada por $v_\theta = 0,5r\zeta_z$. Por tanto, la velocidad angular aumenta linealmente con r a medida que se aleja del centro. Cerca del centro, el flujo está dirigido en gran medida por el vórtex libre del flujo de absorción, cuando está lejos del centro, el flujo está dirigido principalmente por el vórtex forzado creando la situación ideal para controlar el movimiento de los embriones y el tejido embriogénico inmaduro de un modo deseado. El fluido que rota alrededor del eje central (10) con una aceleración centrípeta en la dirección $-r$ siente una fuerza centrífuga (reactiva) en la dirección $+r$. Si dicha fuerza centrífuga se equilibra con el

gradiente de presión radial positiva, definida por $\frac{\partial p}{\partial r}$ que ejerce una fuerza sobre la partícula hacia el centro de rotación (es decir, en la dirección $-r$), entonces una partícula flotante rotará alrededor del eje central (10) de forma indefinida en una trayectoria circular.

Dado que los embriones y el material de tejido embriogénico inmaduro tienen una densidad superior a la del medio fluido usado (p. ej., agua), tras la introducción en el contenedor separador (5), generalmente se mueven hacia fuera en el campo de flujo con velocidad angular creciente en el ahora flujo de vórtex forzado. El tejido embriogénico inmaduro que tiene una fuerza de arrastre de fluido relativamente mayor en comparación con los embriones, queda más atrapado en el fluido en rotación que los embriones. Por tanto, los embriones siguen una trayectoria espiral alrededor del contenedor separador y gradualmente hacia la pared inferior (6), mientras que el tejido embriogénico inmaduro también toma una trayectoria espiral pero con una velocidad de sedimentación mucho más lenta. Dado que el tejido embriogénico tiene una proporción área de superficie-volumen relativamente mayor, no entrará en la capa límite fina ya que queda atrapado fácilmente en el flujo de rotación primario. De hecho, los embriones entran en la capa límite viscosa en el fondo en un tiempo relativamente corto; un orden de segundos o menos, en la que el tejido embriogénico inmaduro continua y vuelve a quedar atrapado en el flujo primario por su mayor proporción área de superficie:volumen.

Una vez que los embriones están dentro de la capa límite, su velocidad angular se reduce sustancialmente, mientras que el gradiente de presión radial sigue sustancialmente igual, lo que fuerza a los embriones hacia dentro y al centro y hacia la región del vórtex colector. Una vez en la región del vórtex colector, se pueden recoger los embriones, por ejemplo en el fluido que entra en el conducto (7).

Vórtex forzado con vórtex libre cero o insignificante

Como se ha indicado anteriormente, se puede usar una combinación de vórtex libre y forzado para crear condiciones de flujo para separar embriones de masa embriogénica. Existe una relación inversa entre la velocidad de drenaje del líquido a través del conducto (7) y la pureza conseguida. Por "pureza", en este contexto, se quiere decir la eficacia de separación del tejido embriogénico inmaduro de los embriones; la pureza más elevada significa menos masa embriogénica por embrión.

Cuanto menor es la velocidad de drenaje del líquido a través del conducto (7) (decreciente e incluido el flujo cero), mayor es la pureza conseguida.

En ausencia de un vórtex colector, el proceso físico debido a la rotación del fluido dentro del contenedor separador (5), es decir la formación de la capa límite en la placa inferior (6), y la presión de atrapamiento y hacia dentro de los embriones para migrar hacia el centro axial del contenedor separador (5) dentro de la capa límite en la placa inferior (6) permanecen exactamente iguales.

La diferencia de eliminar el vórtex colector (con drenaje de líquido cero o casi cero) es que los embriones no entran en el conducto (7) mediante una combinación de convección de fluidos y sedimentación por gravedad, sino solo mediante sedimentación por gravedad.

En otras palabras, los mecanismos indicados anteriormente forzarán a los embriones hacia la región axial de la placa inferior (6). Una vez que los embriones alcanzan el centro axial de la placa inferior (6), donde la velocidad angular (azimutal) y radial del fluido es esencialmente cero, si la velocidad de drenaje y la velocidad axial son también cero, el punto central es solo un punto de "estancamiento" y el embrión tendrá tiempo suficiente en el centro para sedimentarse en el conducto (7). Una vez dentro del conducto (7), el embrión sedimentará gradualmente (p. ej., ~10 cm por segundo para los embriones usados en los experimentos).

No obstante, la velocidad de separación se ralentiza con velocidades menores de drenaje de líquido a través del conducto (7). Por tanto, en aplicaciones que requieren una velocidad de separación alta, la combinación de vórtex libre y vórtex forzado puede preferirse.

Capa límite viscosa

Una característica de gran interés es la capa límite viscosa axialmente simétrica que se forma en la pared inferior (6) del contenedor separador (5). La capa límite viscosa hace referencia a una capa de fluido de la superficie de la pared inferior (6) a $z=0$ a la región designada por el borde de la capa límite (20) a $z = \delta$ donde la velocidad del fluido

se convierte en sustancialmente la misma que el vórtex forzado. En este flujo, el espesor de la capa límite depende sustancialmente de la viscosidad cinemática del fluido y la velocidad de rotación del medio de rotación (18).

5 Se puede obtener una buena aproximación al flujo de la capa límite en el fondo del contenedor separador (5) considerando el momento de conservación para flujo de fluido viscoso newtoniano (ecuaciones de Navier-Stokes) para rotación de cuerpo sólido axisimétrico del fluido por encima de una placa plana estacionaria. La solución a dicho flujo se proporciona en la literatura de mecánica de fluidos (p. ej., Schlichting, Boundary Layer Theory, McGraw Hill Series en Mechanical Engineering, 1979) y no se reproducirá en el presente documento. Los inventores usan la misma solución para proporcionar una buena aproximación al flujo dentro del contenedor separador (5) debido a la rotación del medio de rotación (18). Esta solución es válida en la capa límite en la pared inferior (6) a excepción de en el centro y el borde externo cerca de la pared sólida del contenedor separador (5). Uno de los aspectos importantes de la invención se basa en el gradiente de presiones, $\frac{\partial p}{\partial z}$ dentro de la capa límite siendo sustancialmente insignificante considerando una capa lo suficientemente fina. En otras palabras, el gradiente de presión radial dentro y fuera de la capa límite será sustancialmente el mismo, dado por $\frac{\partial p}{\partial r} = \rho r \zeta^2$ donde ζ es la velocidad de rotación del medio de fluido. Está claro que esta cantidad es positiva en todas partes en el fluido en el contenedor y, por tanto, la presión aumenta con la distancia al eje central del contenedor separador (5).

20 El incremento de la presión con el radio r tiene como resultado la formación de una variación parabólica en la altura del líquido en la superficie libre del medio fluido. Sustancialmente el mismo gradiente de presión radial existe dentro de la capa límite, lo que fuerza al fluido a alejarse de las paredes del contenedor separador (5) y hacia el eje central del contenedor separador (5). La magnitud de la presión dentro de la capa límite depende de la altura del fluido dentro del contenedor separador (5).

25 La altura del fluido dentro del contenedor durante la operación (54) deberá ser aproximadamente igual que el diámetro (51) del contenedor, preferentemente la altura es 0,6-1,4 veces el diámetro, más preferentemente 0,8-1,2 veces. Las desviaciones de la altura del fluido ideal durante la operación pueden ser tolerables pero resultarán en una operación subóptima.

30 No obstante, el gradiente de presiones y, en consecuencia, la velocidad de fluido dentro de la capa límite dependen de la variación de la altura del fluido con respecto al radio y no de la cantidad de líquido dentro del contenedor separador (5). A medida que aumenta la velocidad de rotación, el gradiente de presiones aumenta y la velocidad hacia dentro del fluido y los embriones atrapados en la capa límite hacia el centro aumentan. No obstante, el espesor de la capa límite, dado por $\delta = 8\sqrt{\nu/\zeta}$ disminuye con el incremento de la velocidad de rotación hasta un punto en el que el espesor es menor del tamaño de un embrión. La eficiencia de la invención para separar los embriones del tejido embriogénico inmaduro depende de varios parámetros que se tratarán más adelante. Un parámetro clave es la velocidad con la que los embriones pueden ser dirigidos a la región axial de la pared inferior (6), donde se pueden recolectar.

Algunos de los parámetros importantes a este respecto es el espesor de la capa límite, δ , el componente radial de la velocidad, $\frac{v_\theta}{v_r}$, la proporción entre la velocidad angular y la velocidad radial, $\frac{v_\theta}{v_r}$ así como la velocidad axial, v_r . En el presente documento, los inventores proporcionarán algunos valores cuantitativos para cada uno de estos parámetros en base a la velocidad de rotación y la posición radial. Aunque esta información se puede proporcionar en una forma general dando las cantidades escaladas adecuadamente en base a las variables de similitud en las ecuaciones de la capa límite, para el fin de proporcionar un ejemplo específico para una realización preferida en esta sección, los inventores proporcionarán los resultados en forma dimensional y en base a dispositivos preferidos específicos. En base a las enseñanzas contenidas en el presente documento, el experto podrá construir un dispositivo separador funcional con parámetros optimizados para el tipo específico de embrión que se va a separar, así como otras consideraciones relevantes.

50 *Efectos de la velocidad de rotación*

El contenedor separador que se usa como realización ejemplo no limitante tiene un diámetro de 200 mm (51) y la altura del líquido de ejemplo es 200 mm (54). Usando este contenedor separador de ejemplo, los inventores ilustrarán el efecto de la velocidad de rotación del fluido, en las unidades de rotación por minuto (rpm) sobre el espesor de la capa límite y el flujo dentro de la capa límite. La tabla 3 proporciona los valores de los componentes radial, axial y angular de la velocidad del fluido y la proporción entre la velocidad radial:axial:angular dentro de la capa límite de la pared inferior (6) a $v =$ de 0 a 3 mm para una velocidad de rotación de 15 rpm en la posición radial $r = 7$ mm. El espesor de la capa límite para este caso es de 6,38 mm, donde por definición v_θ es de aproximadamente el 98 % de la velocidad angular de corriente libre de aproximadamente 110 mm/s.

60 Tabla 3. Componentes radial, axial y angular de la velocidad del fluido y la proporción entre la velocidad radial:axial y radial:angular dentro de la capa límite desde la pared inferior a $z=0$ al borde de la capa límite a $z = 6,4$ mm para una

ES 2 546 411 T3

velocidad de rotación = 15 rpm en la posición radial $r = 7$ mm.

z (mm)	v_r (mm/s)	v_z (mm/s)	$\frac{v_r}{v_z}$	v_θ (mm/s)	$\frac{v_r}{v_\theta}$
0,0	0	0,00		0,0	
0,4	0,0	0,24	-157	42,2	-0,91
0,8	-38,3	0,78	-67	80,9	-0,65
1,2	-52,6	1,38	-36	111,4	-0,44
1,6	-49,4	1,88	-19	131,1	-0,28
2,0	-36,1	2,19	-9	139,9	-0,14
2,4	-19,4	2,32	-2	139,8	-0,03
2,8	-4,0	2,29	3	133,9	0,05
2,8	7,3	2,29	3	133,9	0,05
3,2	13,5	2,42	6	125,5	0,11
3,6	15,1	2,01	8	117,0	0,13
4,0	13,3	1,84	7	110,1	0,12
4,4	9,7	1,71	6	105,7	0,09
4,8	5,5	1,62	3	103,7	0,05
5,2	1,8	1,58	1	103,4	0,02
5,6	-0,9	1,59	-1	104,8	-0,01
6,0	-2,5	1,60	-2	106,6	-0,02
6,4	-2,9	1,63	-2	108,4	-0,03

5 En la capa de 2 mm adyacente a la superficie inferior, el flujo tiene un fuerte flujo secundario hacia dentro respecto al flujo primario, como las dos proporciones de la velocidad muestran en la tabla. El componente ascendente de la velocidad es relativamente mucho menor que el componente radialmente hacia dentro y angular de la velocidad. Por tanto, los embriones una vez dentro de la capa límite se barrerán eficazmente al centro en cuestión de pocos segundos. Si los inventores aumentan sustancialmente la velocidad de rotación, la velocidad radial y las proporciones varían favorablemente, no obstante, el espesor de la capa límite también disminuirá sustancialmente, como se muestra en la tabla 4. En esta, solo la velocidad de rotación ha aumentado de 15 rpm a 120 rpm.

10 Tabla 4. Componentes radial, axial y angular de la velocidad del fluido y la proporción entre la velocidad radial:axial y radial:angular dentro de la capa límite desde la pared inferior a $z=0$ a 2,3 mm para una velocidad de rotación $\zeta=120$ rpm en la posición radial $r=7$ mm.

15

z (mm)	v_r (mm/s)	v_z (mm/s)	$\frac{v_r}{v_z}$	v_θ (mm/s)	$\frac{v_r}{v_\theta}$
0,0	0,0	0,00		0,0	
0,1	-306,7	0,69	-445	337,3	-0,91
0,3	-421,2	2,21	-190	646,9	-0,65
0,4	-395,5	3,90	-101	891,4	-0,44
0,6	-289,1	5,32	-54	1048,9	-0,28
0,7	-155,0	6,19	-25	1119,0	-0,14
0,8	-31,8	6,56	-5	1118,4	-0,03
1,0	58,3	6,49	9	1071,6	0,05
1,1	107,9	6,84	16	1003,9	0,11
1,3	120,6	5,67	21	935,9	0,13
1,4	106,4	5,21	20	881,1	0,12

1,6	77,2	4,83	16	845,4	0,09
1,7	44,0	4,59	10	829,2	0,05
1,8	14,3	4,47	3	827,5	0,02
2,0	-7,4	4,50	-2	838,3	-0,01
2,1	-19,6	4,52	-4	852,6	-0,02
2,3	-23,6	4,61	-5	867,1	-0,03

5 La velocidad del flujo secundario hacia dentro ha aumentado sustancialmente, lo que fuerza a los embriones a alcanzar el centro de la capa límite más rápidamente. No obstante, el espesor de la capa límite ahora es solo de 2,3 mm y la región con la corriente secundaria eficaz está limitada a aproximadamente 0,8 mm por encima de la placa para el caso de 120 rpm comparado con 2,4 mm en el caso de 15 rpm.

10 Los dos ejemplos muestran que, en base al tamaño de los embriones y para las dimensiones del contenedor separador (5) específico, la velocidad de rotación se puede usar como parámetro control para ajustar el espesor de la capa límite y optimizar la eficiencia en la separación y transferencia de los embriones en la región axial de la pared inferior (6).

Consideraciones del vórtex colector

15 Se puede generar un vórtex colector en el contenedor separador (5) frenando el fluido a través del conducto (7) cuando el área del conducto (7) en la región axial de la pared inferior (6) del contenedor separador (5) es mucho menor que el área de la pared inferior (6) del contenedor separador (5). Un medio alternativo de crear un vórtex colector es mediante extensión de un tubo de succión desde la parte superior al centro de la pared inferior (6) del contenedor separador (5). Sin pérdida de generalidad, y por motivos de claridad en la explicación, los inventores limitarán nuestra explicación al caso en el que el conducto (7) es una perforación redonda con un diámetro mucho menor que el diámetro de la pared inferior (6) situada en el centro de la pared inferior (6). En este caso, el flujo que sale a través del conducto (7) toma un movimiento de rotación secundario formando un flujo de vórtex libre. Cuando el diámetro del conducto (7) es menor del 10 % del diámetro de la pared inferior (6), el efecto del límite vertical se puede desechar y el vórtex colector se forma libremente. Las características del vórtex colector son una depresión abrupta en la superficie libre del líquido (22) y la formación de una capa límite de absorción (20) en la parte inferior del contenedor separador (5) alrededor del conducto (7).

30 El flujo secundario asociado con un vórtex colector en el contenedor separador (5) se ilustra en la figura 8. Obsérvese que el flujo primario es el flujo de rotación alrededor del eje central no mostrado en esta figura. La porción del flujo secundario que permanece fuera de la capa límite no entra en el conducto (7) en la pared inferior (6). Esto se puede ilustrar mediante el ejemplo siguiente: Si se inserta una aguja larga fijada a una jeringuilla en el flujo, siempre que la punta de la aguja esté fuera de la capa límite, un colorante inyectado con la aguja continuará rotando alrededor del eje central y algo de colorante seguirá la trayectoria del flujo secundario mostrado en la figura 8. Solo la punta de la aguja se sujeta muy cerca de la superficie inferior si el colorante entra en el orificio inferior con el fluido de drenaje. Por tanto, solo el fluido y cualquier objeto que entre en la capa límite entrarán en el orificio.

35 Dado que el tejido embriogénico dispersado tiene un arrastre medio grande por la proporción área de superficie-volumen, no entrará en la capa límite fina ya que queda atrapado rápidamente en el flujo secundario fuera de la capa límite. No obstante, los embriones entrarán en la capa límite y seguirán el movimiento hacia dentro del fluido en el conducto (7). Esta combinación del movimiento secundario del fluido y la capa límite que crea un modo rápido y fácil para separar los embriones del tejido embriogénico en una corriente separada de líquido que sale del contenedor separador (5) a través del conducto (7).

Contenedor separador (5)

45 El dispositivo de la invención comprende un contenedor separador (5) que está cargado de fluido durante la operación. Idealmente, el contenedor separador (5) es de forma cilíndrica y tiene una pared inferior plana (6). También idealmente, el eje (10) del cilindro es vertical y el fondo plano es perpendicular al eje. Aunque las desviaciones de los parámetros ideales tienen como resultado menos operación óptima, el dispositivo se puede accionar con un cierto nivel de desviaciones con respecto a la geometría inicial. Las tolerancias variarán de un caso a otro.

Preferentemente, el contenedor separador (5) es axialmente simétrico. Cualquier desviación de la simetría axial tendrá como resultado alteraciones en el flujo y, en consecuencia, una menor eficiencia de la separación.

