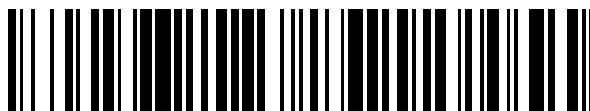


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 066**

51 Int. Cl.:

A01H 5/02 (2006.01)

A01H 4/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05749705 .9**

96 Fecha de presentación: **14.06.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1765060**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.03.2007**

54 Título: **PROCEDIMIENTO DE CULTIVO DE PLANTAS.**

30 Prioridad:
15.06.2004 FR 0451184

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.02.2012

73 Titular/es:
**SYNGENTA PARTICIPATIONS AG
SCHWARZWALDALLEE 215
4058 BASEL, CH**

72 Inventor/es:
**LAINE, Jean-Marc y
DEVYS, Frédéric, Marie**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 375 066 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

Procedimiento de cultivo de plantas

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de plántulas y/o una reserva de plantas micro-parentales, pero especialmente a plantas que pertenecen al grupo de ornamentales herbáceas, que comprende una fase de cultivo *in vitro* durante la cual los explantes obtenidos a partir de la reserva parental de las especies de plantas objeto de propagación, o los derivados de estos explantes, se someten a uno o más ciclos de micro-propagación que se llevan a cabo en condiciones apropiadas y sobre medios de cultivo apropiados, con el fin de producir micro-plántulas que, cuando son sometidas a una fase de cultivo *in vivo*, se espera que se desarrollen para dar lugar a plantas o para dar lugar a una reserva micro-parental.

10 Se sabe que la micro-propagación *in vitro* de una planta en presencia de luz da lugar a una mayor tasa de propagación vegetativa provocando la ruptura del máximo número de brotes auxiliares posible en una plántula mantenida en un medio de cultivo específico con el fin de desarrollar escapos.

15 Los procedimientos de producción de plantas que se basan en una fase de cultivo *in vitro* en presencia de luz y una fase posterior *in vivo* resultan conocidos por los trabajadores expertos desde hace años. Se reconoce en la técnica que estos procedimientos presentan un número de ventajas que básicamente son el resultado de experimentar una fase *in vitro* lo que se refleja no sólo en términos de calidades de las plantas producidas por área, sino también en términos de salud de la planta, calidad y aspecto final de la misma. No obstante, su uso en horticultura está siendo actualmente restringido ya que cada tipo de desarrollo de planta requiere condiciones específicas de cultivo, cuyo desarrollo supone un gran consumo de tiempo y esfuerzo y por tanto de dinero. Las tasas de propagación que se pueden conseguir con dichos procedimientos todavía no resulta suficientes para compensar estas desventajas.

20 Además, se han encontrado que determinadas especies de plantas tales como, en particular, pelargonio, para las cuales se ha intentado esta vía de producción, no se prestan fácilmente a estos procedimientos conocidos de micro-propagación.

25 D1 (Cassells et al., Scientia Horticulturae, Vol 21(1), pp.53-66, 1983) divulga un procedimiento para la micro-propagación de *Pelargonium cultivars*. Las puntas de los brotes que consisten en el acabado apical y el primer par de primordios de hojas se someten a escisión sin esterilización. Se cultivan los brotes escindidos sobre un medio de Hamdorf modificado y se colocan en oscuridad. Los brotes que ya existen en las puntas de brotes escindidos se desarrollan para dar lugar a plantas.

30 D2 (WO 92/18617) divulga un procedimiento para la propagación de variedades de *Pelargonium x domesticum* mediante propagación de cultivo tisular de secciones del pecíolo tomadas de una planta madre. Una etapa esencial de este procedimiento incluye llevar a cabo la formación del callo mediante el cultivo inicial del pecíolo en oscuridad.

Ninguno de los procedimientos divulgados en D1 ni en D2 conduce a un desarrollo apreciable de las plantas.

35 Uno de los objetivos de la presente invención es, por tanto, proponer un procedimiento para la producción de plántulas y/o reservas de plantas micro-parentales que se adapte perfectamente al cultivo de dichas plantas, pero especialmente de plantas que pertenecen al grupo de ornamentales herbáceas tales como, en particular; pelargonio, petunia incluyendo petunia colgante, poinsettia, ciclamen, crisantemo, alegría, verbena o torenia, con el fin de conseguir mayores tasas de propagación.

40 Además, otro objetivo de la invención es proporcionar un procedimiento de aplicación que posibilitaría la consecución de tasas de desarrollo mucho mayores que las que se obtienen hasta el momento con los procedimientos en los que la fase de desarrollo se lleva a cabo en presencia de luz.

