

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 781 326**

51 Int. Cl.:

A01G 9/02 (2008.01)

A01H 4/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.06.2005 PCT/NL2005/000427**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.12.2005 WO05120212**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.06.2005 E 05752854 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2020 EP 1761125**

54 Título: **Apoyo para cultivar material biológico**

30 Prioridad:

10.06.2004 NL 1026379

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

01.09.2020

73 Titular/es:

**VIVI B.V. (100.0%)
Mijlweg 18
3295 KH 's-Gravendeel, NL**

72 Inventor/es:

BIJL, JACOB JOHANNES

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 781 326 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

Apoyo para cultivar material biológico

La presente invención se refiere a un recipiente y a un método para cultivar material biológico según el preámbulo de las reivindicaciones 1 y 8 respectivamente, y al uso del recipiente según el preámbulo de la reivindicación 10.

5 Un recipiente para cultivar material biológico según el preámbulo de la reivindicación 1 se conoce a partir del documento US-A-6032409.

En el cultivo de material biológico es importante obtener el mayor rendimiento posible. En el caso de material vegetal, el procedimiento es generalmente el siguiente. En primer lugar, el material celular biológico se coloca en un primer recipiente estéril cerrado. Este recipiente generalmente está provisto de un medio de agar. Este primer recipiente se
10 coloca en condiciones tales que el material celular biológico comienza a crecer. Una vez que el material celular biológico ha comenzado a crecer hasta cierto punto, el material celular se retira del agar situado en el primer recipiente y se transfiere a un segundo recipiente. Durante esta transferencia, el material celular se lava a menudo para que se elimine sustancialmente todo el agar. En el caso de una gran cantidad de tipos de plantas, el material celular biológico se procesa entonces en el llamado material de siembra. Los métodos de procesamiento habituales aquí son triturar o
15 singularizar, aunque también son posibles otros métodos de procesamiento. El material de siembra así obtenido se coloca después en un segundo recipiente, que también comprende un medio de agar. Una vez que el material de siembra se ha desarrollado lo suficiente, el material de siembra se retira del segundo recipiente y se coloca sobre o en un sustrato inerte sólido situado en un tercer recipiente. El material de siembra desarrollado aquí generalmente se lava con agua de tal manera que se elimina prácticamente todo el agar. Esta etapa final de retirar y lavar el material de siembra desarrollado se realiza manualmente y, por lo tanto, tiene una serie de desventajas. En primer lugar, la transferencia del material de siembra desarrollado requiere mucha mano de obra, lo que tiene un efecto desfavorable en el precio de coste del material biológico. La contaminación del material de siembra o del material de siembra desarrollado con microorganismos se produce aún más fácilmente. Esto da como resultado que el material biológico no crezca o crezca muy mal. Esto también tiene un efecto desfavorable en el precio de coste. Además, el medio de agar a menudo todavía permanece en el material de siembra desarrollado a pesar del lavado. Finalmente, cuando este material de siembra se dispone (manualmente) sobre o en un sustrato sólido, existe un alto riesgo de que los microorganismos tales como hongos se multipliquen fácilmente en este medio de agar residual. Después del recipiente con el sustrato inerte sólido, como etapa final, el material de siembra cultivado se transfiere junto con el sustrato desde este recipiente y a un recipiente final o maceta provisto de compost para macetas o similar. El cultivo de material biológico consiste, por lo tanto, en diversas etapas de procesamiento y en la presente memoria es un procedimiento laborioso y relativamente costoso.
30

La presente invención tiene por objeto proporcionar una solución a los problemas mencionados anteriormente.

Un primer aspecto de la presente invención da como resultado un recipiente según la reivindicación 1.

La ventaja de dicho recipiente es que la penúltima etapa de transferir el material de siembra desarrollado desde un
35 segundo recipiente a un tercer recipiente con un sustrato inerte sólido ya no tiene que tener lugar. Las operaciones descritas anteriormente, tales como la transferencia y el lavado por este medio, ya no necesitan llevarse a cabo. Esto tiene un efecto favorable en el precio de coste. También se evita la contaminación del material de siembra con microorganismos.

