(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 763 637**

(21) Número de solicitud: 201831164

(51) Int. CI.:

A01H 4/00 (2006.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación:

29.11.2018

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

29.05.2020

(71) Solicitantes:

INSTITUT DE RECERCA I TECNOLOGIA AGROALIMENTARIES (100.0%)
Torre Marimon
08140 Caldes de Montbui (Barcelona) ES

(72) Inventor/es:

DOLCET SANJUAN, Ramon J. y
MENDOZA MORALES, Carlos Rolando

(74) Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

(54) Título: **SISTEMA DE REACTOR PARA EL CULTIVO IN VITRO DE MATERIAL VEGETAL, KIT PARA TRANSFORMAR UN RECEPTÁCULO EN UN REACTOR APTO PARA DICHO SISTEMA, Y MÉTODO PARA EL CULTIVO IN VITRO DE MATERIAL VEGETAL MEDIANTE DICHO SISTEMA DE REACTOR**

(57) Resumen:

Sistema de reactor para el cultivo in vitro de material vegetal, kit para transformar un receptáculo en un reactor apto para dicho sistema, y método para el cultivo in vitro de material vegetal mediante dicho sistema de reactor.

Comprende un receptáculo (1) para el cultivo del material (11) vegetal, una tapa (2) para cerrar una abertura (3) de dicho receptáculo (1), y medios (8, 9) para permitir la entrada y/o salida de gas de dicho receptáculo (1), y se caracteriza por el hecho de que comprende un recipiente (4) para recibir un medio de cultivo líquido en el interior del receptáculo (1), y medios (6, 7) para sustentar el material (11) vegetal sobre dicho recipiente (4) de recepción, donde dicho recipiente (4) está unido a la tapa (2) del receptáculo (1) en una posición apta para uso, incluyendo dicha tapa (2) al menos un conducto (5) de entrada y/o salida de medio que comunica con el recipiente (4) para poder llenar y/o vaciar dicho recipiente (4) a través de dicho conducto (5).

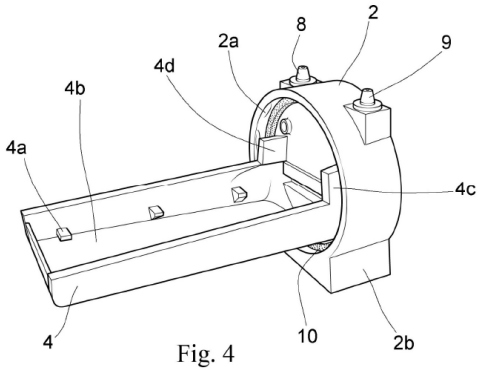

Fig. 4

ES 2 763 637 A1

DESCRIPCIÓN

SISTEMA DE REACTOR PARA EL CULTIVO IN VITRO DE MATERIAL VEGETAL, KIT PARA TRANSFORMAR UN RECEPTÁCULO EN UN REACTOR APTO PARA DICHO SISTEMA, Y MÉTODO PARA EL CULTIVO IN VITRO DE MATERIAL VEGETAL MEDIANTE DICHO SISTEMA DE REACTOR.

La presente invención se refiere a un sistema de reactor para la propagación clonal de plantas que comprende un receptáculo para el cultivo in vitro de material vegetal. También se refiere a un kit adecuado para transformar un receptáculo en un reactor de cultivo in vitro de material vegetal apto para dicho sistema, y a un método para el cultivo in vitro de material vegetal mediante dicho sistema de reactor.

Antecedentes de la invención

Son conocidos sistemas de reactores para el cultivo in vitro de material vegetal, como por ejemplo los sistemas de reactores de la marca Plantform ® o de la marca Rita ®, que comprenden un receptáculo provisto de una bandeja para sustentar el material vegetal, una tapa para cerrar una abertura del receptáculo y una pluralidad de conductos de inyección de aire con los que se consigue el bombeo temporal de un medio de cultivo líquido almacenado en el fondo del receptáculo de cultivo. El sistema de inmersión temporal del material vegetal en un medio de cultivo líquido presenta la ventaja respecto de otros sistemas de cultivo in vitro, de que proporciona una distribución uniforme de nutrientes, lo que redunda en un crecimiento más rápido del material vegetal y en un incremento de la calidad del material que se obtiene.

Los sistemas de reactores Plantform ® o Rita ® presentan la ventaja de que ocupan poco espacio, por lo que resultan fáciles de colocar y almacenar en las cámaras de cultivo in vitro. Sin embargo, estos sistemas de reactores presentan el inconveniente de que el medio de cultivo líquido permanece en contacto con el receptáculo durante el cultivo, dificultando el cambio de medio, así como el manejo del reactor para acceder cómodamente al material vegetal durante la fase de corte y recolección.

Existen otros sistemas de reactores, como por ejemplo, los sistemas de reactores de la marca Setis ®, que incluyen dos receptáculos independientes con sus respectivas tapas que comunican entre sí. Un primer receptáculo se emplea para el crecimiento del material vegetal mientras que un segundo receptáculo se emplea para almacenar el medio de cultivo líquido,

el cual es bombeado periódicamente a través de un conector hasta el primer receptáculo para llevar a cabo la inmersión temporal del material vegetal en el medio de cultivo. El primer receptáculo en que se aloja el material vegetal se apila sobre el segundo receptáculo e incluye un fondo inclinado para facilitar el drenaje del medio de cultivo líquido.

El sistema de reactor Setis ® presenta la ventaja de que facilita el cambio del medio durante la fase de crecimiento del material vegetal, puesto que dispone de un receptáculo independiente que puede ser desconectado para esterilizarse y reemplazar el medio de cultivo líquido que se aloja en su interior. Sin embargo, este sistema de reactor presenta el inconveniente de que ocupa espacio en las cámaras de cultivo in vitro. Además, la presencia de dos receptáculos dificulta el manejo del sistema, y en particular, el acceso al material vegetal para realizar el corte y recolección.

Descripción de la invención

El objetivo de la presente invención es el proporcionar un sistema de reactor para el cultivo in vitro de material vegetal que resuelve los inconvenientes citados, presentando las ventajas que se describirán a continuación.

De acuerdo con este objetivo, según un primer aspecto, la presente invención proporciona un sistema de reactor para el cultivo in vitro de material vegetal, que comprende un receptáculo para el cultivo del material vegetal, una tapa adaptada para cerrar una abertura de dicho receptáculo**,** y medios para permitir la entrada y/o salida de gas de dicho receptáculo.

El sistema se caracteriza por el hecho de que comprende un recipiente para recibir un medio de cultivo líquido en el interior del receptáculo y medios para sustentar el material vegetal sobre dicho recipiente de recepción, donde dicho recipiente está unido a la tapa del receptáculo en una posición apta para uso, incluyendo dicha tapa al menos un conducto de entrada y/o salida de medio que comunica con el recipiente para poder llenar y/o vaciar dicho recipiente a través de dicho conducto.

En el sistema de reactor reivindicado, el medio de cultivo es bombeado desde el exterior a través de un conducto que comunica la tapa con el recipiente que recibe el medio líquido y a su vez sustenta el material vegetal. Este recipiente está unido, preferiblemente de forma solidaria, a la tapa del receptáculo de cultivo en una posición apta para uso, de modo que al retirar la tapa se extrae simultáneamente el recipiente sobre el que se sustenta a su vez el

material vegetal. Gracias a ello, el acceso al material vegetal para realizar el corte o recolección resulta muy cómodo y fácil.