55 El ángulo de la superficie del fondo plano es también importante para una separación eficiente de los embriones. Se prefiere una pared inferior plana (6) perpendicular al eje (10 o z) del contenedor separador (5).

Si el ángulo de la pared inferior (6) es positivo (ascendente), entonces los embriones tienen que viajar axialmente hacia arriba (z aumenta) y radialmente hacia dentro (r disminuye) a través de la capa límite. Esto reduce la eficiencia de la separación porque el embrión es más pesado que el fluido y tiende a sedimentar en lugar de a ascender.

- 5 Si el ángulo de la superficie inferior plana es negativo (descendente), esto afectará adversamente al gradiente de presiones dentro de la capa límite. Es decir, el gradiente de presión radial positiva que está forzando a los embriones hacia dentro de la capa límite hacia el centro reducirá la magnitud que ejerce menos fuerza hacia dentro sobre el embrión. El ángulo al cual el gradiente de presión radial se ve tan adversamente afectado que no tiene ningún impacto sobre los embriones depende de la velocidad de rotación y de las características de la capa límite. En general, suponiendo una rotación del cuerpo sólido del fluido con velocidad angular en un contenedor separador (5)

$$\frac{dz}{dr} = \frac{r_s^2}{g}$$

- abierto, si la pendiente descendente de la superficie inferior plana en cada punto es tal que $\frac{dz}{dr} = \frac{r_s^2}{g}$, donde g es la gravedad, entonces el gradiente de presiones a lo largo de la superficie inferior será muy pequeño en toda la superficie a excepción de cerca del conducto (7) en los casos en los que existe vórtex colector. Este caso será una geometría muy ineficiente para separar embriones. Si la pendiente es incluso mayor, es decir la pared inferior (6) está en un ángulo descendente negativo mayor, habrá un gradiente de presiones adverso a lo largo de la superficie.

- El contenedor separador (5) comprende un conducto de fluido (7) localizado en la región axial de la pared inferior (6). Preferentemente, el conducto de fluido (7) comprende una perforación de la pared inferior (6) localizada en la región axial (preferentemente en el centro) del contenedor separador (5). El conducto (7) puede también comprender un tubo extendido desde la parte superior del contenedor separador (5) a la región axial, preferentemente el centro, de la pared inferior (6). El conducto (7) puede también comprender un tubo extendido a la región axial, preferentemente el centro, de la pared inferior (6) desde cualquier otra dirección.

- La proporción del área del conducto (7) y la pared inferior (6) del contenedor es importante. El área del conducto (7) debería ser relativamente pequeña (preferentemente menor del 10 % del área de la pared inferior (6)).

- El contenedor puede comprender, opcionalmente, una segunda salida de fluido (25) cerca de la parte superior del contenedor separador (5). La segunda salida (25) puede estar implementada por el contenedor separador (5) que no tiene una pared superior, de modo que el exceso de fluido puede salir del contenedor separador (5) por rebosamiento.

- El contenedor separador (5) puede también comprender, opcionalmente, una tercera salida de fluido (16) en la parte inferior del contenedor separador (5) para drenar fluido fuera del contenedor separador (5).

- Las dimensiones del contenedor separador (5) pueden variar en realizaciones específicas y, como se ha tratado anteriormente, la velocidad de rotación del fluido puede usarse como parámetro de control ajustable de forma conveniente que no requiere modificaciones físicas del dispositivo.

Medio de inducir flujo de rotación axisimétrico en el contenedor separador (5)

- Los términos medios de inducir flujo de rotación axisimétrico en el contenedor separador (5), medios de rotación o dispositivo de rotación se usan de forma intercambiable a lo largo de la presente divulgación.

- El medio de rotación (18) es un objeto en rotación colocado dentro del contenedor, que rota en el líquido. El objeto puede estar conectado a un motor (12) a través de un eje (11). El objeto puede también estar inducido para rotar mediante la aplicación de campos magnéticos desde fuera del contenedor separador (5).

- Cuando un objeto sólido que está sumergido en el medio líquido está rotando, las partículas de líquido inmediatamente adyacentes a la superficie sólida del objeto se pegan a la superficie (denominado sin deslizamiento en mecánica de fluidos) y rotan con la superficie. Las partículas de fluido en la superficie ejercen una fuerza de fricción (más exactamente, tensión de cizalladura) sobre las partículas de fluido adyacentes que, a su vez, se propagan más allá de la superficie y en el interior del cuerpo fluido. Dicha tensión de cizalladura del fluido fuerza, a su vez, un movimiento de rotación de todo el fluido dentro del contenedor separador (5). Dado el tiempo suficiente, el movimiento del fluido toma una rotación de cuerpo sustancialmente sólida, a excepción de cerca de los límites sólidos externos y la pared inferior (6) del contenedor separador (5) y en las proximidades del eje central (10), como se ha tratado anteriormente.

- Preferentemente, el objeto en rotación ejerce su efecto sobre el fluido principalmente a través de tensión de cizalladura como se ha descrito anteriormente, lo que tiene como resultado mínimos vórtices adicionales más allá de los deseados. Por tanto, dicho objeto en rotación tiene, preferentemente, forma de disco (18b) o de cilindro (18a).

Medio de drenar fluido de la región axial de la pared inferior (6) durante la operación

- El dispositivo puede comprender medios para drenar fluido a través del conducto de fluido (7) en la pared inferior (6)

del contenedor separador (5). El medio de drenar fluido puede comprender simplemente proporcionar al fluido en el contenedor separador (5) una oportunidad de fluir a través del conducto (7) por gravedad, pero también se puede implementar usando una bomba. Preferentemente, el medio es controlable, por ejemplo estando equipado con una válvula (36) o usando una bomba controlable. En el presente documento, por drenar se quiere decir cualquier modo de extracción de fluido a través del conducto (7) del contenedor separador (5), ya sea por gravedad o por gradiente de presiones, una bomba u otro medio.

Medio de recolección de los embriones separados

Los medios de recolección de los embriones separados pueden comprender que el conducto (7) esté colocado y dimensionado de forma tal que los embriones que son arrastrados a la región axial de la pared inferior (6) durante la operación entran en el conducto (7) por sedimentación por gravedad. Preferentemente, los medios anteriores de recolección de embriones comprenden además medios de recolección de embriones del conducto (7) sin alterar sustancialmente el volumen de fluido en el contenedor. Dichos medios tienen la ventaja de eliminar el vórtex colector en las aplicaciones en las que se desea máxima pureza. Ejemplos de los medios anteriores de recolección incluyen una válvula accionada por rotación dispuesta de un modo tal que los embriones se pueden sedimentar en la válvula tras la rotación del conmutador de la válvula. Siempre que todos los conductos alrededor de la válvula con conmutador estén cargados de fluido, no se produce un flujo neto por la recolección de los embriones.

Otro ejemplo comprende una primera y una segunda válvula dispuestas de un modo tal que

i) cuando la primera válvula se abre y la segunda se cierra, los embriones pueden sedimentar en el conducto (7) hacia la segunda válvula;

ii) cuando la primera válvula se cierra y la segunda se abre, los embriones pueden sedimentar adicionalmente en el conducto (7) más allá de la segunda válvula;

Dicha disposición también permite la recolección de embriones del conducto (7) sin ningún flujo volumétrico.

Otro ejemplo preferido de un medio de recolección de embriones comprende proporcionar una intersección en el tubo (que tenga al menos primera, segunda y tercera conexiones) con el conducto (7) dispuesto como se especifica más adelante (véase la figura 7 A para una ilustración de un ejemplo de realización).

La tercera conexión comprende una salida para el fluido.

El conducto (7) está fijado a la segunda conexión. La intersección comprende una superficie inferior dispuesta de un modo tal que los embriones que sedimentan en el conducto (7) sedimentarán preferentemente en la superficie inferior a través de la segunda conexión.

Además, el medio de recolección de embriones comprende medios de proporcionar flujo de fluido desde la primera conexión de la intersección, de modo que los embriones sedimentados en la superficie inferior de la intersección son barridos hacia la tercera conexión, desde la que se pueden recolectar fácilmente en el flujo de salida.

El medio de proporcionar flujo de fluido proporciona, preferentemente, (durante la operación), flujo de fluido ajustado de un modo tal que la presión del flujo de fluido proporciona una presión de fluido en la intersección que contrarreste la presión en el conducto (7). Preferentemente, el flujo de fluido se ajusta de un modo tal que hay un flujo neto cero o esencialmente cero en el conducto (7). En algunos casos puede ser preferible que el flujo de fluido se ajuste de un modo tal que exista un flujo neto en el conducto (7) en la dirección del contenedor separador (5). No obstante, en dichos casos, el flujo neto en el conducto (7) no debería ser demasiado grande como para inducir un arrastre hacia arriba en los embriones que sedimentan tal que la sedimentación se detiene.

Tener un flujo neto en el conducto (7) hacia el contenedor separador (5) tiene la ventaja de que es posible devolver de nuevo al contenedor separador (5) cualquier masa embriogénica inmadura que pudiera haber entrado en el conducto (7). Recuérdese que la masa embriogénica inmadura exhibe mayor arrastre y su sedimentación es, por tanto, más fácilmente contrarrestada que la sedimentación de los embriones.

Por otro lado, puede ser preferible ajustar el flujo del fluido desde la primera conexión de un modo tal que se produzca un flujo neto del contenedor separador (5) en el conducto (7), si se desea acelerar el proceso de separación a expensas de la pureza.

El experto apreciará que el ajuste el flujo del fluido para proporcionar un flujo adecuado en el conducto (7) se puede implementar en un gran número de modos equivalentes. Los parámetros que se pueden ajustar incluyen la altura de la columna del fluido en el conducto (7) y el contenedor separador (5), el caudal de la primera conexión y el caudal a través de la tercera conexión.

El medio de recolección de los embriones separados también se puede implementar arrastrando el fluido a través

del conducto (7) y recogiendo el fluido que sale del conducto (7). Como alternativa, la succión de una salida de fluido opcional aparte se puede usar para arrastrar y recolectar los embriones de la región axial de la pared inferior (6). En realizaciones en las que la operación incluya arrastrar el fluido a través del conducto (7), es preferible que el medio de recolección de los embriones separados comprenda medios de recolección selectiva de una fracción del fluido que sale del conducto (7). Dicho medio de recolección de fracciones puede controlarse manualmente o controlarse automáticamente, por ejemplo, simplemente cronometrando el tiempo.

El medio de recolección puede también comprender un sensor (8) que detecte la presencia o ausencia de un embrión en el fluido que sale del conducto (7). El sensor (8) puede comprender un fotosensor. Los fotosensores para usar con la invención pueden ser, en principio, cualquiera de los muchos fotosensores conocidos en la técnica adecuados para el fin. Ejemplos de sensores adecuados incluyen, pero no se limitan a, los basados en uno o más haces ópticos, incluidos haces láser, sensores de inducción, sensores sónicos, incluidos sensores ultrasónicos. Los datos obtenidos con el sensor (8) pueden usarse para dirigir los medios de recolección de fracciones para recolectar de forma selectiva una fracción del fluido de salida que contiene una concentración predeterminada de embriones.

Medios de alimentar los embriones suspendidos en fluido y el tejido embriogénico inmaduro en el contenedor separador (5)

Los embriones suspendidos en fluido y el tejido embriogénico inmaduro se pueden alimentar en el contenedor separador (5) bien de forma intermitente (discontinua) o continuamente. Las características de cada forma de operar se divulgan por separado más adelante.

Preferentemente, el medio de introducción es un conducto de alimentación (9) adecuado para liberar el embrión y el tejido suspendido en fluido, preferentemente, en la región axial del contenedor separador (5) y, preferentemente, cerca de la superficie del fluido. El lugar de introducción no es muy importante, siempre que el lugar de introducción se localice a al menos algo de distancia de la pared inferior (6) para permitir suficiente distancia para separar los embriones del tejido. El medio de introducción puede integrarse en un eje del medio de rotación (18), por ejemplo, se puede usar un eje hueco (11) como conducto de alimentación (9) para alimentar los embriones y el tejido.

Dispositivo separador y procedimientos adaptados para operación discontinua

En muchos casos, los racimos embriogénicos que se están procesando se tienen que alimentar en una etapa de dispersión discontinua desde una placa Petri o un biorreactor. Para un dispositivo separador localizado corriente abajo de la unidad dispersora, esto tendrá como resultado una entrada de flujo de embriones no homogénea. En este caso, el medio líquido portador de los embriones dispersados y del tejido embriogénico inmaduro será rico en embriones durante un corto periodo de tiempo (denominado periodo "Rico") y, después, estará deplecionado de embriones durante un periodo de tiempo. Durante el periodo entre la separación de un lote de embriones y antes de la introducción del lote posterior y antes de la introducción del lote posterior (p. ej., durante los intercambios de la fuente para los racimos embriogénicos que se están procesando), habrá muy pocos o ningún embrión presente en el contenedor separador (5) (denominado periodo de "depleción"), Dado que es beneficioso minimizar la cantidad de tejido embriogénico inmaduro dentro del contenedor separador (5), durante el periodo de depleción, preferentemente, el medio fluido en el contenedor separador puede sustituirse. Por tanto, un dispositivo de la invención adaptado para operación discontinua comprende, preferentemente, medios de sustituir el fluido en el contenedor separador (5).

El dispositivo puede comprender, opcionalmente, un sensor (8) para controlar el fluido que sale del medio de recolección de embriones. El sensor (8) se puede usar para controlar el transporte de los embriones y detectar la aparición de una corriente deplecionada. Una vez que el sensor (8) ya no detecta embriones durante un periodo de tiempo designado, puede ser señal de inicio del periodo de depleción, que hace que el medio de sustitución del fluido en el contenedor separador (5) realice una operación de sustitución de fluido.

El desencadenante de una operación de sustitución de fluido también se puede realizar manualmente o fijando la sustitución de fluido para que se produzca en un periodo de tiempo predeterminado tras la introducción del último lote de embriones.

La operación de sustitución de fluido se puede realizar de diversos modos. Los ejemplos siguientes no deben interpretarse como limitantes de ningún modo y las características encontradas en los diferentes ejemplos se pueden combinar libremente.

Por ejemplo, se puede inyectar medio puro en el contenedor separador (5), a través del medio de introducción de embriones suspendidos en fluido. Una válvula opcional (36) se puede usar para bloquear cualquier flujo a través del conducto (7) en la pared inferior (6), de modo que el fluido rebose a través de la segunda salida (25), reemplazando de este modo rápidamente el contenido del contenedor por medio puro.

Como alternativa, el dispositivo puede comprender, opcionalmente, una tercera salida (30) en el fondo extremo del contenedor separador (5) equipado con una segunda válvula (37), opcionalmente acoplada operativamente con la

primera válvula (36) en el conducto (7) en la pared inferior (6). Durante la operación de sustitución de fluido, la segunda válvula (37) se abrirá y, opcionalmente, la primera válvula (36) se cerrará simultáneamente, permitiendo que el fluido salga de la tercera salida (30) y depleccionando de este modo el contenedor separador (5) del medio de fluido que contiene material de tejido embriogénico inmaduro.

5 En otra alternativa más, el medio de sustitución del fluido comprende un tubo de extracción (32) fijado a un accionador lineal orientado verticalmente (35) que se bajará para extraer el líquido que contiene el tejido embriogénico inmaduro del contenedor separador (5) para extraer el fluido. Una vez que el líquido se ha extraído completamente, el tubo de extracción se puede subir con la salida (33) por encima del nivel del líquido.

10 Como alternativa, el fluido en el contenedor separador (5) puede también drenarse a través del conducto (7).

Una vez que el líquido con tejido embriogénico inmaduro se ha drenado suficientemente, se proporcionará medio fluido fresco al contenedor separador (5) para el siguiente lote de masa embriogénica que se va a procesar.

15 *Dispositivo separador y procedimiento adaptado para operación continua*

Si la fuente de los racimos embriogénicos que se están procesando es continua, el procedimiento y el dispositivo de la presente invención se pueden usar de un modo operativo continuo para la separación de embriones. El dispositivo de la invención adaptado para operación continua comprende, preferentemente, medios de sustituir de forma continua el fluido en el contenedor separador (5).

20 Preferentemente, el medio para reemplazar de forma continua el fluido en el contenedor separador (5) comprende medios de proporcionar un caudal de medio fresco al contenedor separador (5) (p. ej., a través del conducto de alimentación (9)), que es mucho mayor que el caudal del conducto (7), con un exceso de flujo que contiene el tejido embriogénico inmaduro que sale del contenedor separador (5), por ejemplo a través de la segunda salida (25) y/o a través de una tercera salida (30).

30 El factor por el cual el caudal de entrada es mayor que el caudal de salida a través del conducto (7) se puede decidir en función del nivel de eficiencia de separación deseada. El caudal de entrada relativo más alto tendrá como resultado un factor de purificación mayor. En principio, la cantidad de tejido contaminante restante mezclado en el embrión separado estará inversamente relacionada con el factor por el cual el caudal de entrada es mayor que el caudal de salida a través del conducto (7).

35 Es preferible que el caudal de entrada supere el caudal de salida a través del conducto (7) por un factor de aproximadamente 3, 5, 10, 15, 20 o más. También puede ser preferible que el caudal de entrada supere el caudal de salida por un factor en el intervalo de 1,1-1000, 2-100, 2-50, 2-20, 3-20, 5-15, 5-10 u 8-12. En ciertas realizaciones, se prefiere que el caudal de salida a través del conducto (7) sea igual a cero o sea sustancialmente cero.

40 En el caso del modo de operación continua, es preferible que los embriones se recojan de forma continua del contenedor separador (5) del conducto (7).

También son posibles otros medios continuos de recolectar los embriones.

45 *Unidad de control*

La unidad de control (38) tiene capacidades de computación y almacenamiento y se puede proporcionar como una unidad física o, como alternativa, como una pluralidad de unidades interconectadas de forma lógica. La unidad de control (38) se puede implementar de muchos modos.

50 Por ejemplo, la unidad de control (38) podría ser un ordenador personal disponible comercialmente de forma habitual o una unidad de control controlada por microprocesador adaptada específicamente.