Según la invención, además, al menos un lado del recipiente está cerrado por medio de una hoja metálica semipermeable. La ventaja de esto es que el recipiente está cerrado del entorno, por lo que se crea un llamado microentorno. La ventaja de este entorno es que las condiciones dentro del recipiente se pueden controlar con mucha precisión. La hoja metálica semipermeable juega un papel importante aquí, ya que se puede elegir de tal manera que, por ejemplo, sea permeable a determinados gases pero no a otros (por ejemplo, permeable al O₂ del exterior pero no al CO₂). De esta manera, las condiciones dentro del espacio del recipiente pueden establecerse de tal manera que
40 sean ideales para el material biológico para cultivar, como el material de siembra. Aquí se reconoce que el documento US-4908315 describe células de papel de aluminio formadas a partir de una sola lámina de hoja metálica semipermeable, doblada sobre sí mismas y termosellada para el cierre, así como una cadena de tales células. El recipiente es un recipiente externo en el que se coloca al menos un subrecipiente, en donde el subrecipiente recibe el sustrato inerte sólido con material de siembra. La ventaja de tal recipiente es que los subrecipientes pueden proporcionarse por separado del recipiente con el sustrato inerte, el medio de crecimiento y el material de siembra. Por lo tanto, es posible utilizar máquinas menos complejas. Una ventaja adicional es que, si uno de los subrecipientes se contaminara con un microorganismo indeseable, no se propagaría tan rápidamente sobre todos los demás recipientes. El recipiente comprende preferiblemente entre 1 y 500 subrecipientes.
50

El material de siembra se elige preferiblemente del grupo que comprende semillas tales como semillas vegetales de, por ejemplo, tomate, pepino y pimentón, semillas de plantas ornamentales tales como Gerbera, Anthurium, Bromelia, Orquídea y Spathiphyllum, y semillas de cultivos herbáceos, materiales vegetales triturados y singulares, embriones somáticos vegetales, esporas de helechos, brotes adventicios o axilares o partes de los mismos. El material vegetal desmenuzado comprende preferiblemente partes de helecho desmenuzado, helechos, saintpaulia, primula y lirio. Los
55