Otra ventaja del sistema reivindicado radica en el hecho de que el medio de cultivo no entra nunca en contacto con el receptáculo de cultivo, puesto que la entrada y salida del medio se produce a través de al menos un conducto que comunica directamente la tapa con el recipiente de recepción del medio. Gracias a ello, las dimensiones del receptáculo de cultivo pueden ser reducidas, y además, la forma y tamaño del receptáculo puede ser muy variada, con la única condición de que las dimensiones de la abertura hagan viable siempre la introducción del recipiente unido a la tapa en una posición apta para su uso. De hecho, en el sistema reivindicado, el receptáculo puede ser, por ejemplo, un receptáculo convencional de vidrio, u otro material, de los que están disponibles en el mercado para múltiples usos, que incluyen, por ejemplo, una abertura provista de rosca susceptible de ser cerrada y sellada por una tapa del sistema adaptada con una rosca complementaria.

Según un segundo aspecto, la presente invención proporciona un kit para transformar un receptáculo en un reactor para el cultivo in vitro de material vegetal, que se caracteriza por el hecho de que comprende;

a) una tapa adaptada para cerrar una abertura de dicho receptáculo,
b) un recipiente para recibir un medio de cultivo líquido en el interior del receptáculo, estando dicho recipiente unido a la tapa del receptáculo en una posición apta para uso, e incluyendo dicha tapa al menos un conducto de entrada y/o salida del medio de cultivo que comunica con el recipiente para poder llenar y/o vaciar dicho recipiente a través de dicho conducto, y
c) medios para sustentar el material vegetal sobre dicho recipiente de recepción del medio de cultivo.

La presente invención proporciona un kit que permite transformar un receptáculo, por ejemplo, un receptáculo comercial de diversas formas, dimensiones y materiales, en un reactor para el cultivo in vitro de material vegetal apto para el sistema reivindicado. Este reactor puede emplearse para cultivar in vitro material vegetal para uso industrial, uso de investigación o uso doméstico alimentario. Por ejemplo, el kit puede emplearse para transformar un receptáculo convencional en un reactor que permite el cultivo in vitro de semillas de soja cuyos brotes pueden tener un uso comercial o doméstico de tipo alimentario.

En particular, el kit proporciona una tapa adaptada para cerrar la abertura de un receptáculo. Esta tapa puede ser, por ejemplo, una tapa provista de una rosca y adaptada para cerrar y

sellar por roscado una abertura de un receptáculo convencional, por ejemplo, un receptáculo convencional de vidrio, u otro material, de los que están disponibles en el mercado para múltiples usos.

La tapa del kit presenta la particularidad de que está unida a un recipiente de recepción de un medio de cultivo líquido sobre el que se sustenta el material vegetal en una posición apta para uso, por lo que la abertura del receptáculo debe de permitir el paso de este recipiente para poder acoplar la tapa. Al retirar la misma tapa o el receptáculo, se extrae o accede al recipiente de recepción que incluye el medio de cultivo y el material vegetal, quedando el receptáculo de cultivo libre e intacto. El llenado del recipiente de recepción se produce a través de un conducto previsto en la propia tapa para alimentar el medio de cultivo procedente de un depósito exterior.

Según una realización, el recipiente de recepción del medio de cultivo está unido a la tapa de modo que en una posición apta para uso se extiende longitudinalmente en el interior del receptáculo de cultivo desde una cara interior del cuerpo de la tapa. Por ejemplo, el recipiente puede extenderse longitudinalmente en el interior del receptáculo de cultivo unido a la tapa de modo que no contacta con las paredes de este receptáculo. Gracias a estas características, a diferencia de los sistemas de reactores del estado de la técnica, el sistema de reactor reivindicado permite trabajar con menores volúmenes de medio de cultivo, ahorrando costes y espacio.

Preferiblemente, según una realización preferida, el cuerpo de la tapa comprende una base de soporte configurada para poder mantener el receptáculo y el recipiente de recepción del medio de cultivo líquido en una posición horizontal estable, cuando el receptáculo está unido a la tapa.

Esta configuración particular de la tapa presenta la ventaja de que permite maximizar la superficie útil de cultivo del recipiente de recepción del medio de cultivo, que se extiende longitudinalmente unido a la tapa en una posición horizontal en el interior del receptáculo. Gracias a ello es posible cultivar un gran número de unidades de material vegetal de una forma muy cómoda. Otra ventaja radica en el hecho de que el técnico puede manipular el material vegetal manteniendo el conjunto de recipiente y tapa en una posición horizontal estable.

Ventajosamente, el extremo del recipiente de recepción unido a la cara interior de la tapa, incluye unas paredes laterales recrecidas adaptadas para entrar en contacto con la abertura

del receptáculo. Estas paredes laterales se acoplan a la abertura del receptáculo y tienen la función de evitar la caída del material vegetal fuera del receptáculo, o evitar el contacto del material vegetal con las partes externas del receptáculo o con las manos de técnico en el momento de la extracción del material vegetal.

Otra vez ventajosamente, el recipiente de recepción del medio de cultivo incluye una cavidad provista de un orificio para poder drenar de forma activa o pasiva el medio de cultivo líquido hasta el conducto de salida y/o entrada de medio de cultivo de la tapa. Opcionalmente, el fondo interior del recipiente de recepción puede estar configurado con una pendiente para facilitar el drenaje del líquido hasta el orificio de salida. Este orificio puede aprovecharse para inyectar a través de él el medio de cultivo líquido procedente de un conducto asociado a un depósito exterior en el que se almacena dicho medio de cultivo.

Preferiblemente, la tapa del receptáculo comprende al menos un orificio para la entrada y/o salida de gas del receptáculo. A través de este orificio puede inyectarse un gas para modificar la atmósfera interior del receptáculo, si fuera necesario.

Otra vez preferiblemente, los medios de sustentación del material vegetal comprenden al menos un cuerpo, por ejemplo, un cuerpo a modo de plataforma, adaptado para quedar acoplado de forma amovible al recipiente que recibe el medio de cultivo líquido, estando configurado dicho cuerpo para permitir el contacto del medio de cultivo líquido con el material vegetal.

Según una realización, el cuerpo sobre el que se sustenta el material vegetal comprende una plataforma de soporte provista de una pluralidad de perforaciones para permitir el paso de un flujo ascendente de medio de cultivo líquido. Esta plataforma está adaptada para quedar anclada en el interior del recipiente de forma amovible, manteniendo una distancia predeterminada con el fondo del mismo recipiente.

Según una realización distinta, en lugar de una plataforma, el cuerpo que sustenta el material vegetal y permite el paso de líquido puede estar configurado, por ejemplo, a modo de tejido, como por ejemplo, un tejido poroso, o una membrana permeable, o material inerte que permite el paso de líquido. Este cuerpo estará dispuesto sobre el recipiente de recepción del medio de cultivo.

Ventajosamente, el sistema comprende medios para sujetar el material vegetal susceptible de crecer sobre el recipiente de recepción del medio de cultivo. Estos medios de sujeción se

acoplan de forma amovible sobre el recipiente de recepción, o más concretamente, sobre la plataforma de sustentación que está anclada al recipiente de recepción del medio de cultivo de modo que permite el paso de los brotes o partes con crecimiento del material vegetal.

Preferiblemente, los medios de sustentación están configurados a modo de rejilla, de modo que el entramado de esta rejilla sujeta la base del material vegetal que crece sobre el recipiente de recepción o, más concretamente, sobre la plataforma de sustentación de dicho material vegetal.

La sujeción del material vegetal mediante una rejilla, o cualquier otro medio similar o equivalente, facilita el corte y recolección de brotes, puesto que mantiene en posición los explantes, sin necesidad de manipularlos manualmente, cuando el recipiente de recepción se inclina o invierte sujeto por la tapa para facilitar las operaciones de corte y recolección del material vegetal. Cuando se realizan estas operaciones la cavidad del recipiente está libre de medio de cultivo líquido, puesto que el medio ha sido previamente drenado a través del conducto de salida de líquido de la tapa.