55 Los medios de controlar otras unidades y recibir datos de otras unidades se pueden implementar de diversos modos, con cables y de forma inalámbrica. Por ejemplo, la unidad de control puede comprender una unidad de entrada-salida de convertidor de C/A capaz de producir señales eléctricas analógicas que se pueden transmitir por cables. Las señales enviadas por la unidad de control (38) podrían ser digitales, tal como mediante un puerto en serie, un puerto paralelo, un puerto USB, Firewire (IEEE1394) o señales por cables similares. Como alternativa, las señales podrían ser inalámbricas o señales acústicas, ópticas, infrarrojas o de radiofrecuencia. Por ejemplo, se podrían usar tecnologías Bluetooth o LAN para transmitir las señales de la unidad de control (38) a los componentes que se van a controlar.

60 Cabe destacar que la unidad de control (38) comprende lógica para realizar la funcionalidad del dispositivo de separación. Esta funcionalidad se puede implementar por medio de un software o programa de ordenador. La unidad de control (38) puede también comprender medios de almacenamiento o una unidad de memoria para almacenar el programa de ordenador y medios de procesamiento o una unidad de procesamiento, tal como un microprocesador,

para ejecutar el programa de ordenador. El medio de almacenamiento también puede ser un medio de almacenamiento legible separado pero conectado con la unidad de control (38). Cuando en lo anterior se describe que el dispositivo separador o el dispositivo de deposición realiza una función determinada, debe entenderse que la unidad control (38) en el dispositivo separador o el dispositivo de deposición usa el medio de procesamiento para ejecutar una parte determinada del programa que se almacena en el medio de almacenamiento.

Separador con dos o más contenedores

Dos o más dispositivos separadores como se ha descrito anteriormente pueden estar conectados en serie para conseguir una pureza de embriones más elevada. Por ejemplo, un primer dispositivo separador con un caudal de salida alto a través del conducto (7) (que tiene como resultado una velocidad alta pero una pureza baja) puede estar corriente arriba y la salida del primer dispositivo separador puede alimentarse directamente en un segundo dispositivo separador con una operación más lenta pero mayor factor de purificación. Como alternativa, un dispositivo de separación más lenta con un factor de purificación más alto se puede usar como dispositivo corriente arriba y uno más rápido corriente abajo. Las combinaciones de más de dos dispositivos separadores también son posibles y se pueden preferir para las aplicaciones en las que la pureza es de la mayor importancia.

Procedimiento para separar embriones somáticos de tejido embriogénico

La invención también se refiere a un procedimiento de segregar y separar embriones suspendidos en fluido en tejido embriogénico inmaduro. El procedimiento implica el uso de un contenedor separador (5) como se ha descrito anteriormente.

El procedimiento se basa en usar una combinación de efectos que juntos producen segregación y separación eficaces y rápidas de los embriones del tejido embriogénico inmaduro. El procedimiento comprende lo siguiente:

a) inducir un flujo de rotación axisimétrico forzado en el contenedor separador (5), descrito anteriormente, respecto a la pared inferior (6) y, opcionalmente,

(b) crear un vórtex colector en el fondo del contenedor separador (5), drenando fluido del conducto (7) en o cerca del centro de la pared inferior (6).

El flujo en rotación forzado es tal que se forma una capa límite fina en la pared inferior. Mediante el uso del vórtex colector opcional, existe una capa límite adicional (capa límite de absorción) que se forma cerca del conducto de drenaje (7) debido al vórtex colector. El procedimiento también comprende tener un gradiente de presión positiva en el contenedor separador (5). Dicho gradiente de presión se crea mediante el fluido de rotación. El procedimiento comprende el uso de las características de una capa límite formada de este modo debajo de un fluido en rotación, opcionalmente en combinación con un vórtex colector, como se elabora en el presente documento. El fluido de rotación crea un gradiente de presión positiva con una magnitud sustancialmente igual dentro y fuera de la capa límite. Fuera de la capa límite, los objetos rotan con el flujo acercándose a una órbita de equilibrio en la que la fuerza de entrada debida al gradiente de presión positiva se equilibra con la fuerza centrífuga debida a la rotación del objeto. Este equilibrio entre la fuerza centrífuga y la fuerza debida al gradiente de presión no existe dentro de la capa límite, ya que la velocidad de rotación de los objetos disminuye sustancialmente dentro de la capa límite. El procedimiento se basa adicionalmente en una diferencia clave en la característica hidrodinámica del embrión con respecto al tejido embriogénico inmaduro. La fuerza de arrastre en un embrión es sustancialmente menor que la fuerza de arrastre en tejido embriogénico inmaduro debido a la gran diferencia en la proporción superficie:volumen. Debido a esta diferencia, los embriones sedimentan y entran fácilmente en la capa límite; no obstante, el tejido embriogénico inmaduro también sedimenta pero no entra en la capa límite. En su lugar, el tejido embriogénico inmaduro sigue atrapado en el fluido de rotación primario. El embrión dentro de la capa límite es empujado inicialmente hacia el eje central por la fuerza dominante debido al gradiente de presión positiva. Al ir acercándose al centro, el embrión puede quedar atrapado rápidamente dentro del vórtex colector y se puede recoger fácilmente del mismos. Como alternativa, los embriones se recogen simplemente de la región axial de la pared inferior (6).

Por tanto, el procedimiento comprende segregar los embriones del tejido embriogénico en la capa límite (20) y también separar los embriones en una corriente de líquido sin tejido embriogénico inmaduro mediante la presencia del vórtex colector.

Preferentemente, el caudal hacia fuera del conducto (7) (del contenedor separador (5)) es cero o esencialmente cero y los embriones entran en el conducto (7) mediante sedimentación por gravedad. Puede ser preferible inducir un flujo de entrada en el conducto (7), ya que puede mejorar adicionalmente la pureza alejando la masa embriogénica del conducto (7). No obstante, la fuerza de arrastre hacia arriba en el embrión debido a la velocidad hacia dentro del líquido en el conducto (7) no deberá superar el peso del embrión menos el peso del líquido desplazado por el embrión (efecto de flotación); en caso contrario, el embrión se moverá hacia dentro en el conducto (7).

Procedimiento adaptado para operación discontinua

El procedimiento puede estar adaptado para operar de forma discontinua, en cuyo caso comprende además recolectar los embriones recolectando de forma selectiva los embriones de la región axial de la pared inferior (6) durante un periodo de tiempo después de la introducción y tras la sedimentación de los embriones, pero antes de que el tejido embriogénico inmaduro haya tenido tiempo de sedimentar. Preferentemente, el procedimiento discontinuo también comprende la etapa de sustituir el medio fluido en el contenedor separador (5) antes de la introducción en el lote posterior.

Procedimiento adaptado para operación continua

El procedimiento se puede adaptar para operación continua, en cuyo caso comprende además usar un contenedor separador (5) con una segunda salida (25) en la parte superior del contenedor separador (5), alimentar fluido en el contenedor separador (5) a una velocidad que supera la velocidad del flujo de fluido del conducto (7). Preferentemente, los embriones se recogen del conducto, preferentemente en el fluido que sale del conducto (7).

3. Unidad de orientación y clasificación

Se proporciona una descripción detallada del procedimiento y dispositivo para detectar, clasificar y orientar para la deposición de embriones maduros en la orientación correcta en un sustrato adecuado en la solicitud de patente PCT/US09/39982.

La unidad de orientación y clasificación divulgada en el documento PCT/US09/39982 es útil en combinación con los medios de dispersador y separador en el sistema automático de la presente invención. El documento PCT/US09/39982 proporciona un aparato para la detección y orientación automática de embriones vegetales, tales como embriones somáticos vegetales. También se proporciona un aparato que tiene la capacidad adicional de clasificar embriones aceptables de otros objetos.

El aparato del documento PCT/US09/39982 para la orientación automática de embriones vegetales suspendidos en un líquido que fluye a través del aparato comprende:

a) canales de flujo para el líquido que comprende una entrada para el líquido (501) de un tubo de entrada (502), salida de líquido (503) de un tubo de salida (504), tubo de deposición (505) conectado a un dispositivo de deposición (506), comprendiendo dicho dispositivo de deposición medios para generar presión líquida positiva en relación con la presión del líquido en la salida (503), medios para acomodar el líquido que entra así como medios para proporcionar líquido para el flujo de salida, en el que el tubo de entrada (502), el tubo de salida (504) y el tubo de deposición (505) están conectados en una intersección (507) y en el que los canales de flujo están dimensionados de un modo tal que los embriones pueden viajar con el líquido que fluye a través de los canales, pero están restringidos a viajar en una orientación de la primera corona o de la última corona mediante restricciones dimensionales sin una posibilidad de cambiar la orientación viajando a través de cualquiera de dichos tubos a menos que el cambio en orientación se produzca como se divulga más adelante;

b) medios de dirección de flujo (518) que comprende medios de:

i) dirigir el flujo desde la entrada (501) a la salida (503);

ii) dirigir el flujo desde la entrada (501) al dispositivo de deposición (506); y

iii) dirigir el flujo desde el dispositivo de deposición (506) a la salida (503);

c) detector(es) que comprenden un detector de orientación (510) colocado en el tubo de entrada (502), en el que el detector de orientación (510) comprende medios de determinar la orientación de un embrión que atraviesa el tubo de entrada (502);

d) unidad de control (38) para dirigir el flujo del líquido a los canales de flujo que comprende medios de recibir la entrada del detector de orientación (510) y medios de control del medio de dirección de flujo (518) de un modo tal que:

i) en una posición predeterminada, cuando el detector de orientación (510) no detecta embriones, el medio de dirección de flujo (518) está controlado de un modo tal que el flujo del líquido en los canales de flujo está dirigido desde la entrada (501) a la salida (503);

ii) cuando el detector de orientación (510) detecta un embrión que tiene una orientación que coincide con una orientación predeterminada, el medio de dirección de flujo (518) está controlado de un modo tal que el flujo del líquido en los canales de flujo está dirigido desde la entrada (501) a la salida (503);

iii) cuando el detector de orientación (510) detecta un embrión que tiene una orientación opuesta a la orientación predeterminada, el medio de dirección de flujo (518) está controlado de un modo tal que el flujo del líquido en los

canales de flujo está dirigido desde la entrada (501) al dispositivo de deposición (506) de modo que el embrión entra en el tubo de deposición (505), tras lo cual el medio de dirección de flujo (518) está controlado de un modo tal que el flujo del líquido en los canales de flujo está dirigido desde el dispositivo de deposición (506) a la salida (503) de modo que el embrión entra en el tubo de salida (504), tras lo cual el medio de dirección de flujo (518) está controlado de un modo tal que el flujo del líquido en los canales de flujo está dirigido desde la entrada (501) a la salida (503);

de este modo, todos los embriones suspendidos en el líquido que salen de la salida (503) tendrán una orientación que coincide con la orientación predeterminada.

El aparato adicionalmente capaz de clasificar embriones aceptables de otros objetos también se divulga en el documento PCT/US09/39982, que comprende:

a) un medio de dirección de flujo (518) comprende adicionalmente medios de dirección del flujo en un receptor para embriones (340) o un destino secundario (521);

b) el detector de orientación (510) comprende adicionalmente medios de separar embriones aceptables de otros objetos;

c) la unidad de control (38) comprende medios adicionales de controlar el medio de dirección de flujo (518) de un modo tal que:

i) en una posición predeterminada, cuando el detector de orientación (510) no detecta ningún objeto, el medio de dirección de flujo (518) está controlado de un modo tal que el flujo del líquido en los canales de flujo está dirigido desde la entrada (501) a la salida (503) y el flujo de salida está dirigido al destino secundario (521);

iii) cuando el detector de orientación (510) detecta un objeto distinto a un embrión aceptable, el medio de dirección de flujo (518) está controlado de un modo tal que el flujo del líquido en los canales de flujo está dirigido desde la entrada (501) a la salida (503) y el flujo de salida está dirigido al destino secundario (521);

iv) cuando el detector de orientación (510) detecta un embrión aceptable que tiene una orientación que coincide con una orientación predeterminada, el medio de dirección de flujo (518) está controlado de un modo tal que el flujo del líquido en los canales de flujo está dirigido desde la entrada (501) a la salida (503); y el flujo de salida está dirigido al receptor de embriones (340);

iii) cuando el detector de orientación (510) detecta un embrión aceptable que tiene una orientación opuesta a la orientación predeterminada, el medio de dirección de flujo (518) está controlado de un modo tal que el flujo del líquido en los canales de flujo está dirigido desde la entrada (501) al dispositivo de deposición (506) de modo que el embrión entra en el tubo de deposición (505), tras lo cual el medio de dirección de flujo (518) está controlado de un modo tal que el flujo del líquido en los canales de flujo está dirigido al dispositivo de deposición (506) a la salida (503) de modo que el embrión entra en el tubo de salida (504), tras lo cual el medio de dirección de flujo (518) está controlado de un modo tal que el flujo del líquido en los canales de flujo está dirigido desde la entrada (501) a la salida (502) y el flujo de salida está dirigido al receptor de embriones (340);

de este modo, todos los embriones aceptables suspendidos en el líquido que sale de la salida (3) estarán dirigidos al receptor de embriones (340) y tendrán una orientación que coincide con la orientación predeterminada y de modo que otros objetos se clasifiquen en el destino secundario (521).

El aparato del documento PCT/US09/39982 puede caracterizarse más específicamente porque:

a) el medio de dirección de flujo comprende una válvula de entrada (508) colocada en el tubo de entrada (502) y una válvula de salida (509) colocada en el tubo de salida (504), en el que dichas válvulas proporcionan medios de control del flujo en los canales de flujo abriéndose y cerrándose en respuesta a señales de control;

b) la unidad de control (38) comprende medios de controlar las válvulas (508) y (509) de un modo tal que:

i) en una posición predeterminada, cuando el detector de orientación (510) no detecta embriones, la válvula de entrada (508) se abre y la válvula de salida (509) se abre, de modo que el flujo del líquido en los canales de flujo está dirigido desde la entrada (501) a la salida (503);

ii) cuando el detector de orientación (510) detecta un embrión que tiene una orientación que coincide con una orientación predeterminada, la válvula de entrada (508) permanece abierta y la válvula de salida (509) permanece abierta, de modo que el flujo del líquido en los canales de flujo sigue dirigido desde la entrada (501) a la salida (503); y

iii) cuando el detector de orientación (510) detecta un embrión aceptable que tiene una orientación opuesta a la orientación predeterminada, la válvula de entrada (508) permanece abierta y la válvula de salida (509) se cierra, de

modo que el flujo del líquido en los canales de flujo está dirigido desde la entrada (501) al dispositivo de deposición (506) de modo que el embrión entra en el tubo de deposición (505), tras lo cual la válvula de entrada (508) se cierra y la válvula de salida (509) se abre, de modo que el flujo del líquido en los canales de flujo está dirigido desde la deposición (506) a la salida (503) de modo que el embrión entra en el tubo de salida (504), tras lo cual la válvula de entrada (508) se abre y la válvula de salida (509) permanece abierta, de modo que el flujo del líquido en los canales de flujo de nuevo es dirigido desde la entrada (501) a la salida (503) como en la posición predeterminada;

de este modo, todos los embriones suspendidos en el líquido que salen de la salida (503) tendrán una orientación que coincide con la orientación predeterminada.

El aparato del documento PCT/US09/39982 puede comprender específicamente uno o más de los siguientes:

(a) un detector del tubo de deposición adicional (511) que comprende medios de detección de la presencia o ausencia de un embrión en un tubo de deposición (505), en cuyo caso la unidad de control (38) comprende medios de recibir entradas desde el detector del tubo de deposición (311) para determinar cuándo un embrión ha entrado en el tubo de deposición (505) esperando que el detector del tubo de deposición (511) detecte la presencia y la ubicación de un embrión en el tubo de deposición (505); y/o

(b) un detector del tubo de salida adicional (12) que comprende medios de detección de la presencia o ausencia de un embrión en el tubo de salida (504), en cuyo caso la unidad de control (38) comprende medios de recibir entradas desde el detector del tubo de salida (512) para determinar cuándo un embrión ha entrado en el tubo de salida (504) esperando que el detector del tubo de salida (512) detecte la presencia y la ubicación de un embrión en el tubo de salida (504); y/o

Uno o más casos en los que un objeto o un embrión va a entrar en una ubicación concreta se pueden determinar mediante un periodo de tiempo predeterminado en un caudal constante del líquido que fluye a través del aparato del documento PCT/US09/39982.

El dispositivo de deposición (506) puede comprender un contenedor líquido abierto a la presión atmosférica que contiene líquido que tiene un nivel de superficie más alto respecto a la salida (503) de modo que la presión hidrostática sea suficiente para proporcionar un flujo de líquido en los canales de flujo desde el dispositivo de deposición (506) a la salida (503) cuando los medios de dirección de flujo se han fijado en consecuencia.

El dispositivo de deposición (506) puede tener, preferentemente, un área transversal horizontal mucho más grande en comparación con el área transversal del tubo de deposición (505) de forma tal que el nivel de líquido dentro de la deposición (506) sea sustancialmente constante durante la operación.

Las válvulas (508) y/o (509) pueden ser válvulas de asentamiento solenoides.

El detector de orientación (510) comprende, preferentemente, un medio de imagen digital y medios de análisis de imagen computarizada.

La unidad de orientación y clasificación divulgada en el documento PCT/US09/39982 proporciona al menos las ventajas siguientes:

-Plantar el embrión en la orientación correcta

-Costes bajos

-Orientación precisa y facilitamiento de la clasificación de los embriones viables de otros objetos

-Obtención de imágenes y caracterización de cada embrión somático es posible

-Rápido procesamiento de un gran número de embriones

- La manipulación suave de los embriones somáticos en fase líquida incrementa la velocidad de conversión de embriones maduros en embriones germinados.