45 Además, un objetivo de la presente invención es también proponer un procedimiento para la producción de plántulas y/o reservas de plantas micro-parentales, pero especialmente de plantas que pertenecen al grupo de las ornamentales herbáceas, integrando dicho procedimiento una técnica particular de micro-propagación *in vitro* con el objetivo de que sea posible obtener plántulas más vigorosas o reservas de plantas con una tasa de ramificación excepcionalmente elevada y un desarrollo más rápido.

Otro objeto de la invención es proponer un procedimiento de propagación vegetativa que resulte apropiado para garantizar el estado de salud y el mantenimiento de los criterios genéticos, pero especialmente la conformidad genética de las plantas durante generaciones, dando lugar a poblaciones de plantas con propiedades sincronizadas y uniformes desde el punto de vista del fenotipo.

50 La fase de cultivo *in vitro* de acuerdo con la presente invención resulta también apropiada para la mecanización, debido a que se puede conseguir la miniaturización de la producción de esquejes aplicando el procedimiento de acuerdo con la presente invención. Se pueden proporcionar plantas en bandejas de alta densidad, lo que se puede usar de manera apropiada en sistemas de trasplante automatizados que incorporan robots de trasplante.

Finalmente, el procedimiento del cual es objeto la presente invención va destinado a mejorar los retornos

económicos de la producción de plantas reduciendo el tiempo consumido y la superficie requerida para la propagación, llevando a cabo una micro-propagación *in vitro* en condiciones específicas.

En el presente documento se divulga un procedimiento para la producción de plantones y/o reservas de plantas micro-parentales, pero especialmente plantas que pertenecen a las ornamentales herbáceas, comprendiendo dicho procedimiento una fase de cultivo *in vitro* durante la cual los explantes obtenidos a partir de la reserva parental de especies objeto de propagación, o los derivados de estos explantes, son sometidos a una fase de micro-propagación, que se lleva a cabo en condiciones apropiadas y sobre el medio de cultivo apropiado, con el fin de producir micro-plántulas que, cuando se someten a una fase de cultivo *in vivo*, se pretende que se desarrollen para dar lugar a plantas o a una reserva micro-parental, que se caracteriza por que, para llevar a cabo dicha micro-propagación:

(a) los explantes se obtienen a partir de reservas parentales de especies objeto de propagación, o de derivados de estos explantes,

(b) los explantes, en condiciones axénicas, se colocan sobre un medio de inicio de escapos que se encuentra adaptado a cada especie de planta objeto de propagación, y, en oscuridad y durante un período de tiempo apropiado, se someten a desarrollo de manera que se induce la formación de filamentos de color blanco que comprenden los brotes auxiliares,

(c) de manera opcional, posteriormente se divide cada uno de los filamentos de color blanco en una pluralidad de segmentos o piezas, cada una de las cuales comprende un brote auxiliar,

(d) y se coloca cada uno de los filamentos y/o sus piezas o sus segmentos, en presencia de luz, en condiciones axénicas y durante un período de tiempo apropiado, en el interior de o sobre un medio de enraizamiento, que permite que cada brote auxiliar produzca una micro-plántula que presenta raíces.

En una primera realización de la invención, el procedimiento para producir los plantones y/o la reserva de plantas micro-parental que implica la etapa de micro-propagación, se caracteriza por que

(a) los tallos de los explantes y las ramas se obtienen a partir de la reserva parental de especies objeto de propagación,

(b) se colocan los explantes, en condiciones axénicas, en un medio de inicio de escapos que se encuentra adaptado a cada especie de planta objeto de propagación, y, en oscuridad y durante un período de tiempo apropiado, se someten a desarrollo de manera que se induzca la formación de filamentos de color blanco que comprenden uno o más brotes auxiliares,

(c) posteriormente se divide cada uno de los filamentos de color blanco en una pluralidad de segmentos o trozos, comprendiendo cada uno de ellos al menos un brote auxiliar,

(d) se transfieren los filamentos de color blanco y/o sus trozos o sus segmentos obtenidos en la etapa b), en condiciones axénicas, a un medio de desarrollo y se someten a desarrollo en oscuridad durante un período de tiempo suficiente para permitir la multiplicación del tejido de los esquejes de plantas y para producir una gran cantidad de filamentos ahilados de color blanco que comprenden entre 2 y 10 nudos auxiliares, que se desarrollan para dar lugar a escapos, produciéndose el ahilado de los escapos auxiliares para dar lugar filamentos de color blanco si se someten a desarrollo en oscuridad.