Otra vez preferiblemente, el sistema de reactor reivindicado comprende medios para bombear con una frecuencia predeterminada el medio de cultivo líquido a través del al menos un conducto de entrada y/o salida de medio de cultivo de la tapa, posibilitando dicho bombeo la inmersión temporal del material vegetal dispuesto sobre los medios de sustentacion del recipiente de recepción del medio de cultivo.

De acuerdo con un tercer aspecto, la presente invención proporciona Método para cultivar in vitro material vegetal en un receptáculo mediante el sistema de reactor reivindicado, que comprende las etapas de;

a) inyectar un medio de cultivo líquido en el interior del receptáculo de cultivo a través de al menos un conducto de entrada previsto en una tapa unida a un recipiente de recepción del medio de cultivo,
b) mantener temporalmente inmerso en el medio de cultivo líquido un material vegetal previamente depositado sobre el recipiente de recepción que está unido a la tapa,
c) drenar de forma activa o pasiva el medio de cultivo líquido a través de un conducto de salida previsto en la tapa,
d) después de la etapa c) acceder al recipiente de recepción del medio de cultivo y al conjunto del material vegetal depositado sobre el recipiente, para llevar a cabo el corte y recolección en el exterior del receptáculo.

El método cultivo in vitro reivindicado presenta la ventaja de que permite obtener una mayor tasa de multiplicación del material vegetal, puesto que los brotes son más largos, de mayor peso fresco y con hojas más grandes que las que se obtienen con otros métodos de cultivo. Esto es así gracias a que el sistema de reactor permite practicar una frecuencia de inmersión temporal de medio líquido óptima, garantizando en todo momento también un óptimo drenaje del medio a través del conducto de salida provisto en la tapa y que comunica de forma directa con el orificio de drenaje del propio recipiente.

Por otro lado, el método reivindicado permite acceder al material vegetal de una forma muy fácil, retirando la tapa o el receptáculo para acceder al recipiente de recepción y al material vegetal que se sostiene sobre el recipiente de recepción. Una vez en el exterior del receptáculo, el recipiente puede invertirse o inclinarse para facilitar el corte y recolección del material vegetal. Además, para las realizaciones en las que la tapa está provista de una base de soporte configurada para poder mantener el propio recipiente en una posición horizontal estable, el manejo del material vegetal resulta extremadamente ágil.

Opcionalmente, el método reivindicado comprende la etapa de modificar la atmósfera interior del receptáculo de cultivo inyectando gas a través de al menos un conducto de la tapa que comunica con el interior del receptáculo.

En la presente invención;

Por material vegetal se entenderá cualquier tipo de material susceptible de crecer, o de ser multiplicado o propagado vegetativamente, por ejemplo, un material que contenga o consista en tejidos vegetales, órganos vegetales, semillas y/o células vegetales, preferiblemente, dicho material puede consistir en explantes o tejidos vivos aislados de su órgano propio, preparados de forma aséptica.

Por receptáculo de cultivo se entenderá un contenedor o envase en el que se lleva a cabo el crecimiento del material vegetal.

Por cultivo in vitro se entenderá un cultivo de material vegetal para uso industrial, uso en investigación, uso comercial alimentario o uso doméstico, susceptible de llevarse a cabo mediante el sistema reivindicado ya sea en instalaciones industriales, laboratorios de investigación, locales comerciales, o en el hogar de un usuario. El cultivo in vitro comprende material vegetal, como por ejemplo, explantes o partes de una planta o semilla, que se lleva a cabo en condiciones de temperatura, fotoperiodo e intensidad de luz controladas, con medios de cultivo formulados en función de unos objetivos predeterminados. Opcionalmente, el material vegetal puede comprender agentes bióticos, por ejemplo, bacterias y/o hongos, o

agentes abióticos, por ejemplo compuestos químicos añadidos al medio líquido de cultivo.

Breve descripción de las figuras

Para mejor comprensión de cuanto se ha expuesto se acompañan unos dibujos en los que, esquemáticamente y tan sólo a título de ejemplo no limitativo, se representa un caso práctico de realización.

La figura 1 es una vista en perspectiva de una realización del receptáculo de cultivo del sistema de reactor de la presente invención.

La figura 2 es una vista en perspectiva de unos medios de sujeción del material vegetal configurados a modo de rejilla que forma un entramado.

La figura 3 es una vista en perspectiva de unos medios para sustentar el material vegetal sobre el recipiente de recepción del medio de cultivo, que están configurados a modo de plataforma provista de una pluralidad de perforaciones para permitir el flujo ascendente del medio de cultivo líquido.

La figura 4 es una vista en perspectiva de un conjunto de tapa y recipiente de recepción de medio de cultivo líquido, que está unido a la tapa por su cara interior. Esta tapa está adaptada para cerrar la abertura del receptáculo de la figura 1.

La figura 5 es una vista en perspectiva explosionada que representa de forma esquemática el montaje del sistema de reactor con el kit reivindicado.

La figura 6 es una vista en perspectiva que muestra el sistema de reactor en fase de cultivo, cuando el recipiente de recepción de medio de cultivo es alimentado desde el exterior a través de un conducto provisto en la tapa para realizar la inmersión temporal del material vegetal. Las flechas indican la entrada del medio líquido que provoca la salida simultánea de aire del interior del receptáculo de cultivo.

La figura 7 es una vista en perspectiva que muestra el sistema de reactor en fase de cultivo, cuando el medio de cultivo líquido abandona el recipiente a través del conducto de la tapa. Las flechas indican la salida del medio líquido que provoca la entrada simultánea de aire al receptáculo de cultivo.

Descripción de una realización preferida

A continuación se describe una realización preferida del sistema y kit de la presente invención haciendo referencia a las figuras 1 a 7.

Tal y como se ha comentado en los apartados anteriores, la presente invención proporciona un sistema de reactor y un kit adecuado para transformar un receptáculo 1 convencional, como el que muestra la figura 1, en un reactor para el cultivo in vitro de material vegetal.

En la realización que se describe, el kit consta de los siguientes componentes;

- una tapa 2 para cerrar el receptáculo 1 donde se lleva a cabo el cultivo,
- un recipiente 4 de recepción del medio de cultivo líquido (no representado) que está unido a la tapa 2,
- un cuerpo 6 a modo de plataforma con perforaciones 6ª que permite sustentar el material 11 vegetal sobre el recipiente 4,
- un cuerpo 7 a modo de rejilla susceptible de ser acoplado de forma amovible sobre el cuerpo 6 o plataforma de sustentación, al objeto de sujetar la base del material 11 vegetal y facilitar el corte y recolección de los brotes de dicho material 11 vegetal,
- un conducto 5 para la entrada y/o salida del medio de cultivo líquido a través de la tapa 2, y
- dos orificios 8, 9 para la entrada y/o salida de gases del receptáculo 1 de cultivo.

La tapa 2 puede ser, por ejemplo, una tapa 2 provista de una rosca 2a y adaptada para cerrar y sellar por roscado 1a la abertura 3 del receptáculo 1 convencional, que en la realización que se describe, es un receptáculo 1 de vidrio o policarbonato, disponible en el mercado para múltiples usos. Adherida a la tapa 2 se ha dispuesto una junta 10 de estanqueidad para asegurar el sellado del conjunto.

El sistema de reactor incluye unos medios (no representados) para bombear con una frecuencia predeterminada el medio de cultivo líquido procedente de un depósito exterior (no representado) hasta el recipiente 4 de recepción.