- brotes adventicios o axilares o partes de los mismos se originan preferiblemente de cultivos de hortalizas como tomate, pepino y pimentón. Los brotes adventicios o axilares o partes de los mismos se originan preferiblemente de plantas ornamentales como Gerbera, Anthurium, Bromelia, Orquídea, Spathiphyllum, helecho, Syngonium, lirio, o de cultivos herbáceos tales como la patata. Los embriones somáticos vegetales utilizados preferiblemente como material de siembra son los embriones somáticos de árboles, como por ejemplo los de coníferas (píceas, pino). La presente invención es particularmente importante para este grupo de material de siembra ya que estos son susceptibles a infecciones con microorganismos indeseables. Por lo tanto, también se recomienda que el material de siembra sea estéril. Se observa aquí que se entiende que estéril significa no solo una esterilidad absoluta, sino también un grado de esterilidad tal como es necesario para permitir que crezca el material de siembra.
- 5 El sustrato inerte sólido comprende preferiblemente lana de roca, lana de vidrio, fibra de coco, turba, fibras de cáñamo, espuma pura, compost para macetas y/o guata de celulosa o sustrato similar. La ventaja de estos sustratos es que son particularmente adecuados para cultivar material biológico debido a sus propiedades inertes. Además, la lana de roca, lana de vidrio, espuma pura y guata de celulosa en particular se pueden esterilizar fácilmente.
- 10 El medio de crecimiento comprende preferiblemente agua, sales (minerales) y/o azúcares, tales como un medio de agar y preferiblemente un medio de agar líquido o (altamente) diluido. Especialmente cuando la concentración de CO₂ dentro del recipiente es relativamente alta, preferiblemente no hay azúcares presentes, o solo unos pocos, en el medio de crecimiento. La ventaja de esto es que se fomenta el crecimiento autotrófico del material de siembra, por lo que finalmente se vuelve más fuerte.
- 15 El volumen del recipiente se proporciona preferiblemente con una mezcla de gases con una concentración incrementada de CO₂. La ventaja de esto es que se mejora el crecimiento autotrófico del material biológico.
- 20 Es más ventajoso cuando el recipiente está provisto de una válvula para administrar una mezcla de gases, nutrientes y/o agentes estimuladores del crecimiento, tales como una hormona, al volumen del recipiente. Al incorporar una válvula en el recipiente, el espacio dentro del recipiente se puede ajustar a las condiciones ideales del material biológico en ese momento.
- 25 Se recomienda además que el material de siembra se sitúe en una preparación de soporte. Se sitúa preferiblemente en un gel, tal como un gel a base de agar, en un líquido, del mismo modo, por ejemplo, a base de agar. La ventaja de esto es que la primera etapa del crecimiento del material de siembra tiene lugar en la preparación de soporte y una etapa posterior tiene lugar en el sustrato sólido ubicado debajo de la preparación de soporte. Una gran ventaja adicional del uso de una preparación de soporte es que el material de siembra puede disponerse sobre el sustrato inerte sólido de manera simple y totalmente automatizada. Esto tiene un efecto favorable sobre el precio de coste del material biológico, así como la posibilidad de contaminación por microorganismos. Además de una sustancia de soporte, la preparación de soporte comprende preferiblemente diferentes ingredientes que son necesarios o ventajosos para el crecimiento del material de siembra. Ejemplos de tales ingredientes son agua, sales, azúcares y algas. El medio de crecimiento añadido al sustrato inerte comprende preferiblemente agua, sales (minerales) y azúcares. Aquí se recomienda que el contenido de azúcares en el sustrato inerte sea menor que en la preparación de soporte.
- 30 Como se indicó, se recomienda que la preparación de soporte comprenda agar. La ventaja de esto es que es un medio muy estable y que pueden añadirse fácilmente al mismo ingredientes diferentes tales como agua, azúcares y sales (minerales).
- 35 Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un método para cultivar material biológico, que comprende las etapas según la reivindicación 8.
- 40 La ventaja de este método es que el material de siembra ya no tiene que ser cultivado primero en un segundo recipiente con un medio de agar y después en otro recipiente con un sustrato inerte sólido. Según la invención, estas dos etapas tienen lugar simultáneamente en un recipiente según la invención. La ventaja de esto es que se reduce la posibilidad de contaminación del material de siembra. Además, el material de siembra desarrollado ya no tiene que retirarse del recipiente con agar y lavarse manualmente. Esto tiene un efecto favorable en el precio de coste del material biológico cultivado.
- 45 Se recomienda además que, después del crecimiento, al menos una parte del sustrato inerte sólido con material de siembra con mayor crecimiento (desarrollo) se trasplante a un recipiente con un sustrato sustancialmente equivalente. La ventaja de esto es que se evita la llamada acción capilar, es decir, la extracción de humedad y nutrientes del sustrato sobre el que se ha desarrollado el material de siembra. Esto tiene un efecto favorable sobre la calidad del material biológico cultivado.
- 50 Un aspecto final de la presente invención se refiere al uso del recipiente descrito anteriormente en el cultivo de material biológico, según la reivindicación 10.
- 55 La invención se describirá ahora adicionalmente usando los siguientes dibujos y ejemplos. Estas figuras y ejemplos sirven solo a modo de ilustración de la invención y de ninguna manera pretenden limitar el alcance de la invención.

En los dibujos:

La figura 1 muestra una vista lateral esquemática de un recipiente, pero no según la invención;

La figura 2 muestra una vista lateral esquemática de un recipiente según la invención provisto de una pluralidad de subrecipientes.

5 La figura 1 muestra una vista lateral de un recipiente 1, pero no según la invención. Dentro de las paredes 2 del recipiente 1 se coloca un sustrato sólido inerte 3 que está provisto de medio de crecimiento. Una cantidad de material de siembra en el material de soporte 4 está dispuesta en el lado superior del sustrato 3. Cuando el material de siembra comienza a desarrollarse, el material de soporte 4 se agota y el material continúa creciendo en el sustrato 3. El sustrato 3 se puede separar del recipiente y se transfiere a una maceta con tierra abonada o sustrato similar.

10 La figura 2 muestra una vista lateral de un recipiente 1 según la invención. El recipiente 1 está provisto de una pluralidad de subrecipientes 6 colocados en el recipiente 1. Un sustrato inerte 3 está dispuesto en cada subrecipiente 6. Una preparación de soporte 4 con material de siembra está dispuesta sobre el sustrato 3. El recipiente 1 está cerrado a lo largo de las paredes laterales 2 por medio de material plástico transparente. El lado superior del recipiente 1 se cierra usando una hoja metálica semipermeable 5. Esta hoja metálica 5 asegura que la composición de gas del espacio interior 7 del recipiente 1 tenga la composición y humedad deseadas. La hoja metálica 5 asegura además que el material de siembra no se contamine con microorganismos no deseados. Para permitir que se cambie la composición de gas del espacio interior 7 del recipiente 1, se coloca una válvula 8 contra una de las paredes 2 del recipiente 1. Sin embargo, también se puede añadir medio de crecimiento adicional al sustrato 3 de los subrecipientes 6 a través de esta válvula 8.