- Un aparato eficiente permite un rendimiento suficiente de embriones maduros también de líneas celulares que solo producen un número limitado de embriones maduros

4. Deposición para germinación

Procedimiento de deposición de embriones para germinación mediante chorro libre

El procedimiento de deposición descrito en el presente documento se basa en la liberación de un embrión,

procesado de algún modo antes de dicha liberación, en un receptor de embriones (340) por medio de un chorro de fluido libre. El procedimiento tiene la ventaja de no requerir ninguna parte mecánica móvil, tal como cintas transportadoras o brazos robóticos.

5 Se divulga un procedimiento para depositar un embrión vegetal somático en un receptor de embriones (340), que comprende las etapas de:

i) proporcionar un embrión vegetal suspendido en fluido en una orientación deseada;

10 ii) proporcionar un receptor de embriones adecuado;

iii) opcionalmente, proporcionar medios para estabilizar el chorro libre de fluido transportador del embrión

15 iv) alimentar el embrión vegetal en el receptor de embriones (340) usando medios de un chorro libre de fluido manteniendo al mismo tiempo la orientación deseada.

El medio para estabilizar el chorro libre de fluido transportador del embrión se puede usar para contrarrestar cualquier inestabilidad del chorro de líquido que se puede producir, como se muestra que se produce en algunos casos tal como se trata más adelante.

20 Preferentemente, el procedimiento puede comprender además el uso de medios de generación de un chorro de fluido libre que tiene un canal de flujo (387) con una sección recta esencialmente lineal inmediatamente corriente arriba de la salida del medio. La sección recta (370) tiene una longitud de al menos un diámetro interno (380) del canal de flujo, pero, preferentemente, 10 veces el diámetro interno del canal de flujo.

25 *Dispositivo para depositar embriones*

El dispositivo de liberación de embriones y el receptor de embriones son capaces de transportar y sujetar el embrión, respectivamente, conservando la orientación del embrión. Aunque el medio fluido preferido portador del embrión en este caso es líquido, más preferentemente agua, otros fluidos líquidos o gaseosos, tales como aire, también están dentro del alcance de la presente invención.

30 El dispositivo de la invención comprende medios de formar un chorro libre (360) de fluido que emana de la salida (365) de un canal de flujo, en el que el chorro libre está alineado con un receptor de embriones (340) con las características que se indican más adelante.

35 La sección del canal de flujo inmediatamente corriente arriba del punto de salida (365) tiene una sección recta esencialmente lineal (370) con una longitud al menos igual a una dimensión transversal interna más grande (380), pero, preferentemente, 10 veces la dimensión transversal interna más grande del canal de flujo. La sección recta del canal de flujo (370) inmediatamente corriente arriba de la salida (365) permite que el chorro de fluido que sale de la salida sea sustancialmente unidireccional con corrientes sustancialmente paralelas sin corrientes secundarias.

40 Sin limitar las variaciones de diseño, se prefiere que la punta de salida de la boquilla (365) sea al menos una dimensión transversal interna más grande y, preferible, aproximadamente tres dimensiones transversales internas más grandes por encima de la entrada o de la superficie superior del receptor de embriones. En otras palabras, el chorro libre (360) que sale por la salida (365) tiene una longitud preferible que es de una a tres veces la dimensión transversal interna más grande. Cuando la punta de la salida (365) está más cerca que una dimensión transversal interna más grande de un tubo de la entrada del receptor de embriones, el rebosamiento de líquidos puede alterar el chorro y la liberación de embriones. Cuando la punta está más de tres dimensiones transversales internas más grandes del tubo del receptor, es más difícil mantener un chorro estable y alineado precisamente con el receptor, y el embrión puede tener suficiente tiempo para rotar y cambiar ligeramente de orientación (386) causando problemas al entrar en el receptor, como se ilustra en la figura 12.

45 En el caso de los chorros de líquido, que se prefieren en la presente invención, en función de la longitud del chorro libre y la velocidad media del chorro libre, la tensión superficial del líquido y el radio del chorro del líquido, el chorro del líquido puede ser inestable y tomar una forma contorneada (386) que podría conducir a la rotura del chorro. Este fenómeno, conocido en el campo de la inestabilidad hidrodinámica como inestabilidad de Rayleigh (véase Hydrodynamic Instability de Drazin y Reed; ISBN 0 521 28980 7, 1987), tiene como resultado una rotura del chorro de líquido libre con tiempo suficiente. Por ejemplo, en una realización preferida del dispositivo de deposición de
50 embriones, cuando la dimensión transversal interna más grande es de aproximadamente 4,2 mm (es decir, la diagonal de una sección transversal de 3x3 mm cuadrados del canal), la longitud preferida del chorro libre es de aproximadamente 12,5 mm y el diámetro hidráulico del chorro redondo es de aproximadamente 3,4 mm. Se puede mostrar, en base al análisis de estabilidad lineal, que la forma contorneada de la alteración que conduce a dicha inestabilidad y la rotura del chorro crecerá por un factor exponencial e, es decir por un factor de aproximadamente
55 2,7 veces en 2 ms. Para una velocidad del chorro de aproximadamente 0,5 m/s, el crecimiento de la alteración por un factor de 2,7 se producirá en una longitud de aproximadamente 1 mm del chorro libre. Por tanto, el chorro
60
65

después de 10 mm podría empezar a mostrar alteraciones grandes. El medio para estabilizar el chorro divulgado en el presente documento como parte del dispositivo de deposición (260) se basa en el conocimiento de la inestabilidad hidrodinámica y los parámetros que están incluidos en el crecimiento del modo de desestabilización primaria en el chorro libre.

La razón de la inestabilidad de un chorro de líquido libre es el efecto de la tensión superficial del líquido y la curvatura del chorro del líquido. Una ligera alteración que produce una deformación axisimétrica del chorro disminuye ligeramente el radio de curvatura del chorro, aumentando el efecto de la tensión superficial que, a su vez, fuerza además la disminución del radio, aumentando el efecto de la alteración que fuerza al chorro a tomar una forma contorneada que, en última instancia, rompe el chorro. Este fenómeno es claramente visible con el chorro libre que sale de la boquilla. A medida que el caudal disminuye, la inestabilidad y la rotura del líquido se acercan cada vez más a la salida del tubo (365). Para los casos en los que es necesario tener un chorro de líquido libre lento que libere el embrión en el receptor, esta inestabilidad se convierte en lo bastante grande para hacer que el embrión rote dentro del chorro de líquido libre (386) y no se deposita adecuadamente en el interior del contenedor receptor de embriones (340).

El modo principal de inestabilidad crece exponencialmente como e^{st} cuando $s = 0.34 \left(r^3 \rho / \sigma \right)^{-0.5}$, y en esta ecuación de la velocidad de crecimiento, r , ρ y σ son, respectivamente, el radio, la densidad y la tensión superficial del chorro de líquido. Si esta inestabilidad prevalece, el sistema de liberación del chorro de líquido de la presente invención no será fiable en términos de liberar de forma consistente el embrión en el contenedor y conservar la orientación del embrión.

Para chorros de liberación de líquido lenta, el chorro puede estabilizarse eliminando esencialmente la superficie libre del chorro de liberación (381), es decir la interfaz entre el líquido y el aire, encapsulando el chorro (382) dentro de otro chorro de líquido con un diámetro mayor (381). Esto, en efecto, elimina el aire que rodea al chorro de liberación (es decir, el chorro que contiene los embriones) y, de hecho, sustituye a un chorro de diámetro menor con un chorro de diámetro más grande. Como se muestra por la ecuación de la velocidad de crecimiento anteriormente, la velocidad de crecimiento de la alteración depende del radio del chorro a la potencia de $-3/2$; cuando el radio aumenta de 4,2 mm a 8,4 mm, la velocidad de crecimiento de la inestabilidad disminuye en aproximadamente un factor de 3. Esto tiene como resultado un chorro de liberación sustancialmente más estable. Dado que las inestabilidades aparecen primero en la superficie libre del chorro, en el chorro de liberación encapsulado, la capa líquida externa pasa a ser inestable saliendo primero del chorro de liberación interno sustancialmente estable lo bastante largo como para que los chorros de liberación lenta permanezcan sustancialmente estables y rectos conservando la orientación del embrión en el punto de la liberación en el contenedor del receptor de embriones.

En muchas situaciones, cuando el embrión y el chorro de liberación de embriones tienen que moverse mucho más despacio (es decir, mucho menos de 0,5 m/s), un chorro de líquido libre típico de 12 mm o más largo con un diámetro de aproximadamente 3 mm será inestable y la operación de liberación puede no conservar la orientación del embrión que se está depositando en el contenedor del receptor de embriones. Un chorro muy inestable con forma contorneada (386) puede incluso no permanecer recto suficiente para liberar el embrión dentro del contenedor. Un medio opcional para estabilizar el chorro en esta situación es encapsular el chorro de liberación (381) con un chorro de fluido externo (381) colocando el tubo de liberación (388) dentro de un tubo externo (387) con una junta sellada. Ajustando el caudal en el tubo externo (387), el chorro de liberación interno (382) será sustancialmente más estable y, por tanto, proporciona un medio más fiable de depositar el embrión en el receptor de embriones de un modo que preserve la orientación del embrión (383a).

Aunque se pueden usar diferentes líquidos como los fluidos internos y externos, se prefiere usar el mismo líquido para el fluido interno y externo con el fin de eliminar una interfaz entre el chorro de liberación (383) y el chorro de encapsulación (381). Al usar el mismo líquido, no existe tensión interfacial entre los chorros de liberación y de encapsulación.

Sin limitaciones, se prefiere que coincidan la velocidad media de los chorros de liberación y de encapsulación de un modo tal que los fluidos en cada chorro viajen sustancialmente con la misma velocidad. Cabe destacar que cualquier fluido viscoso que se mueva adyacente a una superficie sólida estacionaria tendrá una velocidad cero en la superficie sólida, el principio de no deslizamiento en la dinámica de fluidos. Por tanto, el líquido inmediatamente adyacente a las superficies sólidas internas y externas del tubo interno (388) tendrá una velocidad cero. En la salida del tubo (365), la velocidad en la interfaz entre el chorro de liberación y el chorro de encapsulación aumenta de cero justo en la salida hacia alcanzar la velocidad media del chorro libre. Con el fin de evitar crear una cizalladura extra entre los chorros de liberación y de encapsulación, se prefiere ajustar el caudal del chorro de encapsulación para tener la misma velocidad media en el chorro de encapsulación que en el chorro de liberación. En la práctica, esto se puede conseguir calculando la velocidad media en el chorro de encapsulación en base al caudal y el área transversal del chorro de encapsulación (381).

Por tanto, el dispositivo de deposición puede comprender opcionalmente medios de incrementar la estabilidad del

chorro de liberación que comprende medios de encapsular el chorro de liberación de los embriones en otro chorro con un diámetro sustancialmente más grande.

Receptor de embriones

Un receptor de embriones empleado de acuerdo con la invención puede ser un contenedor o cualquier cámara de crecimiento para recibir un embrión, tal como una semilla artificial o un contenedor de germinación, siempre que el receptor de embriones (340) se construya de un modo tal que reciba y sujete el embrión al tiempo que conserva la orientación del embrión.

En la construcción de un receptor de embriones (340), las dimensiones físicas del receptor, las propiedades del sustrato, así como suficiente capacidad de drenaje (cuando se usa líquido para depositar los embriones) son importantes.

Las dimensiones del receptor deben ser lo bastante grandes para acomodar el embrión y lo bastante pequeñas para conservar la orientación deseada. El receptor de embriones también debe tener un diámetro de abertura inicial al menos igual al diámetro transversal más grande del embrión, pero, preferentemente, al menos un 10% más grande para permitir que el embrión entre con el chorro libre. El receptor para usar con el transportador de chorro de líquido requiere medios para drenar el exceso del transportador líquido que entra en el receptor junto con el embrión. Preferentemente, el receptor está perforado (345) para conseguir el drenaje. Preferentemente, al menos una de las perforaciones (345) se localiza en el fondo del receptor para drenar más completamente el exceso de fluido del contenedor. Preferentemente, el receptor de embriones tiene una forma cilíndrica o cónica. Un receptor de forma cónica con el diámetro interno al menos dos veces más grande que el diámetro transversal más grande del embrión, y con un fondo perforado plano con un radio de, como máximo, el diámetro más pequeño del embrión y una longitud axial de al menos dos veces la longitud de un embrión sería una de las formas preferidas del contenedor. Dicha forma del contenedor es preferida porque permite que el exceso de líquido pase y drene libremente mientras el embrión se deposita primero sin constricciones del lado interno del contenedor y después más restringido cuando alcanza el fondo del contenedor, de modo que se conserva la orientación y se mantiene el embrión en una orientación sustancialmente vertical.

El sustrato (320) tiene que ser lo bastante rígido como para mantener el embrión en la orientación deseada, aunque lo bastante flexible como para permitir su desarrollo.

El viaje del fluido a través de un canal de flujo (350) sin el embrión tiene un caudal de fluido volumétrico igual a la velocidad media del fluido multiplicado por el área transversal del tubo. En una realización, el tubo está hecho de cristal con una sección trasversal de 3 x 3 mm cuadrados en el interior. La velocidad media del líquido es de 50 cm/s. Por tanto, la velocidad de flujo volumétrico es de 4,5 ml/s. Con el embrión suspendido en líquido a través del tubo, el embrión desliza sustancialmente sobre una película fina de lubricante del líquido adyacente a la pared de cristal, lo que permite una traslación fácil y suave del embrión con menor arrastre sobre el embrión en oposición al embrión en contacto seco con la pared de cristal. Siempre hay una cantidad pequeña de arrastre sobre el embrión y, por tanto, el embrión se mueve ligeramente más despacio que la velocidad media del fluido dentro del canal de flujo. Si el diámetro interno del canal de flujo no cambia a lo largo de la corriente de flujo, la velocidad del embrión permanecerá sustancialmente constante y es simple predecir de forma precisa el momento de liberación de cada embrión sucesivo en el receptor de embriones designado por medio de una corriente de fluido forzada a través de un canal de flujo mediante un cabezal de presión sustancialmente constante o un gradiente de presiones. Por tanto, se prefiere que la forma y el área transversal del tubo de liberación permanezcan sustancialmente constantes. En caso de líquido, el cabezal de presión constante se puede proporcionar manteniendo una deposición de fluido a una altura adecuada para conseguir un cabezal de presión constante suficiente para mover la corriente de líquido y los embriones a través del tubo con una velocidad sustancialmente constante y estacionaria. En una situación, un tubo con una sección transversal de 3x3 mm cuadrados y dos flexiones de noventa grados requirió 0,12 m de cabezal de líquido para mover los embriones a la velocidad de aproximadamente 0,5 m/s a través de una sección de 1,2 m del tubo. Aunque se prefiere liberar el embrión verticalmente en la dirección de la gravedad en el receptor de embriones, también es posible, y a veces ventajoso, forzar el chorro libre de fluido y al embrión para entrar en el receptor de embriones en una dirección distinta a la vertical y descendente. Un chorro de fluido que sale de una boquilla a 0,5 m/s permanece sustancialmente recto y sustancialmente estable para una distancia de 10 mm o más a medida que sale de la salida del tubo (365). Por tanto, es factible depositar el embrión en una dirección distinta a la vertical-descendente en un receptor de embriones (340).

5. Sistema

Sin perder generalidad, los inventores usan la embriogénesis somática como ejemplo de producción a partir de propágulos de plantas cultivadas *in vitro*. La tecnología de embriogénesis somática para la propagación de la masa de las plantas ha estado limitada por el requisito de tediosas operaciones manuales. Los procedimientos para producir plantas a partir de embriones somáticos requieren manipulación manual intensiva y son, por tanto, caros para la producción de plantas. El motivo subyacente de ello es el laborioso y largo procedimiento del laboratorio para seleccionar manualmente, separar, clasificar, orientar y plantar los embriones durante los procesos de maduración,

germinación y formación de plantas. Es un objeto de la presente invención proporcionar el procedimiento y los dispositivos para un sistema automático capaz de seleccionar y depositar embriones maduros que satisfagan un conjunto de criterios definidos para germinar y formar plantas con una interferencia humana mínima. Con este sistema automático, los procesos de seleccionar y separar los embriones maduros del racimo de embriones producidos en placa Petri o en un biorreactor de líquido, clasificar, orientar y depositar los embriones para germinación se pueden completar en segundos.

Cada unidad de la invención divulgada en el presente documento o por referencia se puede usar como una unidad autónoma pero, preferentemente, es una parte integrada de un sistema más grande para la automatización de la propagación de la masa de la producción a gran escala de propágulos de plantas cultivados *in vitro*.

El sistema de la invención comprende un dispositivo separador de la invención y al menos uno de los siguientes componentes:

a) una unidad dispersora (220) para dispersar los embriones y el tejido embriogénico suspendido en un fluido, localizado corriente arriba del dispositivo separador, y, opcionalmente, también un biorreactor, como fuente de embriones, localizado corriente arriba de la unidad dispersora ,

b) unidad de orientación y clasificación (250) localizada corriente abajo del dispositivo separador para obtención de imágenes y clasificar los embriones de acuerdo con un conjunto de criterios e identificar la orientación de los embriones para la deposición corriente abajo más adelante;

y opcionalmente un dispositivo de deposición (260), localizado corriente abajo de la unidad de orientación y clasificación para la deposición de los embriones maduros seleccionados y orientados en un receptor de embriones (340) para germinación y formación de raíces.