En la realización que se describe, la tapa 2 presenta la particularidad de que incluye un base 2b de soporte configurada para poder mantener el receptáculo 1 y el recipiente 4 de recepción del medio de cultivo en una posición horizontal estable. Tal y como puede verse en las figuras 4 a 7, el recipiente 4 de recepción del medio de cultivo se extiende longitudinalmente unido de forma solidaria a la tapa 2, desde una cara interior de dicha tapa 2, de modo que queda dispuesto en posición horizontal estable, sustancialmente paralelo a las paredes del receptáculo 1a de cultivo, pero sin contactar con estas paredes.

Tal y como se ha comentado en la descripción de la invención, esta configuración particular permite maximizar la superficie útil de cultivo y también trabajar con menores volúmenes de medio de cultivo, lo que ahorra coste y espacio.

La figura 4 muestra una vista en perspectiva del conjunto de tapa 2 y recipiente 4 de recepción unido a la tapa 2. En esta figura se aprecia el fondo inclinado 4b para el drenaje activo o pasivo del medio de cultivo a través de un orificio que comunica con la tapa 2 y el conducto 5 de salida de medio de cultivo líquido. Las paredes laterales del recipiente 4 incluyen unos salientes 4a que sirven de base de apoyo del cuerpo 6 o plataforma sobre la que sustenta el material vegetal. Estos salientes 4a están posicionados a media altura de las paredes del recipiente 4, de modo que el cuerpo 6 o plataforma sobre la que se disponen los explantes puede quedar inundado de medio líquido cuando el medio de cultivo pasa a través de las perforaciones 6a (ver figura 3).

Continuando con la descripción de la figura 4, se observa que el recipiente 4 incluye en el extremo que contacta con la cara interior de la tapa 2 unas paredes 4d recrecidas adaptadas para encajar en las paredes de la abertura 3, de modo que evitan el vertido de medio líquido cuando el técnico bascula ligeramente el reactor o el conjunto de tapa 2 y recipiente 4 de recepción para por ejemplo, llevar a cabo el corte del material vegetal.

La figura 2 muestra una vista en perspectiva del cuerpo 7 a modo de rejilla, provisto de un entramado que es atravesado por los brotes del material 11 vegetal (ver figuras 6 y 7). Este entramado sirve para sujetar la base de los explantes cuando el recipiente 4 es basculado para facilitar el corte y recolección rápido de los brotes. Esta rejilla o cuerpo 7 incluye unas paredes 7a laterales que quedan dispuestas sobre la plataforma o cuerpo 6 de sustentación, a una cierta distancia de dicha plataforma.

Tal y como se ha comentado en la descripción de la invención, a diferencia de los sistema de reactor del estado de la técnica, el sistema de reactor de la presente invención presenta la ventaja de que la recolección o corte de los brotes se lleva a cabo accediendo al conjunto de tapa 2 y recipiente 4 desde el exterior del receptáculo 1, de modo que el técnico puede incluso bascular ligeramente este conjunto para facilitar el corte rápido del material 11 vegetal en diferentes posiciones.

A continuación se describe el método de cultivo in vitro de material 11 vegetal mediante el sistema de reactor reivindicado y descrito en las figuras adjuntas.

Una vez realizado el montaje de los diferentes componentes siguiendo la disposición que muestra de forma esquemática la figura 5, se procede a conectar unos filtros de aire (no representados) en los orificios 8 y 9 de entrada y salida de gases de la tapa 2, y un tubo al conducto 5 de entrada y salida de medio de cultivo líquido. El conjunto es esterilizado antes de ser usado para el cultivo de los explantes al objeto de garantizar unas condiciones estériles.

Tras la esterilización, se accede al conjunto de recipiente 4 y tapa 2 en el interior de una cabina de flujo laminar y, en condiciones estériles, se deposita el material 11 vegetal sobre la plataforma o cuerpo 6 aprovechando las aberturas que deja el entramado del cuerpo 7 o rejilla de sujeción de los explantes.

Una vez depositado el material 11 vegetal, se introduce el conjunto de recipiente 4 y tapa 2 en el interior del receptáculo 1 de cultivo y se dispone en una cámara de cultivo in vitro, en condiciones controladas de temperatura, fotoperiodo e intensidad lumínica. A continuación se inyecta el medio de cultivo líquido en el interior del receptáculo 1 a través el conducto 5 de entrada previsto en la tapa 2 hasta que el material 11 vegetal queda inmerso en el medio. La inyección se lleva a cabo de forma periódica desde un depósito exterior (no representado) mediante unos medios de bombeo, y empleando temporizadores.

Durante el cultivo, el material 11 vegetal queda temporalmente inmerso según el sistema de cultivo de inmersión temporal, ya conocido en el estado de la técnica. La fase de inmersión es corta, de unos pocos minutos, para humedecer a los explantes, dejándolos impregnados de medio de cultivo. Cuando cesa la inyección, el medio es drenado del fondo inclinado 4b a través del mismo conducto 5 de la tapa 2 que actúa en este momento de conducto de salida (ver figura 7). Durante la inyección, el aire del interior del receptáculo 1 sale por los orificios 8, 9 previstos en la tapa 2 y asociados a los filtros (no representados) (ver figura 6). Sin embargo, al detener la inyección y drenar el medio, entra aire nuevo a través de los mismos orificios 8 y 9. En caso de ser necesario, la atmósfera interior del receptáculo 1 de cultivo puede modificarse inyectando un gas.

El material 11 vegetal permanece impregnado de medio durante horas, creciendo en el interior del receptáculo 1 de cultivo en unas condiciones de luz y temperatura controladas. Cuando es necesario realizar un corte o recolección, el técnico accede al conjunto de recipiente 4 y tapa 2, desenroscando en este caso el receptáculo 1. La base 2b de soporte de la tapa 2 permite que el recipiente 4 se mantenga en una posición horizontal estable para llevar a cabo el corte con precisión.

Tal y como se ha comentado en la descripción de la invención, el método de cultivo descrito permite obtener una mayor tasa de multiplicación del material 11 vegetal, siendo los brotes más largos, de mayor peso fresco y de hojas más grandes, que las que se obtienen con otros métodos de cultivo que emplean otros sistemas de reactores.

La tabla que sigue a continuación muestra los resultados de un ensayo de cultivo realizado empleando un sistema de reactor de la marca Rita ® y el sistema de reactor reivindicado.

Tipo de cultivo in vitro	Número de explantes iniciales por receptáculo	Núm. de brotes nuevos obtenidos/ receptáculo	Tasa de multiplicación Núm. de brotes obtenidos/ explantes iniciales	Longitud media de los brotes (mm)	Peso fresco por brote (g)
Con medio líquido mediante un reactor RITA®	15	70-100	5	20	0,5
Con medio líquido mediante el sistema de reactor de la presente invención	80	400-700	8	40	0,7

Los resultados muestran que el número de explantes iniciales por receptáculo de cultivo es muy superior en el sistema de reactor de la presente invención. También es superior el número de brotes finales obtenidos y la longitud media y peso de los brotes.