(e) se repite esta etapa (d) tantas veces como sea necesario con el fin de producir generaciones consecutivas diferentes de filamentos de color blanco hasta que se haya obtenido la cantidad deseada de filamentos de color blanco

(f) y se colocan los filamentos de color blanco o sus trozos, en presencia de luz, en condiciones axénicas y durante un período de tiempo apropiado, en el interior o sobre un medio de enraizamiento, que permite que cada brote auxiliar produzca una micro-plántula que presenta raíces.

El medio de inicio usado anteriormente en la etapa (b) y los medios de desarrollo mencionados en la etapa (d) pueden presentar composición idéntica o básicamente idéntica o pueden ser medios diferentes, dependiendo de los requisitos de las especies de plantas o del genotipo usado en el procedimiento de micro-propagación de acuerdo con la invención.

Las condiciones y los medios de cultivo que se pueden usar de manera apropiada en la micro-propagación de plantas resultan bien conocidos por los expertos en la técnica del cultivo de plantas y se describen por ejemplo, en "Plant Propagation By Tissue Culture, Handbook and Directory of Commercial Laboratories, eds. Edwin F George and Paul D Sherrington, Exegetics Ltd, 1984".

En otro aspecto del presente procedimiento, se usa un medio de cultivo tradicional, pero especialmente un medio de cultivo del tipo "MS", bien enriquecido solamente con un compuesto que pertenece a la familia de reguladores de desarrollo de citoquinina o enriquecido con compuestos que pertenecen a la familia de reguladores de desarrollo de

- 5 citoquinina y con un compuesto que pertenece a la familia de reguladores de desarrollo de auxina, como medio de inicio y/o de desarrollo en la fase de micro-propagación. Dichos compuestos que regulan el desarrollo se escogen de manera específica y se proporcionan en el medio en una concentración que favorece el desarrollo del material de la planta a partir de las especies de plantas objeto de multiplicación, pero especialmente el desarrollo de filamentos de color blanco a partir de los brotes auxiliares o nudos presentes inicialmente en el material del explante y el desarrollo de alargamiento de dichos filamentos de color blanco de manera que se produzca el número de máximo de brotes auxiliares/por brote inicial o nudo sobre los filamentos que se encuentran en desarrollo, pero al menos entre 2 y 10 brotes auxiliares/por brote inicial, de manera específica entre 3 y 7 brotes auxiliares/por brote inicial, pero de manera especial entre 4 y 5 brotes auxiliares/por brote inicial, manteniendo una tasa de multiplicación elevada.
- 10 Los compuestos que pertenecen a la familia de reguladores de desarrollo de citoquinina y que se pueden usar en el procedimiento de acuerdo con la presente invención como enriquecimiento apropiado para el medio de inicio y/o de desarrollo pueden ser cualquier compuesto escogido entre el grupo que consiste en citoquininas con base de purina tales como, por ejemplo, quinetina, zeatina, 6-bencilamino purina (BAP); 6-(bencilamino)-9-(2-tetrahidropirani10-9h-purina) (PBA); o (6-(γ,γ-dimetilalilamino)purina (2iP) y citoquininas basadas en fenil ureas sustituidas tales como, por ejemplo, tidiazuron (TDZ) o cualquier otro compuesto que pertenezca a la familia de citoquinina de reguladores de desarrollo que se sabe o que se ha demostrado que resulta apropiado para favorecer de manera directa o indirecta la propagación potencial de las especies de plantas objeto de multiplicación, pero especialmente el desarrollo de filamentos de color blanco a partir de los brotes auxiliares o nudos inicialmente presentes en el material de explante y el desarrollo de alargamiento de los filamentos de color blanco en desarrollo de manera que se produzca el número máximo de brotes auxiliares/por brote inicial o nudo en los filamentos en desarrollo, pero al menos entre 2 y 10 brotes auxiliares/por brote inicial, de manera específica entre 3 y 7 brotes auxiliares/por brote inicial, pero especialmente entre 4 y 5 brotes auxiliares/por brote inicial, manteniendo una tasa de multiplicación elevada.
- 15 Los compuestos que pertenecen a la familia de reguladores de desarrollo de auxina y que se pueden usar en el procedimiento de acuerdo con la presente invención como enriquecimiento apropiado para el medio de inicio y/o de desarrollo pueden ser cualquier compuesto que se escoge entre el grupo que consiste en ácido -indol-3-butírico (IBA); ácido α-naftalenacético (NAA); ácido indol-3-acético (IAA); y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) o cualquier otro compuesto que pertenezca a la familia de reguladores de desarrollo de auxina que se sabe o que se ha demostrado que resultan apropiados para favorecer, de manera directa o indirecta, la propagación potencial de especies de plantas objeto de multiplicación, pero especialmente el desarrollo de filamentos de color blanco a partir de los botes auxiliares o nudos inicialmente presentes en el material del explante y del desarrollo de alargamiento de dichos filamentos de color blanco de manera que se produzca el número máximo de brotes auxiliares/por brote inicial o nudo en los filamentos en desarrollo, pero al menos entre 2 y 10 brotes auxiliares/por brote inicial, de manera específica entre 3 y 7 brotes auxiliares/por brote inicial, pero especialmente entre 4 y 5 brotes auxiliares/por brote inicial, manteniendo una tasa de multiplicación elevada.
- 20 Otros compuestos que se pueden usar de manera apropiada como enriquecimiento para el medio de inicio y/o desarrollo son, por ejemplo, inositol, pero especialmente uno o más de sus nueve isómeros distintos que se encuentran comúnmente en los sistemas de plantas y/o animales, tales como mio-inositol, además de, biotina, ácido fólico, cisteína o polivinil pirrolidona (PVP) o cualquier otro compuesto que se sabe o se ha demostrado que, de manera directa o indirecta, contribuye al desarrollo y/o la propagación de las especies de plantas objeto de multiplicación.
- 25 Otro compuesto que se puede usar como enriquecimiento en el medio de propagación de acuerdo con la invención es una fuente apropiada de carbono, especialmente un compuesto de azúcar tal como, por ejemplo, sacarosa o glucosa o cualquier otro compuesto de azúcar comúnmente usado en el cultivo de plantas o una de sus combinaciones.
- 30 La presente invención además se caracteriza por el hecho de que se obtienen filamentos de color blanco que comprenden brotes auxiliares y que dicha primera generación de filamentos de color blanco, pero especialmente los segmentos o trozos de dichos filamentos que se obtienen a través de los mismos, por ejemplo, cortando los filamentos en una pluralidad de trozos definidos o segmentos que contienen al menos un brote auxiliar, se vuelven a colocar en condiciones axénicas y en oscuridad en un nuevo medio de desarrollo y se cultivan en oscuridad durante un periodo de tiempo suficiente para inducir la formación de una nueva generación de filamentos de color blanco de manera que se produzca el número máximo de brotes auxiliares/por brote inicial o nudo en los filamentos de primera generación de los filamentos en desarrollo, pero al menos entre 2 y 10 brotes auxiliares/por brote inicial, de manera específica entre 3 y 7 brotes auxiliares/por brote inicial, pero especialmente entre 4 y 5 brotes auxiliares/por brote inicial, manteniendo una tasa de multiplicación elevada. El procedimiento se puede repetir tantas veces como sea necesario para producir generaciones consecutivas diferentes de filamentos de color blanco hasta que se haya obtenido la cantidad deseada de filamentos de color blanco.
- 35 De este modo, la presente invención hace posible de manera ventajosa una técnica que se puede definir para unas especies de plantas dadas, en particular especies de plantas que pertenecen al grupo de ornamentales herbáceas, por medio de una secuencia de operaciones estandarizadas en las que el tipo de medio y las condiciones de cultivo, si resulta necesario, se pueden adaptar de manera específica a las variedades o grupos de variedades de dichas especies con el fin de aumentar la tasa de propagación vegetativa y mantener esa elevada tasa de propagación
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60