La unidad separadora de la invención se puede usar como unidad autónoma o, preferentemente, combinada e integrada con la unidad dispersora divulgada en el documento PCT/US09/39982 como sistema dispersor-separador para la extracción rápida de los embriones maduros del racimo embriogénico producido en una placa Petri sobre medio sólido o de un biorreactor con medio líquido. En este caso, la salida del último tubo dispersador está fijada al conducto de alimentación (9) del separador, como se ilustra en la figura 10. Los racimos embriogénicos dispersados en el dispersador (220) están guiados inmediatamente hacia el interior del contenedor separador (5) a través del conducto de alimentación (9) del separador mientras el fluido en el contenedor separador rota mediante los medios de rotación (18). Los embriones dispersados con la masa embriogénica en el contenedor separador sedimentan más rápidamente y entran en la capa límite (20) en la placa inferior (6) del contenedor separador. Tras la entrada en la capa límite, los embriones siguen rápidamente una trayectoria en espiral convergente hacia el centro de la placa inferior (6) y entran en el conducto (7). Esta combinación de las unidades dispersora y separadora en un subsistema proporciona el medio de separar rápida y eficazmente los embriones de los racimos embriogénicos producidos en placa Petri sobre medio sólido o en biorreactores en medio líquido en una corriente de líquido que solo contiene embriones. Como se ilustra en la figura 12, dicha corriente de líquido con solo los embriones se puede combinar con otras unidades, como se divulga en el presente documento, para obtener imágenes y analizar las características de los embriones y la orientación de los embriones para su deposición en una placa adecuada para germinación o rechazar los embriones que no cumplen el conjunto de criterios para embriones aceptables.

Los criterios para embriones aceptables dependen del tipo de embriones que se esté procesando.

Como ejemplo, para la picea de Noruega, los criterios incluyen, entre otros, tener embriones con un cotiledón transparente, cola alargada y longitud total que es al menos dos veces más grande que el diámetro medio del plano transversal del embrión. La forma debe ser relativamente recta y no demasiado curvada.

Para evaluar cada embrión contra el conjunto de criterios para la producción de plantas de un modo rápido y rentable, los embriones separados en una corriente líquida saliendo del conducto (7) de la unidad separadora (230) únicamente los embriones serán guiados inmediatamente hacia la unidad de orientación y clasificación (250), con un conducto de líquido guiando los embriones individuales a través de una sección de análisis (249), como se muestra en la figura 12. En la sección de análisis, el embrión se detecta mediante sensores ópticos y sistemas de obtención de imágenes. La imagen del embrión se analiza en base al análisis de imágenes. Las características del embrión se analizan después contra un conjunto de criterios para "embriones "aceptables" que más probablemente germinarían y formarían plantas con procesamiento posterior. Si el embrión que pasa por la sección de análisis no es aceptable, es decir no satisface el conjunto de criterios, se rechaza. La orientación del embrión también se determina y cambia si no es correcta.

Los embriones correctamente orientados y aceptables se pasan por un conducto de líquido al dispositivo de deposición (260) y se depositan en receptores para embriones (340). En una realización, una tabla XY colocará una placa de reactor de modo que el siguiente contenedor para receptor de embriones vacío de esta placa esté directamente y precisamente debajo de la boquilla de salida (365) del dispositivo de deposición lo bastante largo para que el embrión aceptable se deposite en el contenedor. En cuanto el embrión deje la salida del dispositivo de

deposición y se deposite en el contenedor de la placa del singulareactor, la tabla XY colocará la placa del singulareactor de un modo tal que el líquido que salga de la boquilla de salida (365) se deposite fuera de los contenedores receptores de embriones (300) y en la sección de rechazo (310), como se muestra en la figura 11. También los embriones rechazados se dirigen fuera de los contenedores receptores de embriones.

Cada vez que se detecta un embrión aceptable y se deposita, el software puede registrar la imagen del embrión, el número secuencial, la posición en la placa en la que se ha depositado el embrión, la fecha y la hora de la deposición y un código único del embrión. Una vez que el receptor de embriones está completo, se puede transportar manualmente e instalar en la estación de anclaje correspondiente para germinación y formación de raíces.

Sistema sin módulo de orientación

Durante los ensayos del sistema con el módulo de orientación (252) se observó que la etapa de orientación podría ser limitante de la velocidad en relación con la deposición. Cuando el embrión tenía que reorientarse, la colocación en el contenedor de embriones (340) llevó aproximadamente cuatro veces más que el tiempo de deposición de un embrión con la correcta orientación inicial.

Con el fin de acelerar el sistema, el módulo de orientación (250) se eliminó y, en su lugar, se construyó un colector de embriones de tipo alternativo (312). El colector de embriones de tipo alternativo se muestra en la figura 16 (vista lateral A, B, vista desde arriba). El colector de embriones está controlado por motor paso a paso/conmutador (313) y la unidad de control (38) de tal modo que, cuando se identifica un embrión con el detector de orientación (510) localizado corriente arriba de la salida (365), el motor paso a paso/conmutador (313) puede colocar el colector de embriones (312) de acuerdo con la orientación de un embrión que está pasando.

El detector de orientación (510) y la unidad de control (38) pueden ser, por ejemplo, un sistema de formación de imágenes en interfaz con un ordenador que identifica la orientación del embrión que está pasando. Si el embrión identificado tiene la cola/raíz primero, dejará que el embrión pase al contenedor de embriones (349), si el embrión tiene primero la cabeza, el motor paso a paso/conmutador (313) colocará el colector de embriones (312) de un modo tal que se recoge el embrión. Tras la recolección, el embrión se devuelve al sistema, bien al separador (230) o al diluidor (240). Con esto, el sistema funcionó bien y la velocidad de los embriones correctamente depositados aumentó por un factor de dos en comparación con un sistema con módulo de orientación (250).

Los ejemplos siguientes se interpretarán como no limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1: Separación

Varios racimos de masa embriogénica de picea de Noruega (línea celular 06:28:05) con un diámetro hidráulico medio de la sección transversal tomado de la sección media del racimo que varía de 5 mm a 30 mm se recogieron de un biorreactor periódica y parcialmente sumergido e introducido en un dispersador del documento PCT/US09/39981. Un contenedor de cultivos *in vitro* como se ha divulgado en el documento W09625484 se usó como el biorreactor.

Tras el paso a través del dispensador, los embriones completamente dispersados en agua se introdujeron a través del conducto de alimentación (9) y en el contenedor separador (5). El medio de rotación (un disco) se rotó a la velocidad de 120 rpm durante más de 20 minutos con el contenedor separador (5) lleno de agua antes de la inyección de los racimos de masa embriogénica en el dispersador. Se prefiere tener el medio de rotación en marcha durante más de unos minutos para eliminar los transitorios iniciales debido al inicio del motor con un líquido estacionario. Un matraz de vidrio de 500 mm se colocó bajo el conducto (7) para recoger el material que sale del contenedor separador (5). Un tubo de plástico fijado al tubo de cristal del conducto (7) se fijó a otro tubo de cristal (tubo de cristal 1) insertado a través de una tapa de caucho ajustada a presión sobre la parte superior del matraz y extendido a aproximadamente 5 mm del fondo del matraz. Otro tubo de cristal (tubo de cristal 2) se ajustó a presión a través de la tapa de caucho del matraz y se extiende hasta media altura del matraz. Un tubo de plástico se fijó a la parte superior del tubo de cristal 2 y se guió a una deposición colocada en una elevación muy por debajo del fondo del matraz.

Inicialmente, el tubo de plástico que conecta el tubo del conducto (7) a la parte superior del tubo de cristal 1 se cerró mediante pinzamiento de modo que ningún flujo pudiera atravesar el tubo del conducto (7). Poco antes de la inyección de los embriones dispersados en el contenedor separador (5), dicho tubo inicialmente pinzado se abrió de modo que el líquido pudiera fluir a través del tubo de cristal del conducto (7) como dicta el cabezal de presión en el contenedor separador (5). Se observó que el caudal del líquido a través del conducto (7) era inicialmente más alto (como estaba previsto) hasta que el nivel de líquido en el matraz alcanzó la punta del fondo (entrada) del tubo de cristal 2. Una válvula corriente abajo del conducto (7) (en la parte superior) del tubo de cristal 2 se ajustó para mantener el nivel de líquido estacionario dentro del matraz. Tras la inyección del racimo de la masa embriogénica en el dispersador, la masa embriogénica completamente dispersa que sale del dispersador entró en el contenedor

5 separador (5) rápidamente quedando atrapada en el flujo. En aproximadamente 3 minutos, el tubo de plástico que conecta el tubo del conducto (7) al tubo de cristal 1 se cerró mediante pinzamiento y se detuvo el motor y el flujo. Asimismo, la válvula corriente abajo al tubo de cristal 2 se cerró. Dado que el fondo del tubo 2 está aproximadamente 50 mm por encima del fondo del matraz y los embriones del matraz sedimentan en el fondo del matraz, solo el líquido de la porción superior del matraz es eliminado por el tubo de cristal 2 debido a la diferencia de presiones en el matraz. El líquido y el material suspendido en el interior de contenedor separador (5), el matraz y la deposición corriente abajo del matraz se recogieron e inspeccionaron cuidadosamente. Del total de 52 embriones recogidos en todo el sistema, 45 estaban en el matraz y 8 en el contenedor separador (5) y ninguno en la deposición corriente abajo del tubo de cristal 2. La repetición de los experimentos con este sistema proporcionó resultados similares, siendo la proporción de embriones recuperados de aproximadamente 60 a 85%.

15 El medio de rotación (18) en el sistema de este ejemplo se realizó con estereolitografía y se fijó a un eje hueco del motor. Se observó que el medio de rotación era ligeramente "titubeante", es decir no precisamente axisimétrico, creando una onda de desplazamiento bastante periódica en la superficie del líquido. El otro motivo para esta ligera desviación del flujo axisimétrico ideal es la imprecisión en el diámetro y la forma circular del contenedor separador (5) de vidrio usado en los experimentos. En general, si el contenedor separador (5) y el medio de rotación (18) y todo el sistema es una máquina precisa para crear un flujo axisimétrico ideal, cabe esperar que la eficiencia de la recolección de los embriones aumente.

20 *Ejemplo 2: Deposición*

25 El dispositivo de deposición de la invención, mostrado en la figura 11, comprende una tabla x/y con accionadores lineales (315) y una placa de singulareactor con 20 o más contenedores, cada contenedor para un embrión individual. Los accionadores lineales (315) están fijados a una unidad de control (38).

30 El receptor de embriones está fijado sobre la tabla x/y en una posición conocida con exactitud, de un modo tal que el software del accionador lineal pueda colocar precisamente la placa. La placa receptora de embriones comprende una pluralidad de contenedores, preferentemente 50 o más, en una formación de retícula, con una separación centro-centro específica, preferentemente de aproximadamente 25 mm.

35 El contenedor puede tener cualquier forma adecuada para la aplicación, preferentemente una forma cónica con un fondo plano, como se muestra en la figura 11A. La pared y el fondo del contenedor están perforados (305) para permitir que el medio líquido entre y drene libremente hacia dentro y hacia fuera del contenedor. La placa receptora de embriones contiene una sección de deposición (310) con una entrada (330) y una salida (524), como se muestra en la figura 11B. Todo el sistema con la tabla XY están colocados dentro de una campana para mantener todo el sistema estéril. La placa receptora de embriones también puede estar equipada con una cubierta hermética para poder transferir en condiciones estériles.

40 *Ejemplo 3: Separación con dos unidades de separación*

45 Con el fin de obtener embriones maduros puros y bien separados se conectaron dos unidades separadoras (230) en serie. El tubo de salida (7) de la primera unidad de separación se conectó al conducto de alimentación (9) de la segunda unidad de separación. Con esta disposición, la cantidad de tejido embriogénico inmaduro se redujo en un 95 % o más.

50 *Ejemplo 4 Separación sin o con vórtex colector mínimo*

Existe una clara relación entre la velocidad del drenaje del líquido a través del conducto (7) y la pureza de los embriones que se están separando. Por "pureza", en este contexto, se quiere decir la eficacia de separación del tejido embriogénico inmaduro de los embriones; la pureza más elevada significa menos masa embriogénica por embrión.

55 Cuanto menor es la velocidad de drenaje del líquido a través del conducto (7), menor es la velocidad de separación y más eficaz es el proceso de separación en términos de pureza.

En base a estas observaciones, se fabricó un dispositivo que tenía un caudal de líquido de casi cero desde el conducto (7) y se dejó sedimentar el embrión a través de esta salida y se recolectaron de forma continua los embriones.

60 De este modo, la velocidad de sedimentación del embrión se basa en la densidad en número del embrión dentro del contenedor separador y en la velocidad de rotación del fluido. En un experimento se mostró que cuando hay aproximadamente de 75 a 100 embriones dentro del contenedor, la velocidad de separación de los embriones (velocidad de flujo casi cero a través de la salida) es del orden de 1 embrión por segundo a la velocidad de rotación de 150 rpm.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para separar embriones vegetales suspendidos en fluido de tejido embriogénico inmaduro, que comprende las etapas de:
- 5
- a) proporcionar un contenedor separador (5) adecuado, conteniendo dicho contenedor fluido que tiene una densidad inferior a la de los embriones a separar, teniendo una forma esencialmente cilíndrica, teniendo una pared inferior esencialmente plana (6) y un eje esencialmente vertical; y comprendiendo además un conducto (7) en comunicación con el fluido en el contenedor en la región axial de la pared inferior (6) durante la operación y
- 10
- un medio de inducción de un flujo de rotación (18) axisimétrico que es un objeto en rotación colocado dentro del contenedor (5);
- 15
- b) crear un vórtex colector en la región axial de la pared inferior (6) drenando fluido de dicho conducto (7); e inducir un flujo de rotación axisimétrico en el fluido relativo a la pared inferior (6) mediante el medio de rotación (18), de modo que:
- 20
- i) se cree una capa límite viscosa (20) en la pared inferior (6); y
- ii) se cree un gradiente de presión radial en el contenedor separador (5);
- c) introducir los embriones suspendidos en fluido y el tejido embriogénico inmaduro a separar en fluido presente en el contenedor separador (5) en una ubicación alejada de la pared inferior (6), de modo que:
- 25
- i) los embriones sedimenten más rápido que el tejido embriogénico inmaduro;
- ii) dejar que los embriones puedan entrar en la capa límite viscosa (20), mientras no dejen que el tejido embriogénico inmaduro pueda entrar en la capa límite viscosa (20);
- 30
- iii) arrastrar los embriones que entran en la capa límite viscosa (20) dentro de la región axial de la pared inferior (6) y
- d) recoger embriones de dicha región axial de la pared inferior (6) en el fluido drenado del conducto (7);
- 35
- por lo que los embriones recogidos se separan esencialmente del tejido embriogénico inmaduro.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende
- 40
- a) proporcionar un contenedor separador adecuado (5) que además comprende un conducto (7) en comunicación con el fluido en el contenedor en la región axial de la pared inferior (6) durante la operación, en el que el conducto (7) está colocado y dimensionado de un modo tal que los embriones arrastrados dentro de la región axial de la pared inferior (6) durante la operación entren en el conducto (7) mediante sedimentación gravitacional; y
- 45
- b) recoger embriones de dicho conducto (7).
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende además la etapa de modular la velocidad de sedimentación de los embriones en el conducto (7) por medio de inducción del flujo del fluido a través del conducto (7) hacia el interior del contenedor separador (5).
- 50
4. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el procedimiento está adaptado para operar de forma discontinua y comprende además recolectar selectivamente los embriones durante un periodo de tiempo tras la sedimentación de los embriones pero antes de que el tejido embriogénico inmaduro haya tenido tiempo de sedimentar.
- 55
5. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el procedimiento está adaptado para operación continua de un modo tal que comprende alimentar fluido en el contenedor separador (5) a una velocidad que supera la velocidad del flujo de fluido del conducto (7).
- 60
6. Un dispositivo para separar entre sí embriones vegetales suspendidos en fluido y tejido embriogénico inmaduro, que comprende:
- 65
- a) un contenedor separador (5), que, durante la operación, contiene fluido que tiene una densidad menor que la densidad de los embriones a separar, teniendo dicho contenedor una forma esencialmente cilíndrica, teniendo una pared inferior esencialmente plana (6), un eje esencialmente vertical y comprendiendo un

conducto de fluido (7) en comunicación con el interior del contenedor, localizado en la región axial de la pared inferior (6);

5 b) un medio de inducción de un flujo de rotación axisimétrico en el fluido relativo a la pared inferior (6) que es un objeto en rotación colocado dentro del contenedor (5), de modo que durante la operación:

i) se crea una capa límite viscosa (20) en la pared inferior (6);

10 ii) se crea un gradiente de presión radial en el contenedor separador (5);

c) medios de introducción de los embriones suspendidos en fluido y el tejido embriogénico inmaduro a separar en el fluido presente en el contenedor separador (5) en una ubicación alejada de la pared inferior (6), de modo que durante la operación:

15 i) los embriones sedimentan sustancialmente más rápido que el tejido embriogénico inmaduro;

ii) los embriones entran en la capa límite viscosa (20) mientras que el tejido embriogénico inmaduro permanece sustancialmente fuera de la capa límite viscosa (20);

20 iii) los embriones que entran en la capa límite viscosa (20) se extraen dentro de la región axial de la pared inferior (6) y hacia el interior del conducto (7); y

d) medios para recoger embriones de dicho conducto (7);

25 de modo que los embriones recogidos se separan esencialmente del tejido embriogénico inmaduro.

7. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 6, en el que:

30 i) el conducto (7) está colocado y dimensionado de forma tal que los embriones que son arrastrados dentro de la región axial de la pared inferior (6) durante la operación entran en el conducto (7) por sedimentación gravitacional.

8. El dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6-7, en el que el medio recolector de embriones comprende medios de recolección de embriones del conducto (7) sin alterar sustancialmente el volumen de fluido en el contenedor.

9. El dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6-7, en el que

40 i) el dispositivo comprende medios de drenar fluido de dicho conducto (7), en el que durante la operación se crea un vórtex colector en la región axial de la pared inferior (6); y

ii) el medio de recolección de embriones comprende medios de recolección de embriones del vórtex colector en el fluido drenado del conducto (7).

45 10. El dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6-9, en el que el dispositivo está adaptado, para operar de forma discontinua y comprende además medios de recolección selectiva de embriones durante un periodo de tiempo tras la sedimentación de los embriones pero antes de que el tejido embriogénico inmaduro haya tenido tiempo de sedimentar.