A pesar de que se ha hecho referencia a una realización concreta de la invención, es evidente para un experto en la materia que el sistema de reactor y kit descrito es susceptible de numerosas variaciones y modificaciones, y que todos los detalles mencionados pueden ser substituidos por otros técnicamente equivalentes, sin apartarse del ámbito de protección definido por las reivindicaciones adjuntas. Por ejemplo, aunque se ha descrito una realización en la que la tapa 2 incluye una base 2b de soporte y el receptáculo 1 es de tipo convencional, el mismo sistema de reactor sería viable con un receptáculo que incluyera una base de soporte que permitiera mantener igualmente el conjunto en posición horizontal estable. En este caso, no sería necesario que la tapa tuviera una base de soporte y el conjunto de tapa y recipiente podría extraerse igualmente para realizar el corte y recolección, a pesar de que, una vez extraído del receptáculo, no podría por sí solo mantenerse en una posición horizontal estable. De igual modo, aunque se han descrito unos medios de sustentación y sujeción del material 11 vegetal configurados a modo de plataforma y rejilla, resultados similares podrían obtenerse con otros medios de sustentación y sujeción del material vegetal a condición de que dichos medios permitieran que el material vegetal pudiera quedar igualmente impregnado por el medio de cultivo almacenado en la cavidad del recipiente 4 unido a la tapa 2.

REIVINDICACIONES

1. Sistema de reactor para el cultivo in vitro de material vegetal, que comprende un receptáculo (1) para el cultivo del material (11) vegetal, una tapa (2) para cerrar una abertura (3) de dicho receptáculo (1)**,** y medios (8, 9) para permitir la entrada y/o salida de gas de dicho receptáculo (1), **caracterizado** por el hecho de que comprende un recipiente (4) para recibir un medio de cultivo líquido en el interior del receptáculo (1), y medios (6, 7) para sustentar el material (11) vegetal sobre dicho recipiente (4) de recepción, donde dicho recipiente (4) está unido a la tapa (2) del receptáculo (1) en una posición apta para uso, incluyendo dicha tapa (2) al menos un conducto (5) de entrada y/o salida de medio que comunica con el recipiente (4) para poder llenar y/o vaciar dicho recipiente (4) a través de dicho conducto (5).

2. Sistema de reactor según la reivindicación 1, en el que el recipiente (4) de recepción del medio de cultivo está unido a la tapa (2) de modo que, en una posición apta para uso, se extiende longitudinalmente desde una cara del cuerpo de la tapa (2) en el interior del receptáculo (1).

3. Sistema de reactor según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el cuerpo de la tapa (2) comprende una base (2b) de soporte configurada para poder mantener el receptáculo (1) y el recipiente (4) de recepción del medio de cultivo líquido en una posición horizontal estable.

4. Sistema de reactor según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 3, en el que el extremo de dicho recipiente (4) de recepción, que está unido a la cara interior de la tapa (2), incluye unas paredes (4c, 4d) laterales recrecidas adaptadas para entrar en contacto con la abertura (3) del receptáculo (1) y facilitar el corte del material vegetal sin dañar la tapa (2).

5. Sistema de reactor según la reivindicación 1, en el que dicho recipiente (4) de recepción del medio de cultivo incluye una cavidad provista de un fondo inclinado (4b) y un orificio para drenar el medio de cultivo líquido hasta el al menos conducto (5) de salida y/o entrada de medio de cultivo.

6. Sistema de reactor según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dichos medios de sustentación del material (11) vegetal comprenden al menos un cuerpo (6) adaptado para quedar acoplado de forma amovible al recipiente que recibe el medio de cultivo líquido, estando configurado dicho cuerpo para permitir el contacto del medio de cultivo líquido con el material (11) vegetal.

7. Sistema de reactor según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende medios (7) para sujetar el material (11) vegetal susceptible de crecer sobre dichos medios de sustentación acoplados al recipiente (4) de recepción del medio de cultivo.

8. Sistema de reactor según la reivindicación 7, en el que dichos medios (7) de sujeción están configurados a modo de rejilla, siendo susceptible el entramado de dicha rejilla de sujetar la base del material (11) vegetal que crece sobre el recipiente (4) de recepción del medio de cultivo.

9. Sistema según la reivindicación 1, en el que dichos medios de entrada y/o salida de gas del receptáculo comprenden al menos un orificio (8, 9) previsto en la tapa (2) para la entrada y/o salida de gas.

10. Sistema de reactor según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho receptáculo está provisto de una abertura (3) dimensionada para permitir la introducción del recipiente (4) de recepción del medio de cultivo líquido que está unido a la tapa (2) de cierre del receptáculo (1).

11. Sistema de reactor según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 10, en el que la abertura (3) de dicho receptáculo incluye una rosca (1a) y dicha tapa (2) está adaptada para cerrar y sellar por roscado dicha abertura (3), comprendiendo dicha tapa (2) una base (2b) de soporte configurada para mantener el receptáculo (1) y el recipiente (4) en una posición horizontal estable mientras dicho receptáculo (1) está acoplado a la tapa (2).

12. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende medios para bombear con una frecuencia predeterminada el medio de cultivo líquido a través de dicho al menos un conducto (5) de entrada y/o salida de medio de cultivo de la tapa (2), posibilitando dicho bombeo la inmersión temporal del material (11) vegetal

dispuesto sobre los medios (6) de sustentación del recipiente (4) de recepción del medio de cultivo.

13. Kit para transformar un receptáculo (1) en un reactor apto para el cultivo in vitro de material (11) vegetal, **caracterizado** por el hecho de que comprende;
    a) una tapa (2) adaptada para cerrar una abertura (3) de dicho receptáculo (1),
    b) un recipiente (4) para recibir un medio de cultivo líquido en el interior del receptáculo (1), estando dicho recipiente unido a la tapa (2) del receptáculo (1) en una posición apta para uso, e incluyendo dicha tapa (2) al menos un conducto (5) de entrada y/o salida del medio de cultivo que comunica con el recipiente (4) para poder llenar y/o vaciar dicho recipiente (4) a través de dicho conducto (5), y
    c) medios (6) para sustentar el material (11) vegetal sobre el recipiente (4) de recepción del medio de cultivo.

14. Kit según la reivindicación 13, en el que el recipiente (4) de recepción del medio de cultivo está unido a la tapa (2) de modo que se extiende longitudinalmente desde una cara del cuerpo de la tapa (2).

15. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 14, en el que la tapa (2) incluye una base (2b) de soporte adaptada para poder mantener el recipiente (4) de recepción del medio de cultivo en una posición horizontal estable.

16. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en el que dichos medios de sustentación del material (11) vegetal comprenden al menos un cuerpo (6) susceptible de ser acoplado de forma amovible al recipiente (4) de recepción del medio de cultivo líquido, estando configurado dicho cuerpo (6) para permitir el contacto del medio de cultivo líquido con el material (11) vegetal.

17. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, que comprende medios (7) para sujetar el material (11) vegetal cuando dicho material crece sobre el recipiente (4) de recepción del medio de cultivo.

18. Kit según la reivindicación 17, en el que dichos medios (7) de sujeción están configurados a modo de rejilla, siendo susceptible el entramado de dicha rejilla de

sujetar la base del material (11) vegetal susceptible de crecer sobre el cuerpo (6) de sustentación acoplado al recipiente (4) de recepción de medio de cultivo.

19. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 18, en el que dicha tapa (2) está adaptada para cerrar y sellar por roscado una abertura (3) roscada de un receptáculo disponible en el comercio.

20. Método para cultivar in vitro material vegetal mediante el sistema de reactor según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende las etapas de;
    a) inyectar un medio de cultivo líquido en el interior del receptáculo (1) a través de al menos un conducto (5) de entrada previsto en una tapa (2) unida a un recipiente (4) de recepción del medio de cultivo,
    b) mantener temporalmente inmerso en el medio de cultivo líquido un (11) material vegetal previamente depositado sobre el recipiente (4) de recepción que está unido a la tapa (2),
    c) drenar activa o pasivamente el medio de cultivo líquido a través de un conducto (5) de salida previsto en la tapa (2),
    d) después de la etapa c) acceder al recipiente (4) de recepción unido a la tapa (2) para realizar el corte y recolección desde el exterior del receptáculo (1).