durante uno o más, de manera específica hasta 10, más específicamente hasta 5, ciclos de propagación en oscuridad.

Las plantas que se pueden usar en el procedimiento de acuerdo con la presente invención son plantas que pertenecen al grupo de ornamentales herbáceas de las familias Adiantaceae, Amaranthaceae, Amaryllidaceae, 5 Apiaceae, Apocynaceae, Araceae, Araliaceae, Asclepiadaceae, Aspleniaceae, Astaraceae, Athyriaceae, Balsaminaceae, Begoniaceae, Buxaceae, Campanulaceae, Cannaceae, Carophyllaceae, Crassulaceae, Dryopteridaceae, Euphorbiaceae, Fumariaceae, Geraniaceae, Hyperaceae, Iridaceae, Lamiaceae, Liliaceae, Lobeliaceae, Nyctaginaceae, Osmundaceae, Piperaceae, Plumbaginaceae, Poaceae, Portulacaceae, Ranunculaceae, Rosaceae, Saururaceae, Saxifragaceae, Scrophulariaceae, Solanaceae, Verbenaceae y 10 Violaceae, en particular, plantas que pertenecen al grupo de pelargonio, petunia incluyendo petunia colgante, poinsettia, ciclamen, crisantemo, alegría, verbena o torenia, pero especialmente pelargonio.