50 11. El dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6-10, en el que el dispositivo comprende medios de drenar fluido de la región axial de la pared inferior (6) durante la operación, comprendiendo un conducto extendido desde arriba o en cualquier otra dirección hacia las proximidades de la región axial de la pared inferior (6).

55 12. El dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6-11, en el que los medios de introducción de embriones y tejido se localizan en una ubicación axial cerca de la superficie del fluido.

60 13. Un sistema para procesar embriones de plantas suspendidos en un fluido, que comprende un dispositivo separador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6-12 y al menos uno de los siguientes:

a) una unidad dispersora (220) para dispersar los embriones y el tejido embriogénico suspendido en un fluido, localizado corriente arriba del dispositivo separador (230) y, opcionalmente, un biorreactor (200), como fuente de embriones, localizado corriente arriba de la unidad dispersora (220);

65 b) unidad de orientación y clasificación (250) para orientar y clasificar los embriones suspendidos en un fluido, localizado corriente abajo del dispositivo separador; y opcionalmente, un dispositivo de deposición,

localizado, preferentemente, corriente abajo de la unidad de orientación y clasificación.

14. Un sistema que comprende un dispositivo separador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6-12; y

5 un dispositivo para depositar embriones vegetales suspendidos en fluido al tiempo que se mantiene la orientación del embrión, que comprende

10 i) un canal de flujo dimensionado de modo que los embriones puedan desplazarse con el fluido que fluye a través del canal pero que estén restringidos a desplazarse en una orientación de la primera corona o la última corona por restricciones dimensionales, emanando dicho canal de flujo a una salida (365);

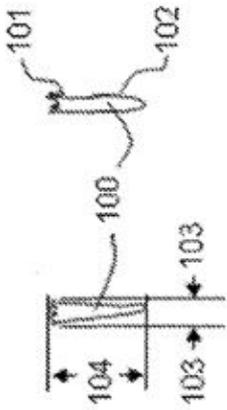
15 ii) un receptor de embriones (340); y

iii) medios de formar un chorro libre (370) de fluido que emana de la salida, en el que el chorro libre durante la operación se alinea con un receptor de embriones (340) lo cual permite depositar los embriones suspendidos en el fluido en el receptor de embriones (340);

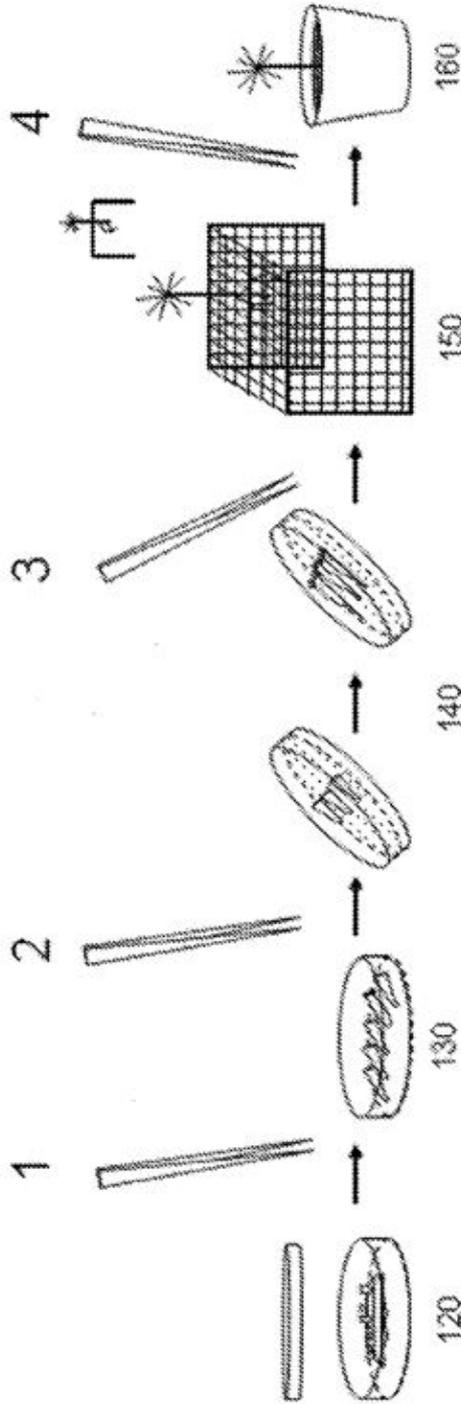
20 en el que

los medios de formar un chorro libre comprenden una sección de canal de flujo (380) inmediatamente corriente arriba de la salida (365), teniendo una sección recta (370) con una longitud al menos igual a la dimensión interna transversal más grande del canal de flujo (380).

25



A



B

Figura 1

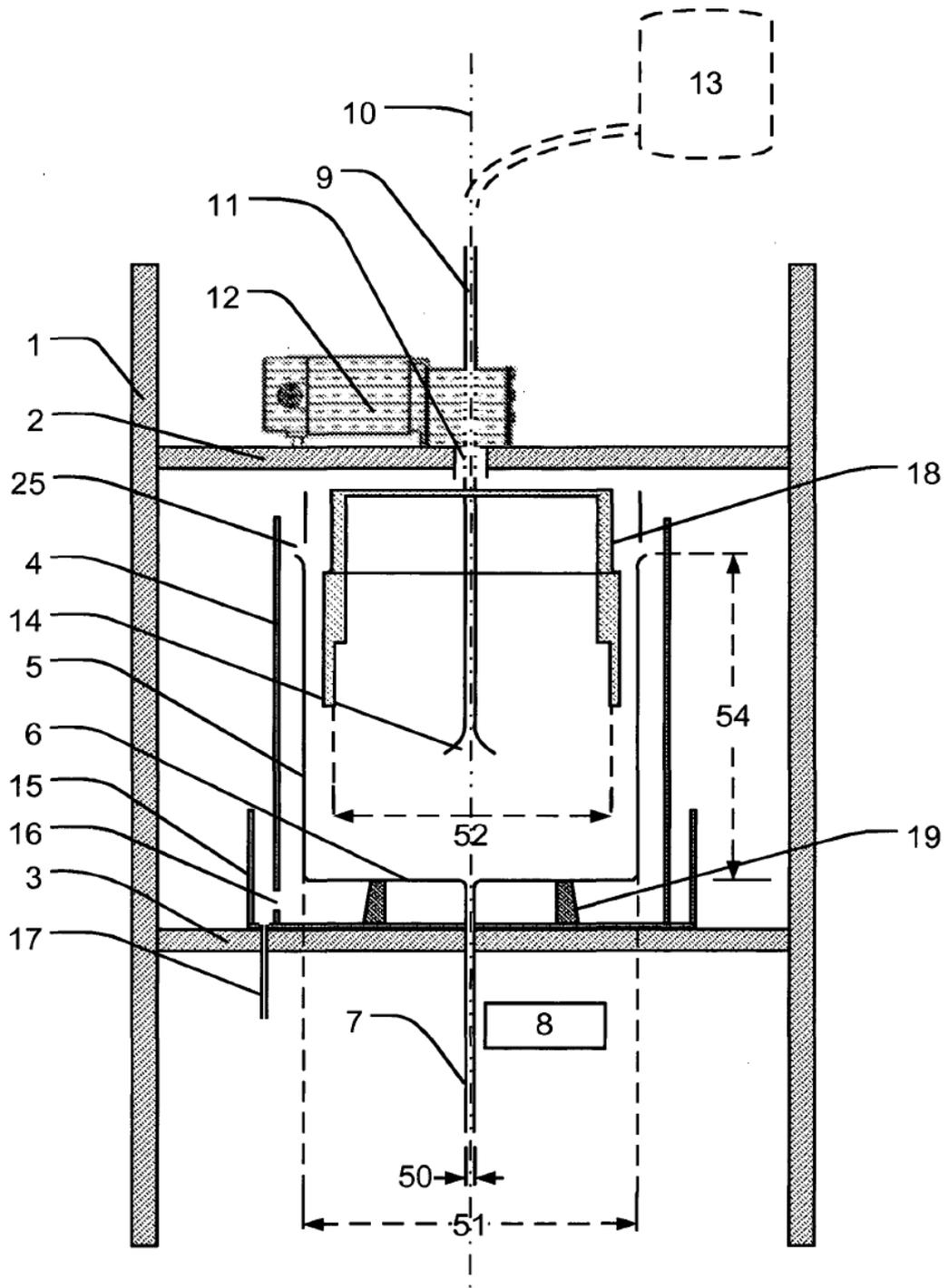


Fig 2

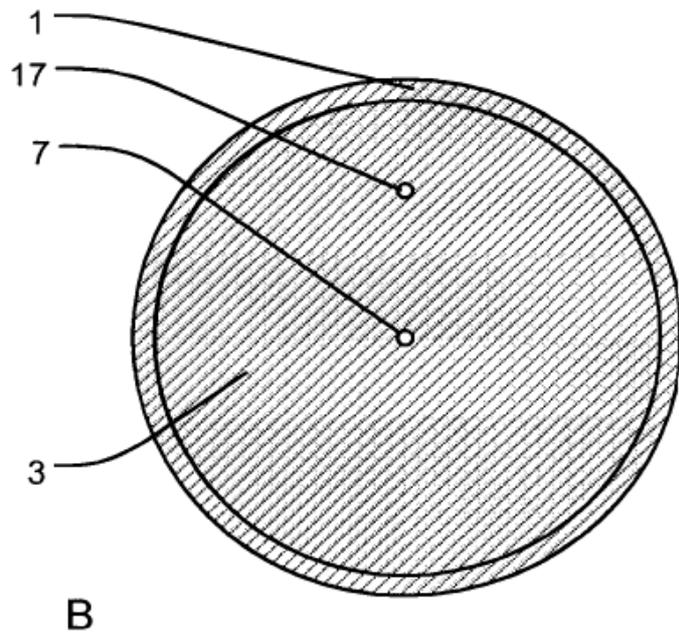
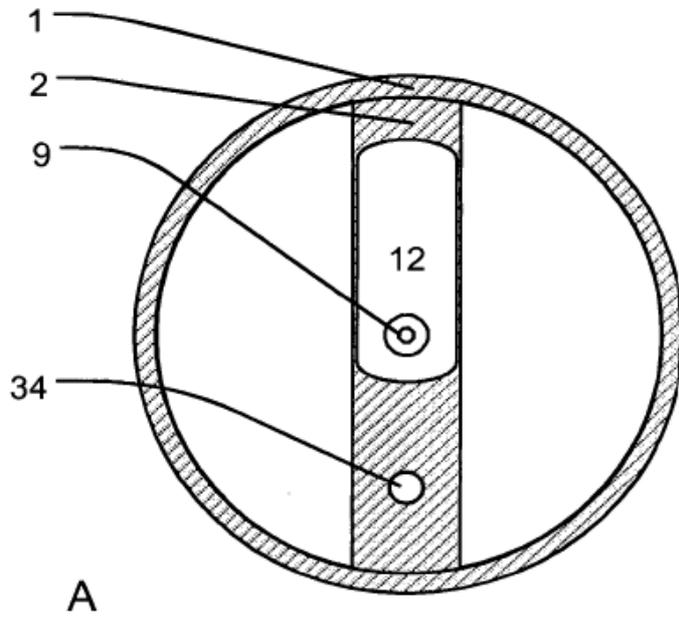