21. Método según la reivindicación 20, que comprende la etapa de modificar la atmósfera interior del receptáculo (1) inyectando gas a través de al menos un conducto (8, 9) de la tapa (2) que comunica con el interior del receptáculo (1).

22. Método según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 21, en el que la tapa (2) incluye una base (2b) de soporte adaptada para poder mantener el receptáculo y el recipiente (4) de recepción del medio de cultivo en una posición horizontal estable mientras dicho receptáculo (1) permanece unido a la tapa (2).

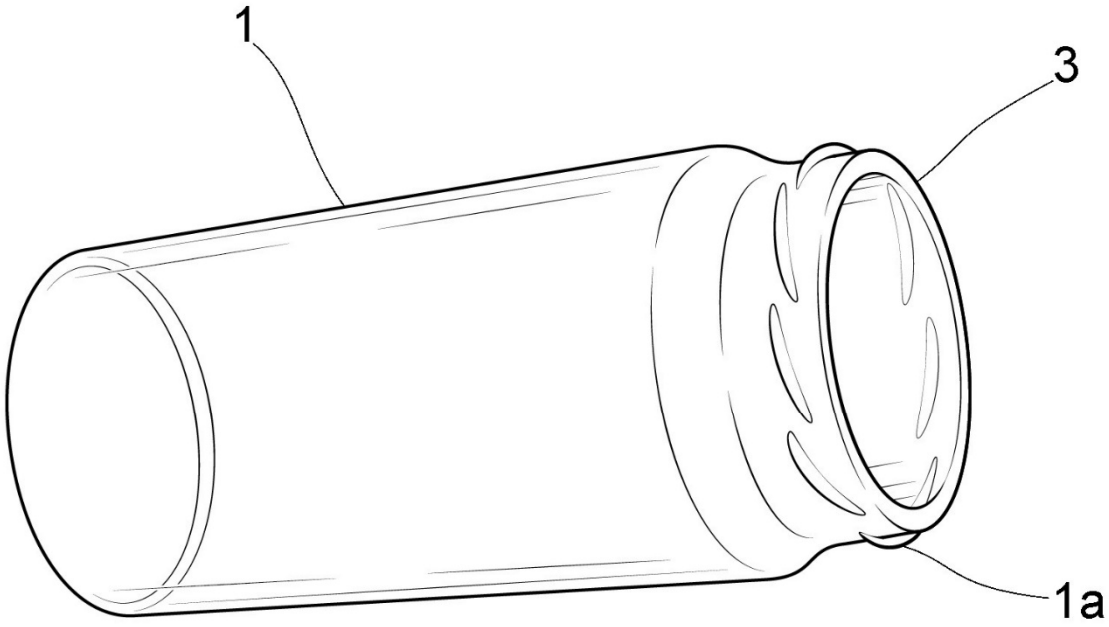

Fig. 1

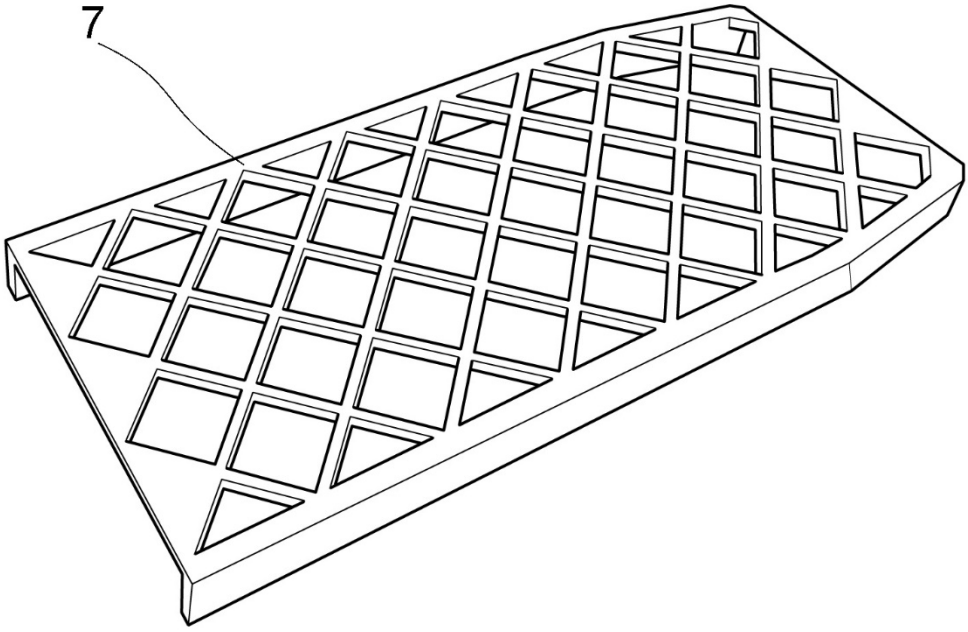