En una realización de la presente invención, implementación de los resultados del presente procedimiento en una primera variante, con el fin de obtener una reserva parental libre de bacterias y virus, se toman meristemos, especialmente meristemos de desarrollo, pero especialmente meristemos de escapo, y se usan como explantes que 15 se someten a desarrollo en condiciones axénicas, en presencia de luz durante un período de tiempo, en un medio de desarrollo común para cada variedad de planta, suficiente para producir la formación de pequeñas plántulas que presentan unos primeros primordios de hoja y posteriormente, durante un segundo período de tiempo, en un medio de enraizamiento común a cada variedad de planta, con el fin de obtener plántulas enraizadas que se encuentran libres de bacterias y virus que se pretende que sean colocadas en un medio de inicio de escapo en oscuridad con 20 el fin de producir dichos filamentos de color blanco de acuerdo con la invención.

Las condiciones y los medios de cultivo que se pueden usar de manera apropiada en el medio de cultivo de meristemo de planta así como en las plántulas de enraizamiento por parte de dicho cultivo son bien conocidas por los expertos en la técnica del cultivo de plantas y se describen, por ejemplo, en "Plant Propagation by Tissue 25 Culture, Handbook and Directory of Commercial Laboratories, eds. Edwin F George and Paul D Sherrington, Exegetics Ltd, 1984".

En esta situación, de acuerdo con una característica del presente procedimiento, el volumen de medio de enraizamiento usado se enriquece de manera apropiada durante la fase de enraizamiento de dichas plántulas. Posteriormente, se transfieren las plántulas enraizadas al suelo o a cualquier otro medio de soporte comúnmente empleado en la práctica de cultivo de plantas para el desarrollo de plantones, se aclimatan a las condiciones 30 ambientales modificadas como las presentes en invernadero y se someten a desarrollo durante un período de tiempo apropiado, pero al menos durante 4 semanas a 10 semanas, especialmente durante 5 semanas a 6 semanas.

Posteriormente se pueden someter las plantas a un sistema de ensayo apropiado con el fin de detectar y descartar material de plantas que se encuentre infectado con patógenos bacterianos y/o víricos tales como, por ejemplo, 35 ensayo de tipo "ELISA" y se eliminan cualesquiera muestras con ensayos positivos, mientras que las de ensayo negativos se mantienen como reserva parental libre de bacterias y de virus y se usan como fuentes de explantes.

En una realización de la invención, se eliminan las hojas y las raíces de dichas plántulas durante un tiempo apropiado antes de ser colocadas, en condiciones axénicas y de oscuridad, en un medio de inicio de escapo que es específico para cada variedad con el fin de producir dichos filamentos de color blanco.

En otra realización de la invención, se toman micro-esquejes de la reserva de plantas parental libre de bacterias y de virus que se obtiene a través del cultivo de meristemo descrito anteriormente y se usan como explantes. De manera alternativa, se puede usar una reserva parental certificada libre de bacterias y de virus adquirida a partir de una fuente comercial con el fin de obtener micro-esquejes. En particular, se toman las ramas, pero especialmente 40 las puntas de los brotes que comprenden uno o más brotes auxiliares y se cortan en trozos, conteniendo cada trozo al menos un brote.

De acuerdo con una realización específica de la invención, se eliminan las hojas y las estípulas de la parte apical de los micro-esquejes durante un período de tiempo antes de la colocación, en condiciones axénicas y en oscuridad, en un medio de inicio de escapo que es específico para cada variedad de planta, con el fin de producir dichos filamentos de color blanco.

De acuerdo con otra característica ventajosa del presente procedimiento, los filamentos de color blanco que presentan brotes auxiliares se pueden almacenar durante un período de tiempo antes de la fase de enraizamiento durante la cual cada brote produce una reserva de planta micro-parental enraizada que se pretende usar para el cultivo *in vivo*.

Además se divulgan las micro-plántulas; plantones y reservas micro-parentales obtenidas mediante la puesta en 55 práctica del procedimiento descrito anteriormente.

El procedimiento de la presente invención conduce a plantones que se distinguen en particular por una mayor tasa de ramificación, un desarrollo rápido, follaje compacto, auto-regulación de la planta, pero especialmente a plantones

que se escogen entre el grupo que consiste en pelargonio, petunia incluyendo petunia colgante, poinsettia, ciclamen, crisantemo, alegría, verbena y torenia.

La presente invención también se refiere a características que se pueden apreciar a partir de la siguiente memoria descriptiva, y que se deben considerar solas o de acuerdo con cualquiera de sus combinaciones posibles.

5 El procedimiento de la presente invención comprende una fase de cultivo "*in vitro*" durante la cual los tejidos de las plantas, bajo condiciones axénicas, se someten a diferentes tratamientos, en particular de micro-propagación, llevándose a cabo dichos tratamientos en condiciones específicas para hacer que dichos tejidos de plantas se multipliquen de forma exponencial y produzcan un gran cantidad de plántulas que se pretende que se desarrollen en una fase "in vivo", bien directamente para dar lugar a plantas o para dar lugar a una reserva micro-parental que se pretende que actúe por sí misma como material de partida para la obtención de plantas.