20 Ejemplo 1

En un primer grupo, se colocaron subrecipientes 104 en condiciones estériles en un recipiente según la invención. Los subrecipientes se conectaron mutuamente en el lado superior de manera que formaron una bandeja. Dispuesto en los subrecipientes estaba lana de roca que estaba provista de un medio de crecimiento. Se sembró material de siembra en una preparación de soporte en la lana de roca. La preparación de soporte aquí comprendía agar-agar, agua, sales y azúcar. El material de siembra comprendía partes de helecho triturado del tipo *Nephrolepis exaltata* 'Corditas'. El recipiente, los subrecipientes, la lana de roca y la preparación de soporte con material de siembra eran todos estériles. Después se cerró el recipiente en condiciones estériles usando una hoja metálica semipermeable (PET 12/PE30). El recipiente con el material de siembra se incubó durante 40 días a 25 °C y en un intervalo de 16 horas de luz diurna y 8 horas de noche. Las plantas se incubaron hasta que fueron lo suficientemente grandes como para ser transferidas a una denominada bandeja de trasplante con tierra abonada. En esta bandeja de trasplante se colocaron en un invernadero y se mantuvieron allí hasta que fueron lo suficientemente grandes como para colocarlas en macetas.

35 En un segundo grupo, a un gran número de subrecipientes (104) estériles se les proporcionó una mezcla de agar sobre la cual se dispuso el material de siembra (partes de helecho trituradas del tipo *Nephrolepis exaltata* 'Corditas'). Los subrecipientes se colocaron en un recipiente estéril que se cerró por un lado utilizando una hoja metálica semipermeable (PET 12/PE30). El conjunto se incubó después en condiciones controladas, es decir, durante 49 días a 25 °C y un intervalo de día y noche de 16 y 8 horas respectivamente. Una vez que el material de siembra había formado suficientes raíces, el material de siembra se transfirió a una denominada bandeja de trasplante con tierra abonada. En esta bandeja de trasplante se colocaron en un invernadero y se mantuvieron allí hasta que fueron lo suficientemente grandes como para colocarlas en macetas.

40 La tabla 1 muestra el crecimiento de las plantas en un recipiente estéril hasta que pueden transferirse a una bandeja de trasplante con tierra abonada.

La tabla 2 muestra el crecimiento de las plantas en una bandeja de trasplante no estéril hasta el momento en que las plantas pueden colocarse en macetas.

45 Se entiende que el tiempo de crecimiento in vitro significa el tiempo requerido para que el material de siembra crezca en una planta procesable. Se entiende que el tamaño de la planta significa el diámetro de la planta en la parte superior. La altura de la planta designa la altura de la planta. Se entiende que la longitud de la raíz significa la longitud de las raíces en la lana de roca o en el agar. Se entiende que el tiempo de enraizamiento significa el tiempo necesario para crecer en una planta que puede ser en maceta. Finalmente, el porcentaje de fallo indica el porcentaje de material de siembra que no se convierte en una planta aceptable.

Tabla 1 Crecimiento hasta transferir a la bandeja de trasplante

	Grupo 1	Grupo 2
Tiempo de crecimiento in vitro	40 días	49 días
Tamaño de la planta in vitro	15 mm	11 mm
Altura de la planta in vitro	15 mm	10 mm
Longitud de la raíz in vitro	8 mm	3 mm

Tabla 2 Crecimiento hasta transferir a la maceta

	Grupo 1	Grupo 2
Tiempo de enraizamiento	26 días	34 días
Tamaño de la planta in vivo	130 mm	70 mm
Altura de la planta in vivo	50 mm	30 mm
Longitud de la raíz in vivo	80 mm	50 mm
Porcentaje de fallo	0%	5%

- 5 La tabla 1 muestra claramente que las plantas del grupo 2 necesitan más tiempo para crecer antes de poder colocarse en macetas. Se muestra además que las raíces de las plantas del grupo 1 están mejor desarrolladas.