Fig. 2

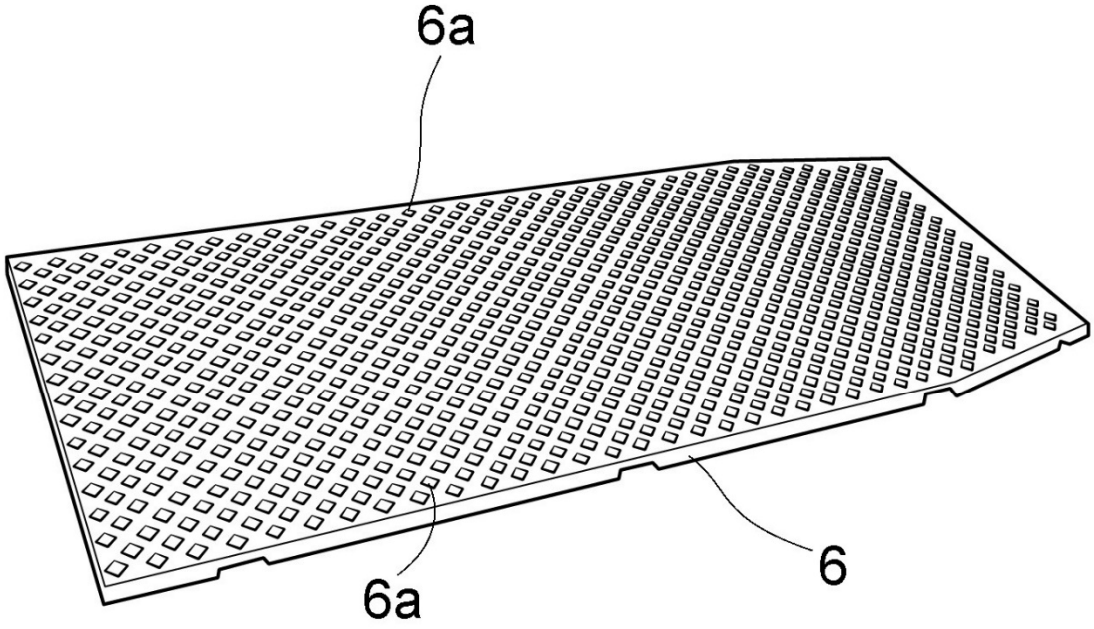

Fig. 3

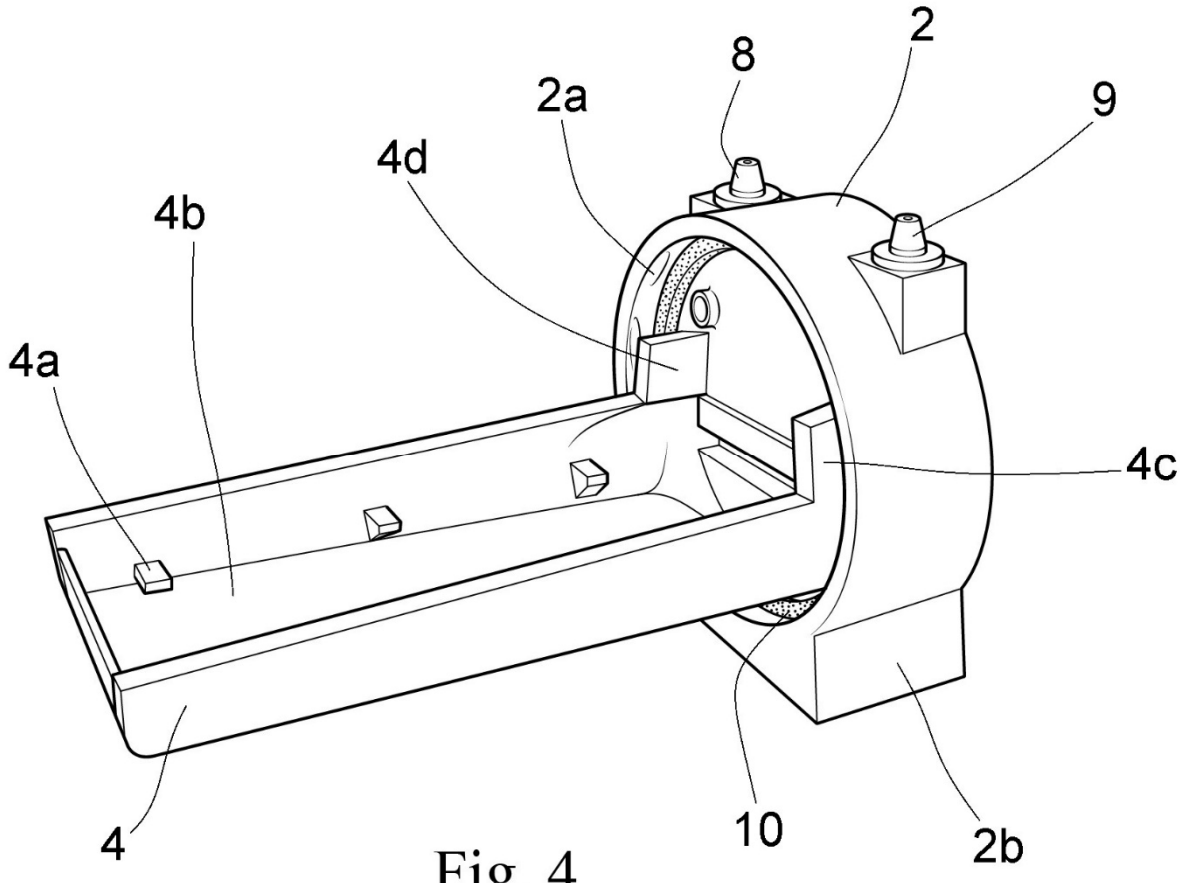

Fig. 4

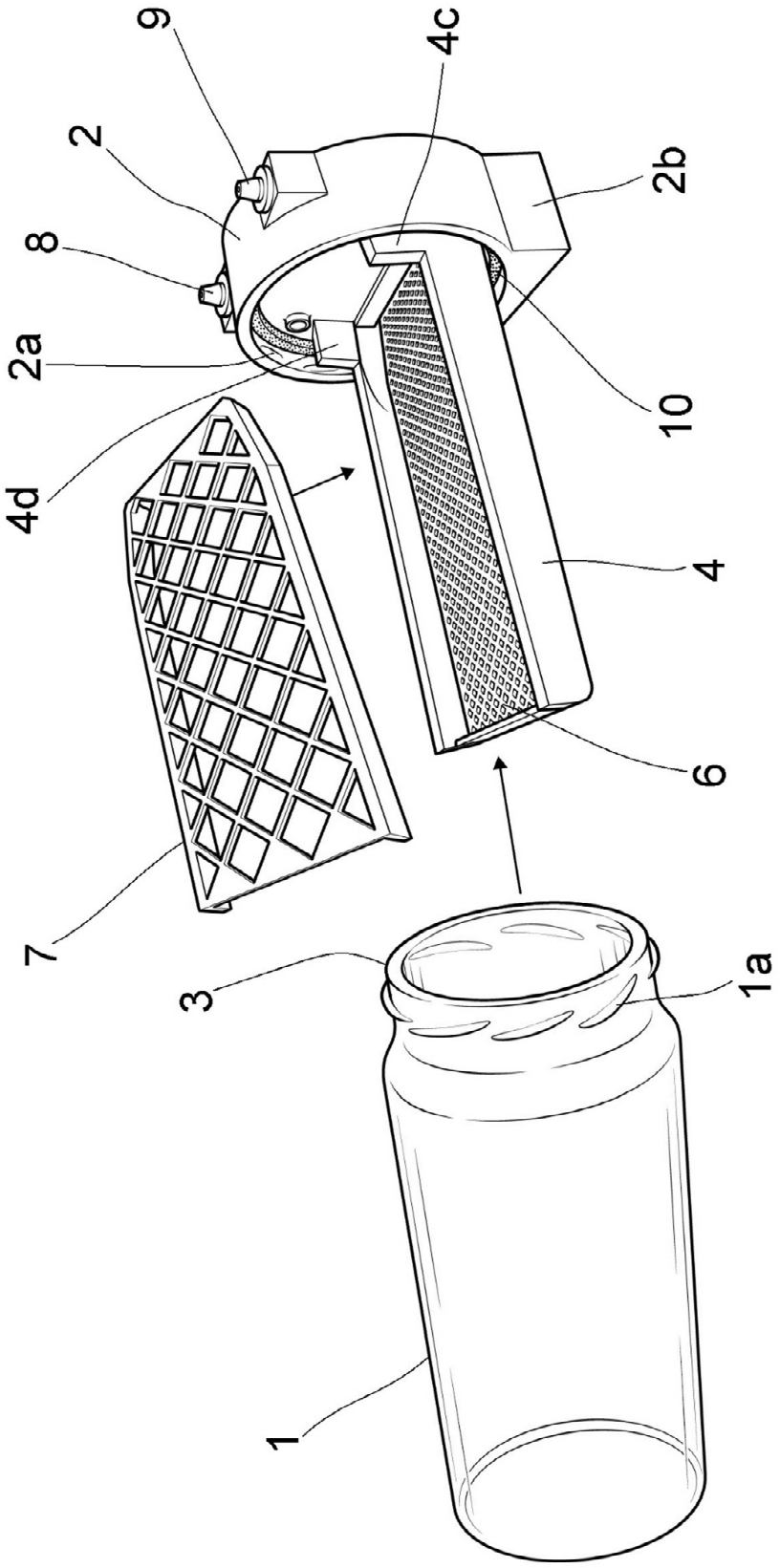

Fig. 5

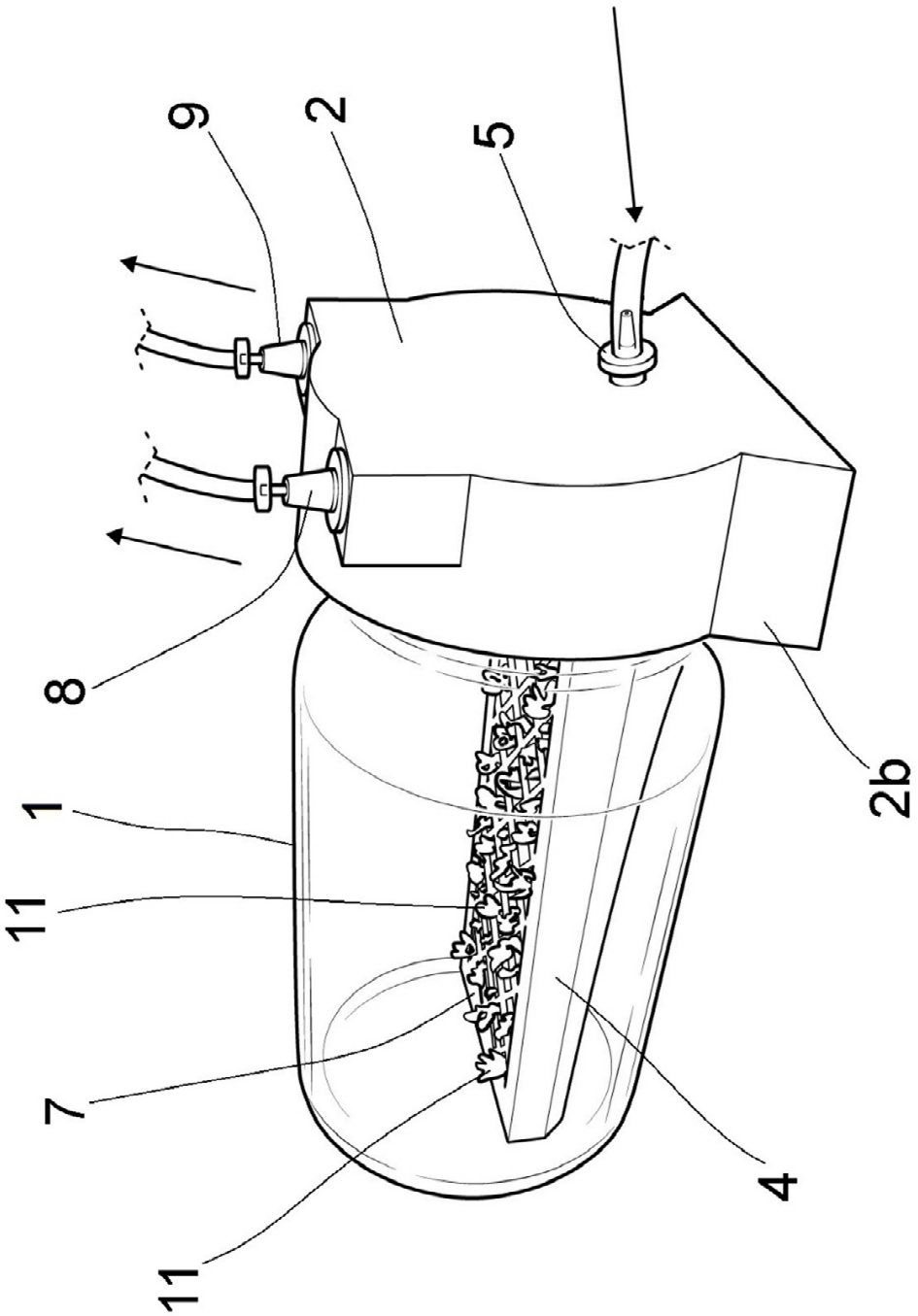

Fig. 6

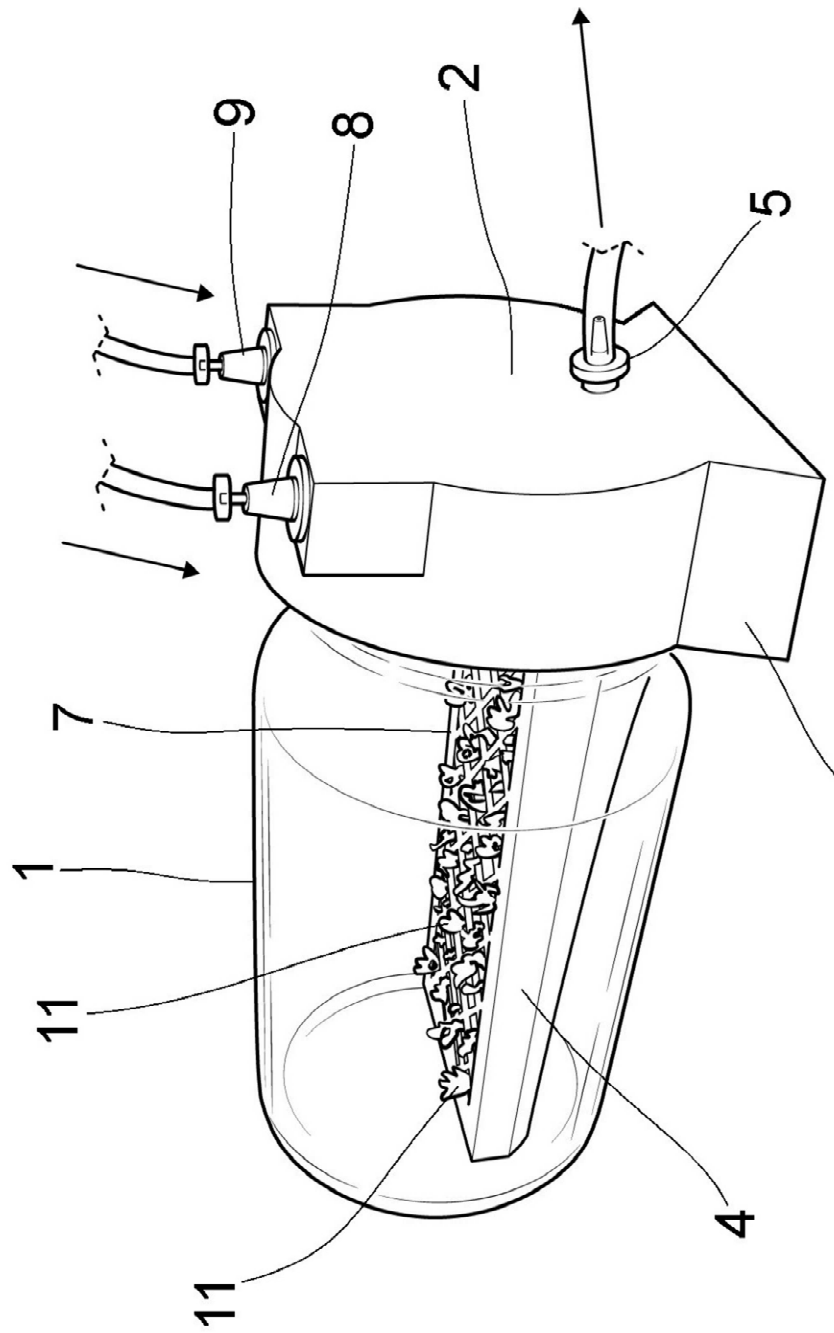

Fig. 7

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201831164

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 29.11.2018

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** ***A01H4/00*** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) **Documentos citados**	**Reivindicaciones afectadas**
A	MX 2016015393 A (INST POLITECNICO NACIONAL) 23/05/2018, figuras, reivindicaciones	1-22
A	GB 2533129 A (ALKION BIOPHARMA SAS) 15/06/2016 figuras, reivindicaciones	1-22
A	WO 2014072962 A1 (UNIV CATOLICA DEL MAULE) 15/05/2014 figuras, reivindicaciones	1-22
A	WO 2012044239 A1 (PLANT FORM AB et al.) 05/04/2012 figuras, reivindicaciones	1-22
A	WO 2012156440 A1 (SOPET NV et al.) 22/11/2012 figuras, reivindicaciones	1-22

Categoría de los documentos citados
X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe	**Examinador**	**Página**
08.03.2019	I. Rueda Molíns	1/2

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A01H

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXT, BIOSIS, INTERNET