10 El procedimiento de acuerdo con la invención se espera que además resulte apropiado para ser aplicado bien a plántulas obtenidas a partir de meristemas tomados de cualquier reserva parental, o sobre micro-esquejes tomados de reserva parental sana, en concreto una reserva parental certificada libre de bacterias y virus.

15 De este modo, la variante del procedimiento que se basa en el uso de meristemas, y que presenta la ventaja de conducir a la esterilización de la reserva parental que puede ser atacada por cualquier patógeno, requiere etapas adicionales para la obtención de las plántulas. A tal fin, en primer lugar se obtienen un se desarrollan los meristemas, pero especialmente los meristemas desarrollados con los primeros primordios de hojas, durante un período de aproximadamente 4 meses, en presencia de luz, en un recipiente apropiado tal como, por ejemplo, una placa de Petri, una recipiente de vidrio o jarra, en un medio de desarrollo cuya composición es, de manera ventajosa, común a todas las especies de plantas a las que se refiere el presente procedimiento, por ejemplo, uno de los medios de cultivo de plantas usados tradicionalmente tal como, por ejemplo, un medio de cultivo de tipo "MS" (marco-MS y micro-elementos; vitaminas MS) que se enriquece con compuestos que pertenecen a la familia de reguladores de desarrollo de citoquinina.

20 Posteriormente se colocan dichas plántulas pequeñas obtenidas a partir de los meristemas desarrollados sobre o en un medio de enraizamiento cuya composición es idéntica, sea cual sea la especie de planta, preferentemente un medio de enraizamiento tradicionalmente usado en los cultivos de plantas tal como, por ejemplo, un medio de cultivo de tipo "MS", en presencia de luz, para obtener plántulas pequeñas que, aproximadamente un mes después, son transferidas a un recipiente apropiado tal como, por ejemplo, un recipiente o jarra de vidrio, que permite el aumento de volumen de la raíz. También se puede usar un recipiente ventilado para favorece más el desarrollo de la raíz.

25 Después de este procedimiento, se obtienen plántulas enraizadas que se encuentran listas para ser introducidas en la fase de micro-propagación *in vitro*, de la misma forma que los micro-esquejes tomados de la reserva parental sana tal como, por ejemplo, las reservas de plantas madre certificadas cultivadas en invernadero en condiciones fitosanitarias controladas.

30 En una realización específica de la invención, antes de ser sometidos a tratamiento de micro-propagación, las plántulas o micro-esquejes se rejuvenecen en primer lugar, por ejemplo, eliminando raíces y hojas y posteriormente colocándolos en un medio de inicio de escape que se desarrolla específicamente para adaptarse a la variedad de planta objeto de propagación y que se dispersa en un recipiente apropiado tal como una placa de Petri.

35 En particular, se retiran las hojas y, si se encuentran presentes, la raíces del tallo o de las ramas de la planta objeto de micro-propagación y, preferentemente, se esteriliza la superficie. Posteriormente se corta en trozos o segmentos cada una de los trozos o segmentos que contiene al menos un nudo o brote auxiliar. Se transfieren los esquejes a un medio de inicio de escape y se cultivan en condiciones de oscuridad y durante un período de tiempo, que permite la multiplicación de los esquejes de las plantas y la producción de una cantidad mayor de filamentos de color blanco ahilados que comprenden un número mayor de nudos auxiliares, que dan lugar a plántulas que se pretende que se desarrollen durante una fase "in vivo" si se desarrollan en presencia de luz: o para desarrollar escapes que los escapes auxiliares que se convierten en ahilados en el interior de los filamentos de color blanco, si se desarrollan en oscuridad.

40 El cultivo en oscuridad de las esquejes de plantas así como de los esquejes obtenidos a partir de filamentos de color blanco ahilados que comprenden al menos un brote auxiliar o nudo se lleva a cabo durante un período de tiempo suficiente para permitir que los nudos auxiliares o los brotes auxiliares se desarrollen en escapes y los escapes auxiliares se conviertan en ahilados en el interior de los filamentos de color blanco que comprenden los brotes auxiliares, siendo el número de brotes auxiliares producidos sobre los filamentos en desarrollo de al menos entre 2 y 10 brotes auxiliares/por nudo inicial presente en el esqueje, específicamente entre 3 y 7 brotes auxiliares/por nudo inicial presente en el esqueje, pero de manera especial entre 4 y 5 brotes auxiliares/nudo inicial presente en el esqueje, pero al menos durante un período de entre aproximadamente 2 semanas a aproximadamente 12 semanas, de manera específica de aproximadamente 3 semanas a aproximadamente 7 semanas, de manera más específica de entre aproximadamente 4 semanas a aproximadamente 5 semanas, pero especialmente de aproximadamente 4 semanas.