Fig 3

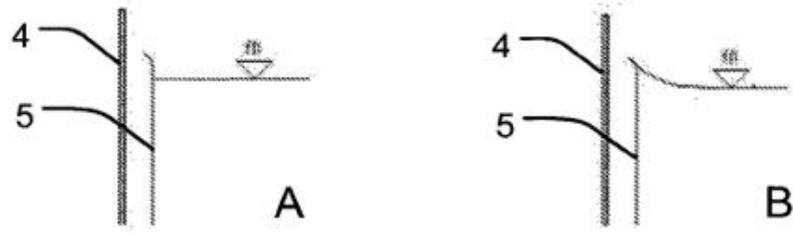


Figura 4

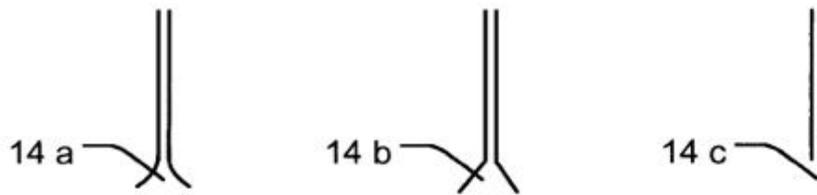


Figura 5

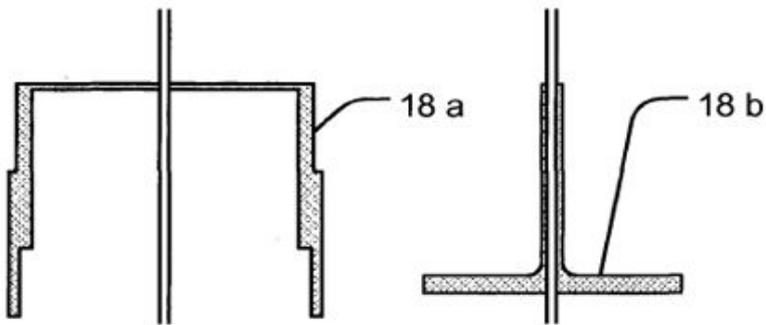


Fig 6

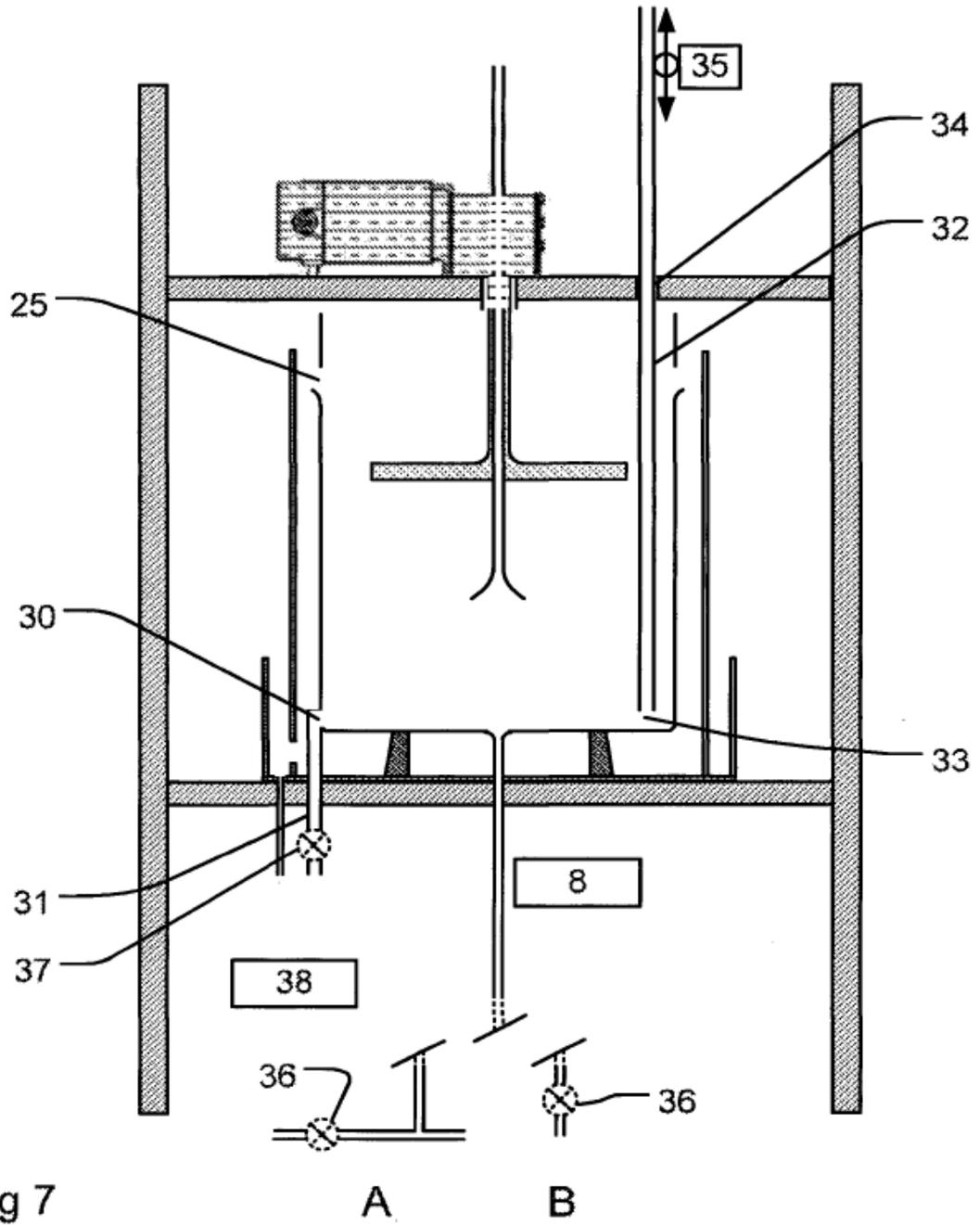


Fig 7

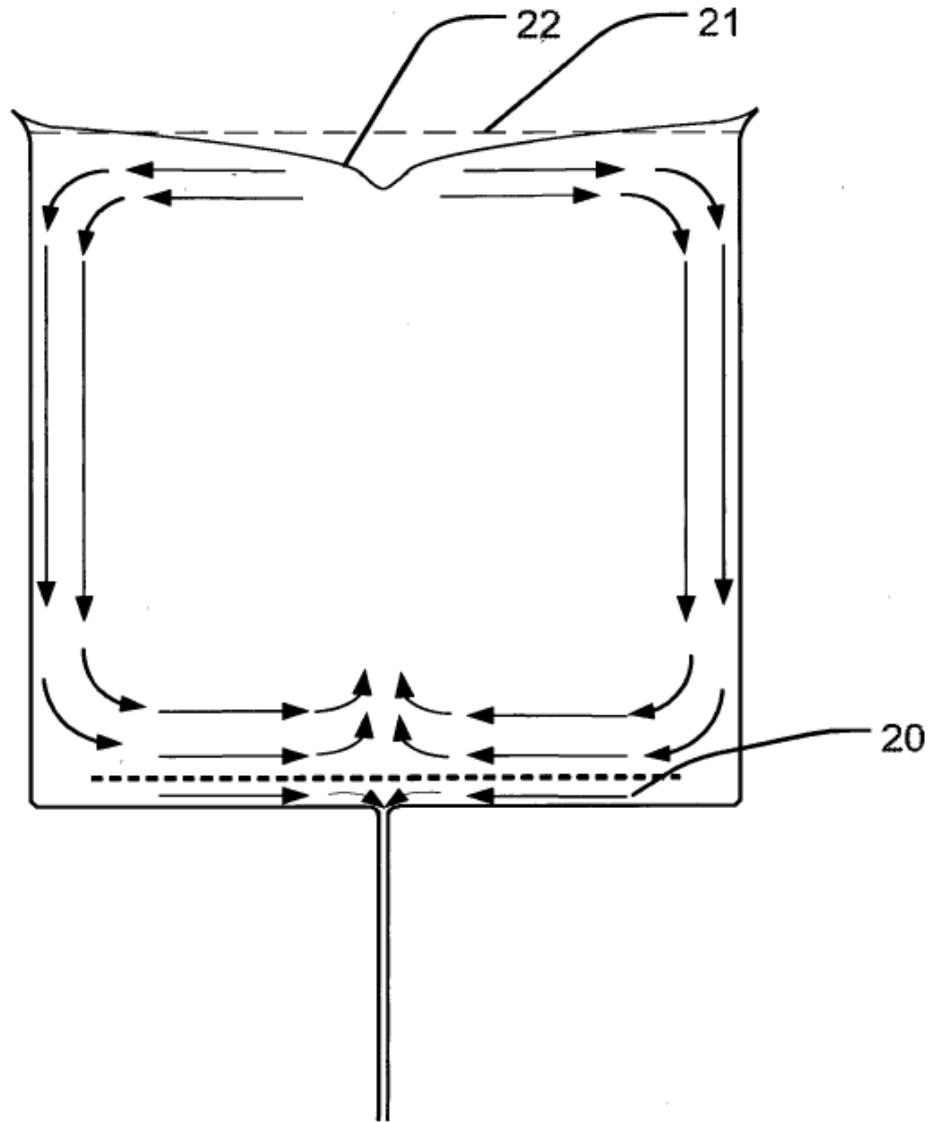


Fig 8

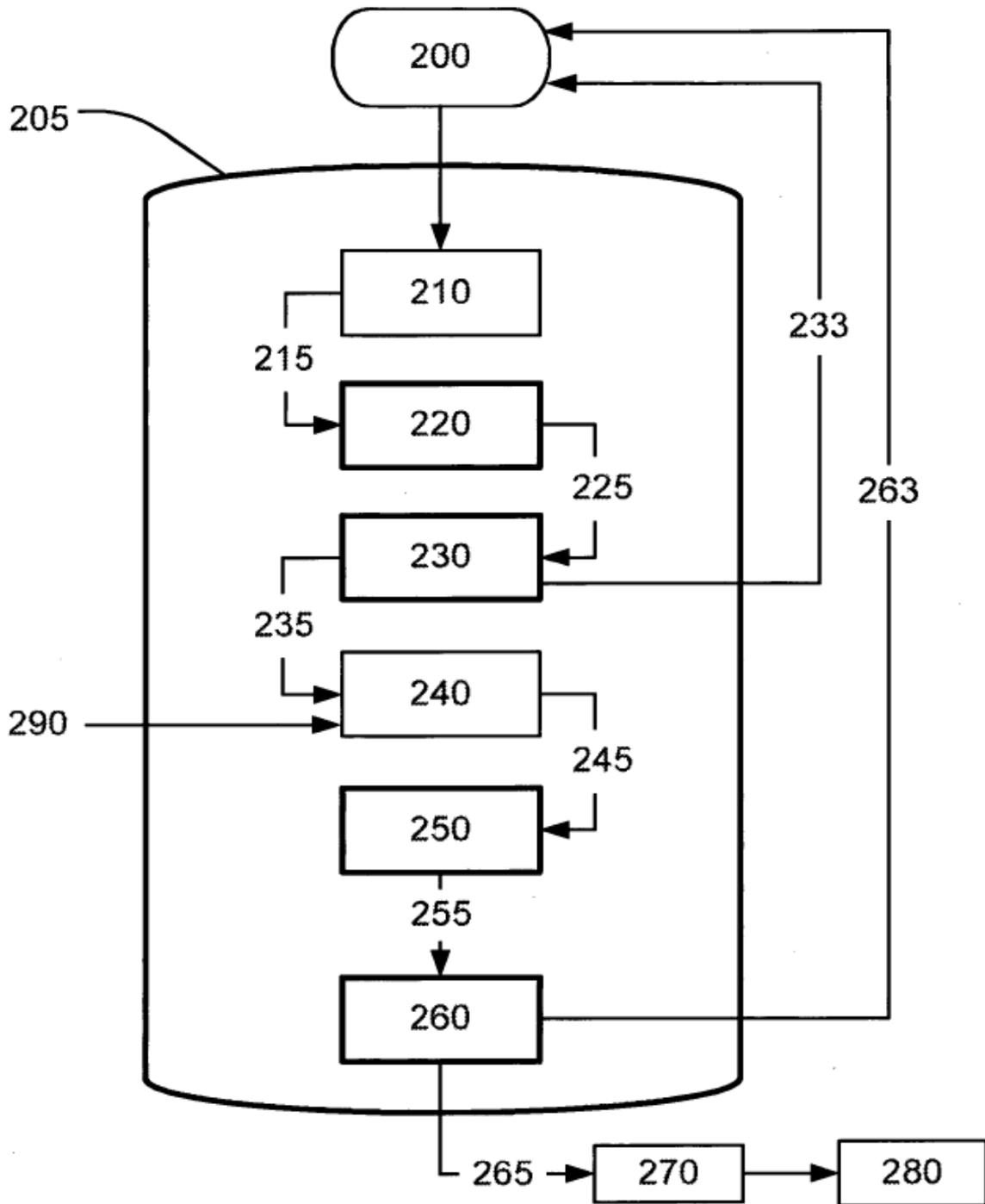


Fig 9

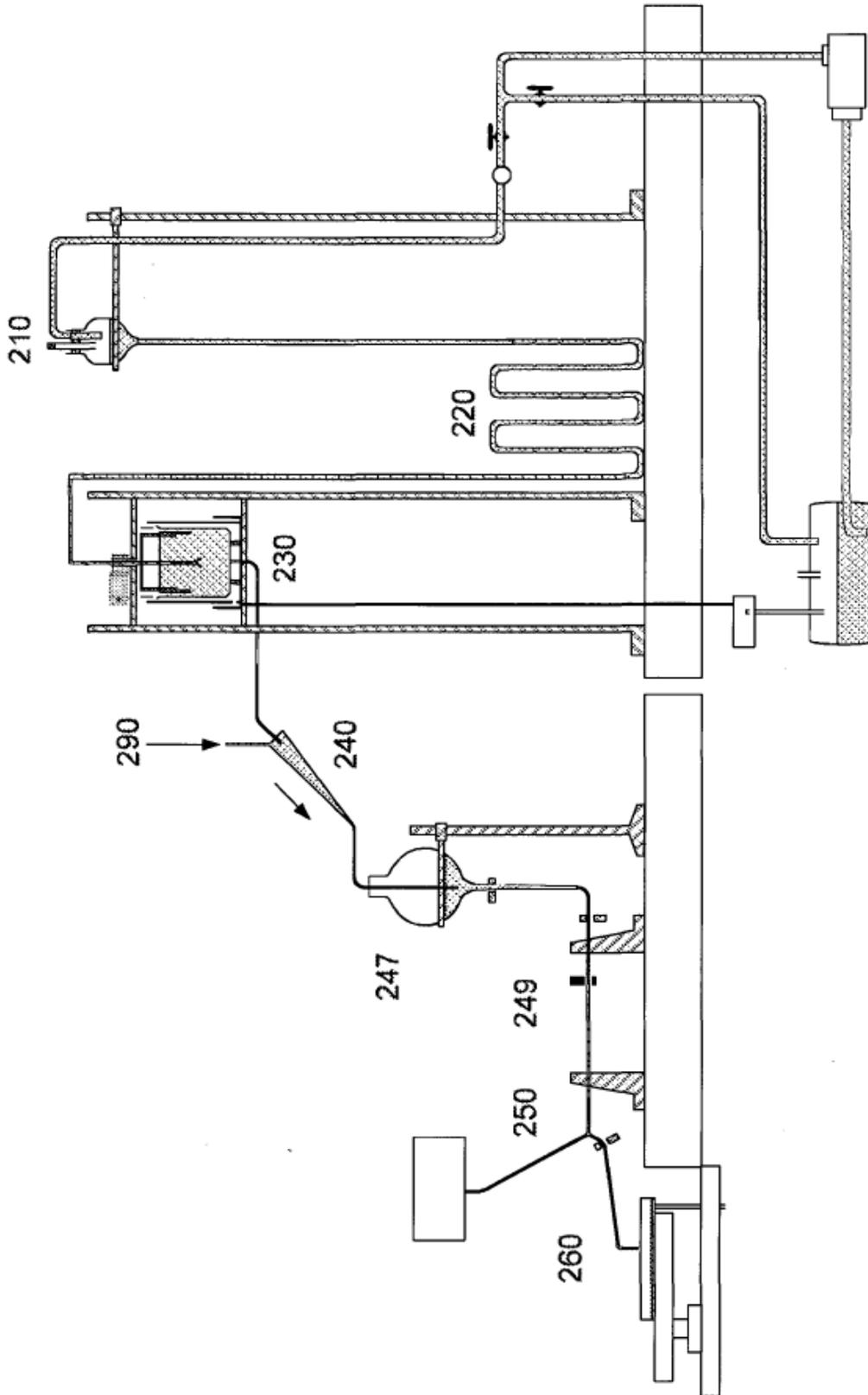


Fig 10