La tabla 2 muestra claramente que el tiempo de enraizamiento en la bandeja de trasplante con tierra abonada es marcadamente más corto en las plantas del grupo 1. Esta tabla también muestra que el porcentaje de fallo del segundo grupo es mucho mayor que el del primer grupo.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Recipiente (1) para cultivar material biológico, comprendiendo un sustrato inerte sólido (3), un medio de crecimiento y material biológico dispuesto en o sobre el sustrato (3), en donde el recipiente (1) está sustancialmente cerrado, el recipiente es estéril hasta cierto punto de esterilidad necesaria para permitir que crezca el material de siembra, y el material biológico comprende material de siembra,
- caracterizado por que
- al menos un lado del recipiente está cerrado con una hoja metálica semipermeable (5), y
- el recipiente (1) es un recipiente externo en el que se coloca al menos un subrecipiente (6), en donde el subrecipiente (6) recibe el sustrato inerte sólido (3) con material de siembra.
- 10 2. Recipiente según la reivindicación 1, caracterizado por que el volumen del recipiente (1) está provisto de una mezcla de gases con una mayor concentración de CO₂, de modo que se mejora el crecimiento autotrófico del material biológico.
3. Recipiente según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que el recipiente (1) está provisto de una válvula (8) para administrar una mezcla de gases, nutrientes y/o agentes estimuladores del crecimiento, tales como una hormona.
- 15 4. Recipiente según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, caracterizado por que el material de siembra se sitúa en una preparación de soporte (4), preferiblemente en base agar.
5. Recipiente según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, caracterizado por que el material de siembra se elige del grupo que comprende semillas, material vegetal triturado o singularizado, embriones somáticos vegetales, esporas de helechos, brotes adventicios o axilares o partes de los mismos.
- 20 6. Recipiente según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, caracterizado por que el sustrato inerte sólido (3) comprende lana de roca, lana de vidrio, fibra de coco, espuma pura, turba, fibras de cáñamo, compost para macetas y/o guata de celulosa.
7. Recipiente según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, caracterizado por que el recipiente comprende entre 1 y 500 subrecipientes (6).
- 25 8. Método para cultivar material biológico, comprendiendo las etapas de:
- proporcionar material celular biológico estéril;
 - colocar el material celular en un primer recipiente estéril cerrado provisto de un medio de agar y permitir que el material celular crezca en este primer recipiente;
 - retirar el material celular crecido del primer recipiente y dividirlo en partes más pequeñas para formar material de siembra,
- 30 caracterizado por
- colocar el material de siembra en un segundo recipiente según cualquier reivindicación 1-7 para un mayor crecimiento,
 - disponer el material de siembra en o sobre un sustrato sólido inerte, en donde el sustrato es alojado por el
- 35 segundo recipiente,
- disponer un medio de crecimiento en el segundo recipiente, y
 - cerrar el segundo recipiente de manera estéril.
9. Método según la reivindicación 8, caracterizado por que después del crecimiento, al menos una parte del sustrato con material de siembra crecido adicional se trasplanta a un recipiente con un sustrato sustancialmente equivalente o idéntico.
- 40 10. Uso de un recipiente según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 en el cultivo de material biológico.

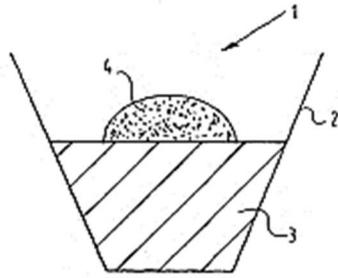


FIG. 1

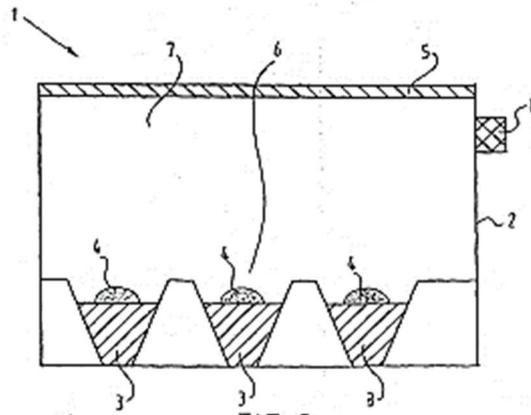


FIG. 2