55 En una realización específica, para el inicio del escape y el mantenimiento se colocan los explantes sobre un medio

de cultivo y se desarrollan en condiciones que provocan el desarrollo de escapos en sentido considerablemente horizontal. Esto se puede conseguir cultivando los explantes en un recipiente tal como una placa de Petri, que se diseña de tal forma que evita que el explante se desarrolle en sentido vertical debido a las limitaciones de espacio en la dirección vertical. Para el desarrollo de los escapos es preferible que exista un contacto estrecho con el medio de cultivo y que se establezca más que un punto de contacto con el medio durante la micro-propagación.

De acuerdo con el presente procedimiento, resulta ventajoso usar un medio de inicio y/o proliferación que presente considerablemente la misma composición básica que el medio de desarrollo mencionado anteriormente y que el medio de enraizamiento, concretamente una composición basada en la presencia tradicional de macro- y micro-elementos y vitaminas tales como, por ejemplo, las presentes en el medio MS usado comúnmente.

La composición y la concentración de los macro- y micro-elementos y vitaminas en dicho medio pueden variar, en cierta medida, dependiendo de las especies de plantas y del genotipo implicado. Dichas pequeñas adaptaciones se encuentran dentro del conocimiento del experto artesano en cultivos de plantas y forman parte de su rutina de trabajo de optimización. Por ejemplo, cuando se usa un medio de tipo MS se ha comprobado que resulta ventajoso en algunos casos emplear concentraciones menores de macro- y/o micro-elementos y/o vitaminas, especialmente una concentración que se establece por sí misma entre una concentración de intensidad completa y una concentración de intensidad media, pero en particular, una concentración de intensidad media.

Dicha composición se puede enriquecer además por medio de la adición de compuestos que pertenecen a la familia de reguladores de desarrollo de citoquinina o mediante la adición simultánea de compuestos que pertenecen a la familia de reguladores de desarrollo de citoquinina y compuestos que pertenecen a la familia de reguladores de desarrollo de auxina, dependiendo de las especies de plantas objeto de propagación, favoreciendo los compuestos la multiplicación de escapos mediante la contribución a la ruptura y el desarrollo de brotes auxiliares en el interior de los escapos ahilados y además en el interior de los filamentos de color blanco y/o al desarrollo, pero especialmente al desarrollo de alargamiento de los escapos en crecimiento para dar lugar a escapos que comprenden un número elevado de nudos auxiliares.

En una realización específica, se emplea un enfoque de cultivo de dos capas en el procedimiento de acuerdo con la invención en el que el medio de cultivo se proporciona en forma de un sistema de dos capas que comprende una capa inferior solidificada que comprende básicamente macro- y micro-elementos, vitaminas y una fuente de carbono como se ha descrito anteriormente en la presente memoria, pero no contiene un regulador de desarrollo, que se superpone con una capa superior de fluido que comprende un regulador de desarrollo, especialmente un regulador de desarrollo que pertenece a la familia de reguladores de desarrollo de citoquinina o una combinación de reguladores de desarrollo que pertenecen a la familia de los reguladores de desarrollo de citoquinina y a la familia de reguladores de desarrollo de auxina, dependiendo de las especies de planta objeto de propagación, favoreciendo los reguladores de desarrollo la multiplicación de los escapos mediante contribución a la ruptura y al desarrollo de brotes auxiliares en el interior de los escapos ahilados (filamentos de color blanco) y/o al desarrollo, pero especialmente al desarrollo de alargamiento de los escapos en crecimiento para dar lugar a escapos que comprenden un número elevado de nudos auxiliares.

Además de los reguladores de desarrollo que pertenecen a la familia de reguladores de desarrollo de citoquinina y/o auxina, la capa superior de fluido puede contener otros reguladores de desarrollo de familia diferente tales como, por ejemplo, reguladores de desarrollo que pertenecen a la familia de reguladores de desarrollo de giberelina, que resultan conocidos por favorecer el alargamiento del escapeo.

La capa superior de fluido puede contener además que favorecen el desarrollo de los escapos en crecimiento tales como, por ejemplo, macro- y micro-elementos, vitaminas y una fuente de carbono. El volumen de la capa superior de fluido, en comparación con la capa inferior de sólido, es de entre aproximadamente 1 % y aproximadamente 10 %, de manera específica entre aproximadamente 2 % y aproximadamente 7 %, más específicamente entre aproximadamente 3 % y aproximadamente 5 %, pero especialmente entre aproximadamente 3 % y aproximadamente 4 %.