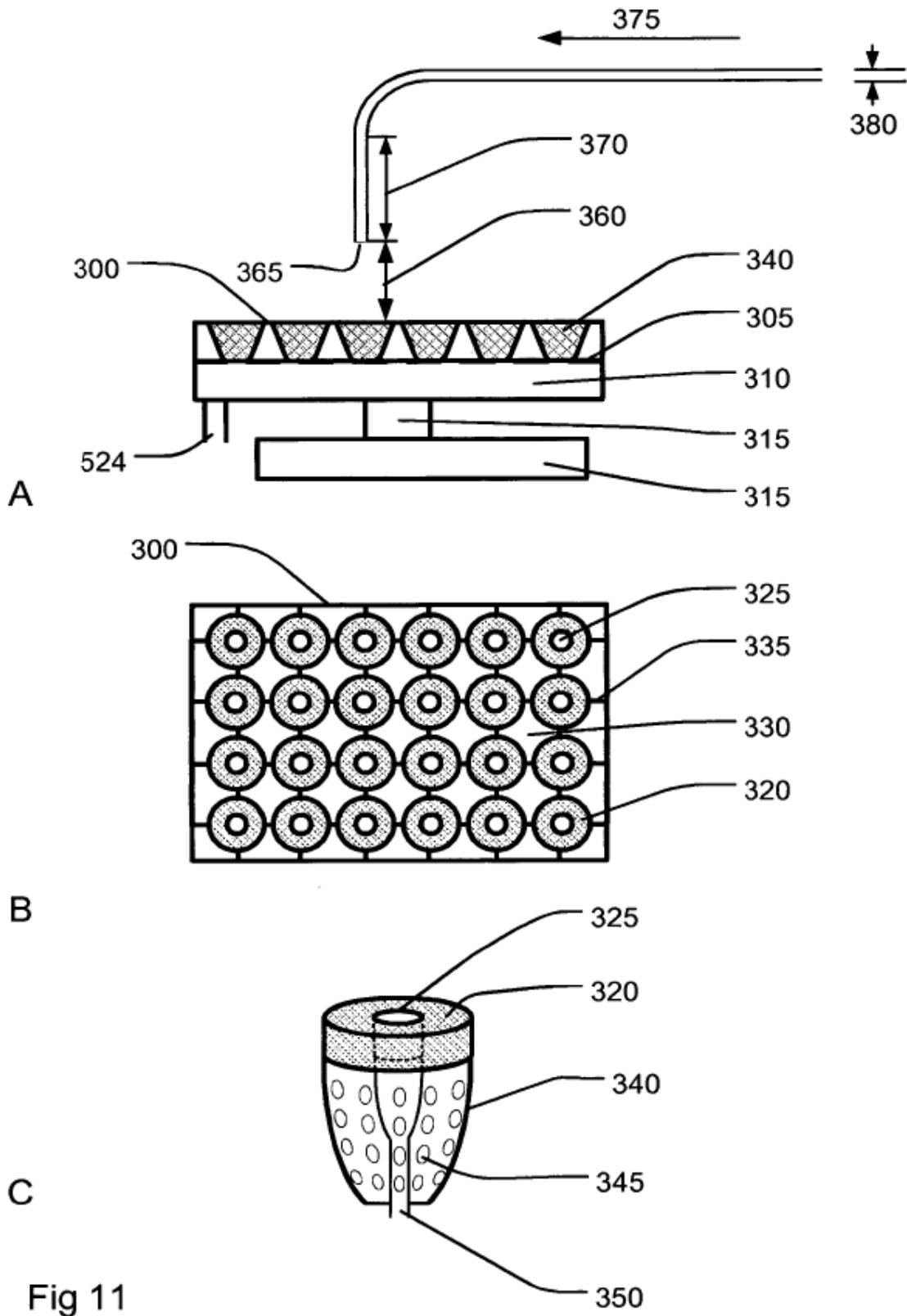


Fig 11

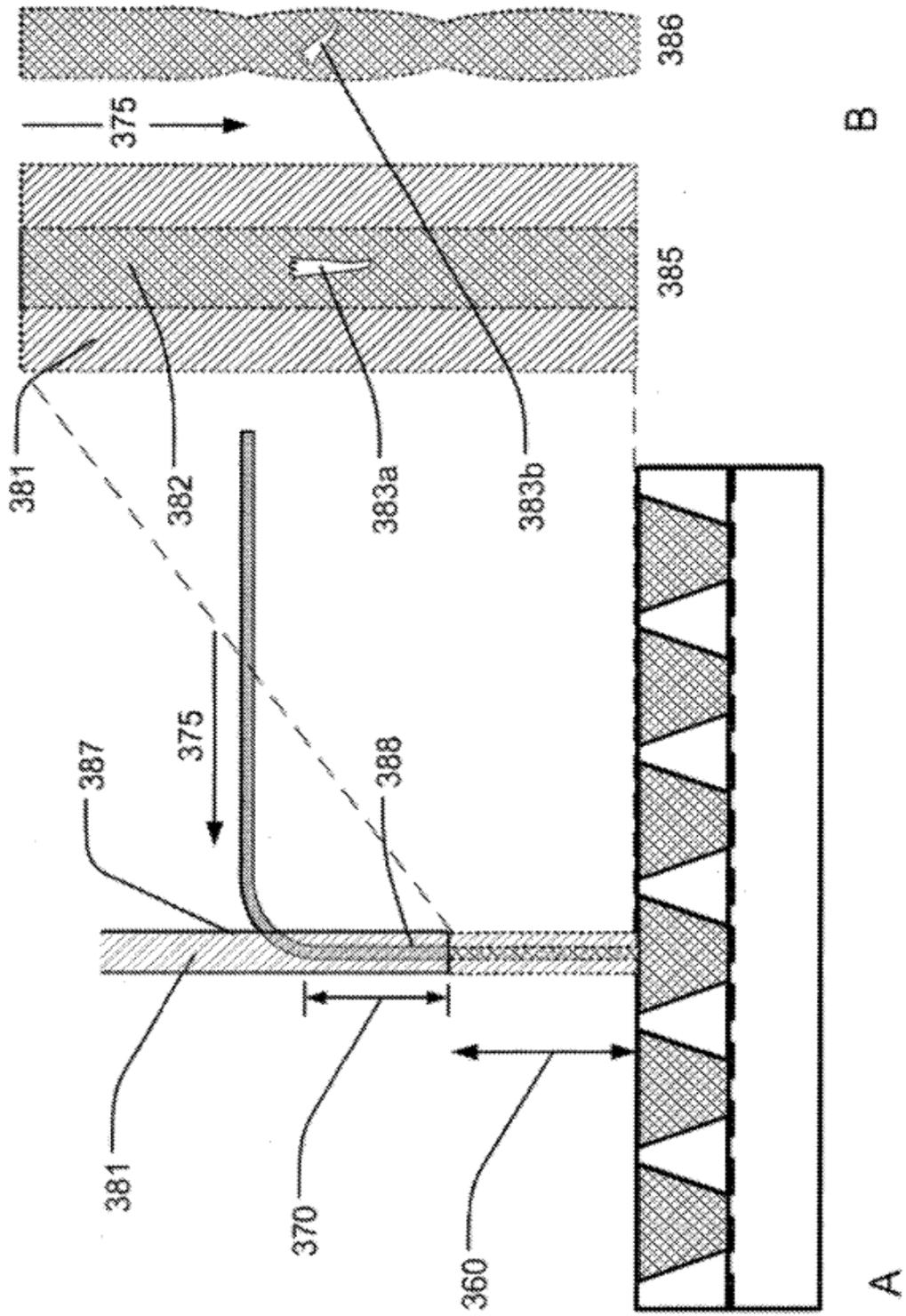


Fig 12

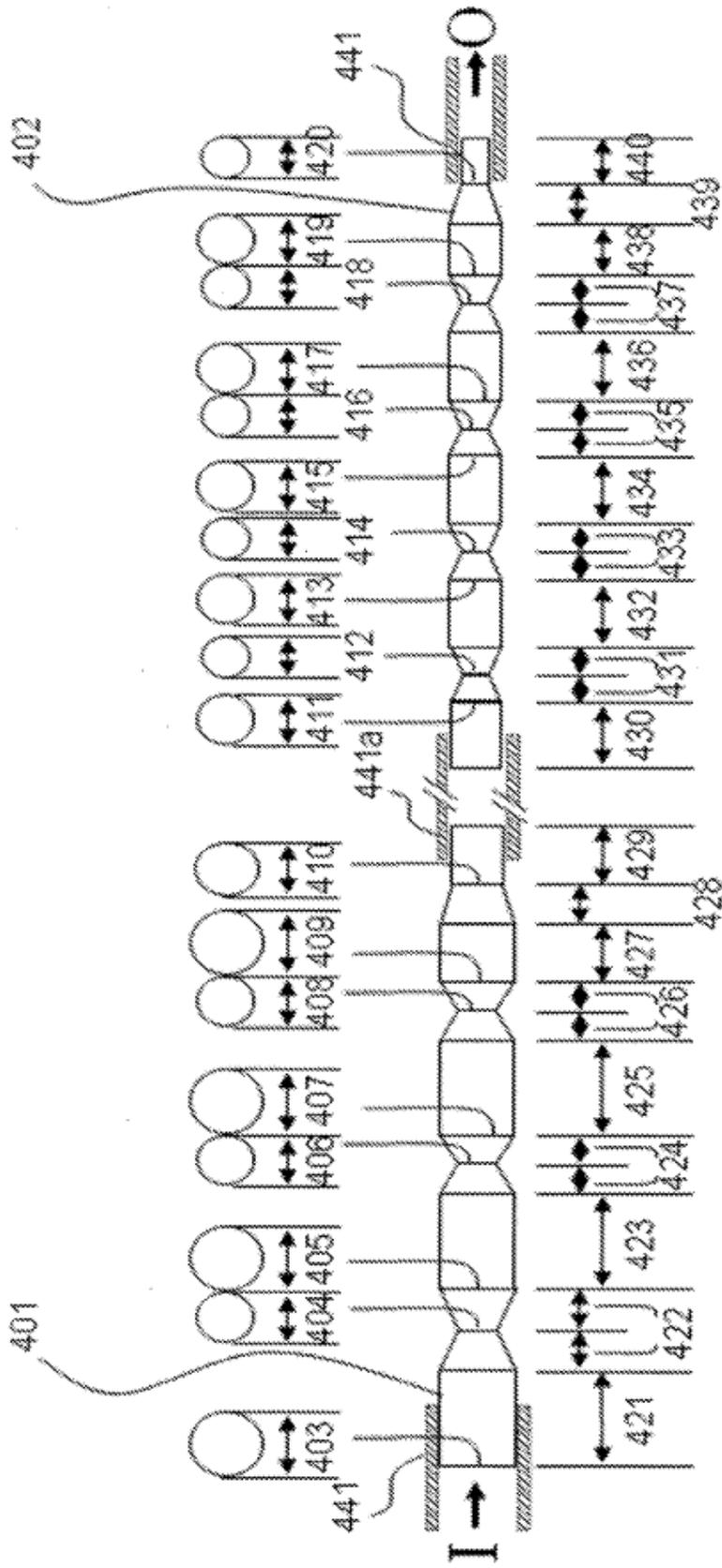


Fig 13

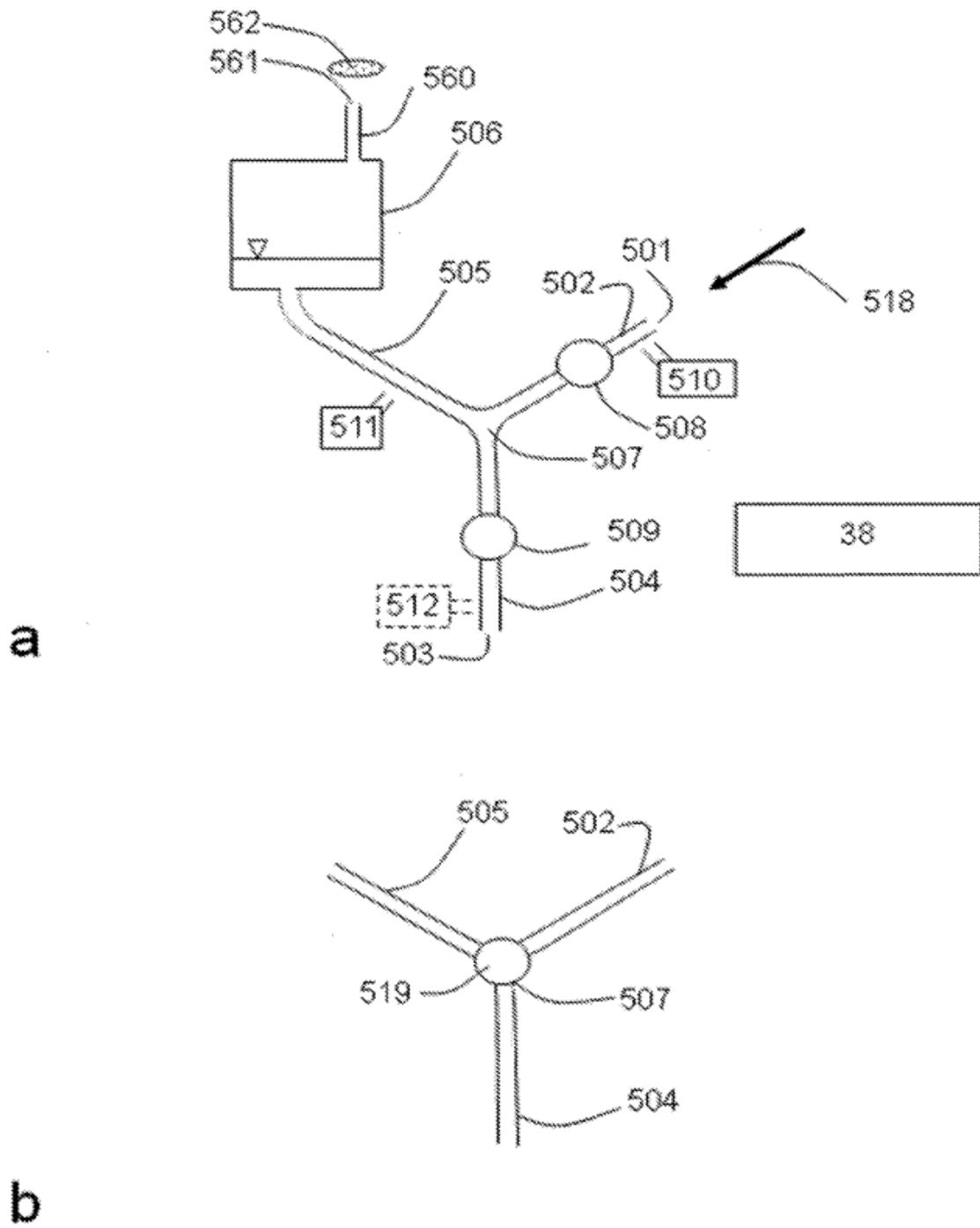


Fig. 15

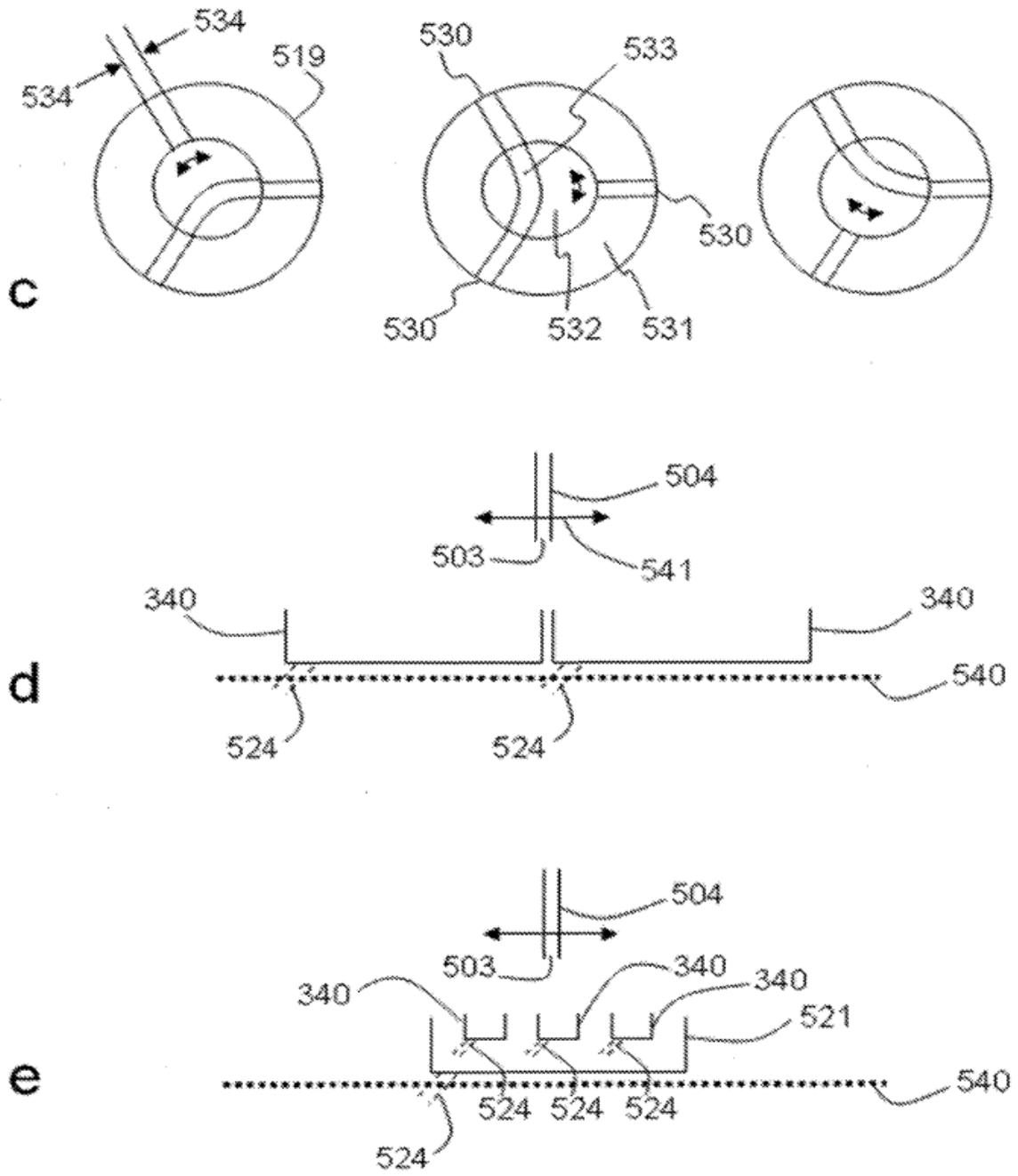
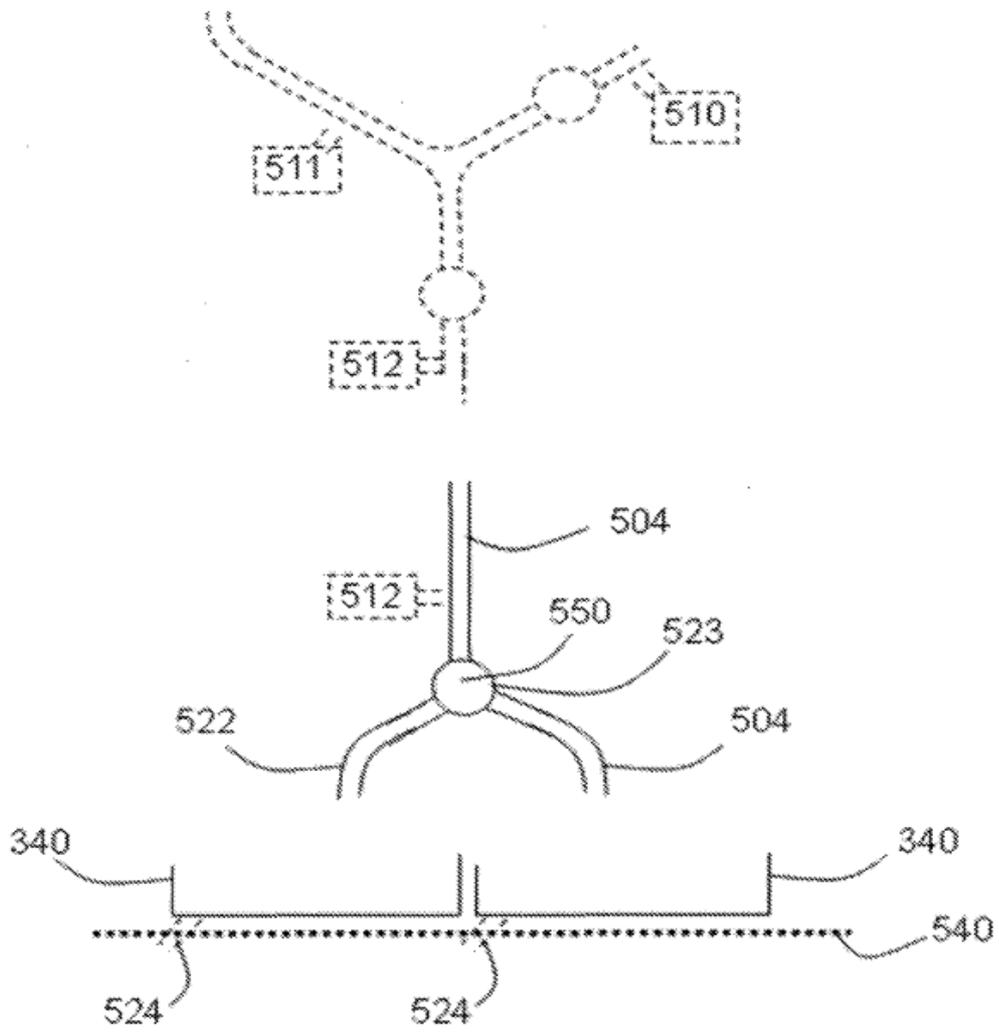


Fig 15



f

Fig 15

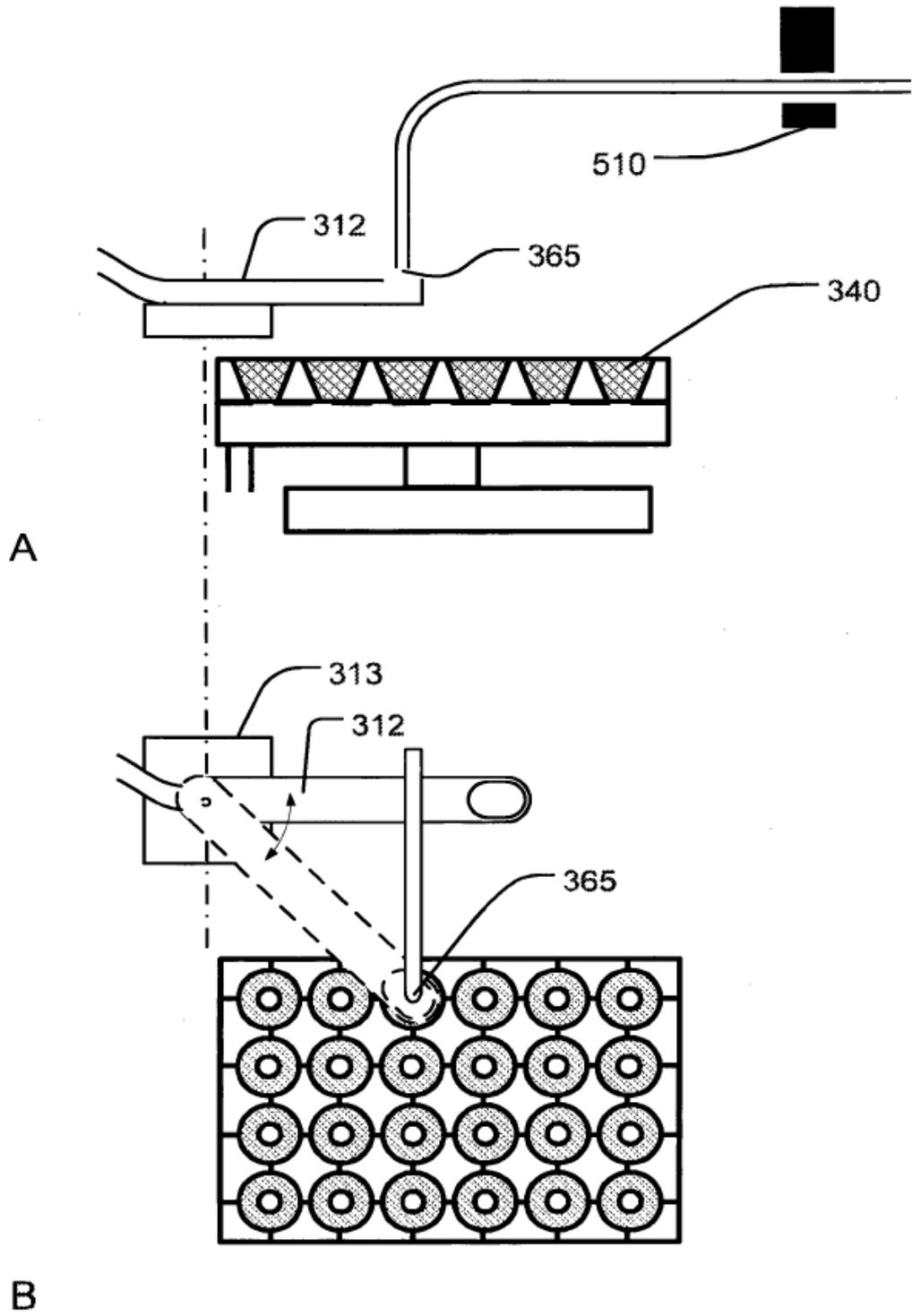


Fig 16