En una realización específica de la invención, se lleva a cabo un cultivo de dos capas en un recipiente apropiado usado comúnmente en el cultivo de plantas tal como, por ejemplo, un recipiente o jarra de vidrio, con un tamaño suficientemente grande para permitir que los filamentos de color blanco en crecimiento se desarrollen de forma apropiada. Además, los recipientes pueden estar ventilados con el fin de contribuir al desarrollo y al crecimiento de los filamentos de color blanco.

Los compuestos que pertenecen a la familia de reguladores de desarrollo de citoquinina y que se pueden usar en el procedimiento de acuerdo con la presente invención como enriquecimiento apropiado para el medio de inicio y/o proliferación puede ser cualquier compuesto que se escoge entre el grupo que consiste en quinetina, zeatina, 6-bencilamino purina (BAP); 6-(bencilamino)-9-(2-tetrahidropirani10-9h-purina) (PBA); o (6-(γ,γ-dimetilalilamino)purina (2iP); y tiazuron (TDZ) o cualquier otro compuesto que pertenezca a la familia de reguladores de desarrollo de citoquinina que se sabe o que se ha demostrado que resulta apropiado para la propagación de las especies de plantas objeto de multiplicación.

Los compuestos que pertenecen a la familia de reguladores de desarrollo de citoquinina se ofrecen en el medio de inicio y/o de proliferación de acuerdo con la invención en una concentración de entre 0,01 mg/l y 5,0 mg/l – 7,0 mg/l, de manera específica entre 0,03 y 2,0 mg/l, de manera más específica entre 0,04 y 1,0 mg/l, pero especialmente entre 0,05 y 0,5 mg/l.

- 5 Puede resultar necesario llevar a cabo adaptaciones dentro de los intervalos anteriormente definidos con el fin de satisfacer las necesidades específicas de las especies de plantas objeto de multiplicación.

Los compuestos que pertenecen a la familia de reguladores de desarrollo de auxina y que se pueden usar en el procedimiento de acuerdo con la presente invención, como enriquecimiento apropiado para el medio de inicio y/o de proliferación puede ser cualquier compuesto que se escoge entre el grupo que consiste en ácido –indol-3-butírico (IBA); ácido α -naftalenacético (NAA); ácido indol-3-acético (IAA); y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) o cualquier otro compuesto que pertenezca a la familia de reguladores de desarrollo de auxina que se sabe o que se ha demostrado que resultan apropiados para la propagación de especies de plantas objeto de multiplicación.

Los compuestos que pertenecen a la familia de reguladores de desarrollo de auxina se ofrecen en el medio de inicio y/o de proliferación de acuerdo con la invención en una concentración de entre 0,01 mg/l y 5,0 mg/l, de manera específica entre 0,03 y 2,0 mg/l, de manera más específica entre 0,04 y 1,0 mg/l, pero especialmente entre 0,05 y 0,5 mg/l.

Puede resultar necesario llevar a cabo adaptaciones dentro de los intervalos anteriormente definidos con el fin de satisfacer las necesidades específicas de las especies de plantas objeto de multiplicación.

Se sabe que algunas de las sustancias que favorecen el desarrollo tales como los compuestos que pertenecen al grupo de fenil ureas sustituidas, por ejemplo tidiazuron (TDZ), solos o en combinación con otro compuesto de la familia de reguladores de desarrollo de citoquinina tales como, por ejemplo, 6-bencilamino purina (BAP), son potentes estimuladores de la formación de escapos múltiples. Se sabe que estas sustancias son bastante persistentes y altamente activas ya a bajas concentraciones dentro del intervalo de entre 0,001 mg/l y 0,1 mg/l pero pueden, en algunos casos, provocar efectos no deseados tales como, por ejemplo, aberraciones en órganos o un desarrollo de escapos achaparrados

Estos efectos no deseados se pueden compensar mediante la adición de un regulador de desarrollo de tipo giberelina tal como ácido giberélico, que favorecen el alargamiento del escapo.

Otra posibilidad para evitar efectos no deseados provocados por la presencia de reguladores del desarrollo, pero especialmente reguladores de desarrollo que pueden afectar de manera negativa al desarrollo del escapo y al alargamiento tal como, por ejemplo, TDZ, en el medio de inicio y/o de proliferación, es la aplicación de un enfoque de cultivo de dos capas como se ha mencionado anteriormente, en el que los compuestos que pertenecen al grupo de las fenil ureas sustituidas tal como, por ejemplo, tidiazuron (TDZ), solos o en combinación con otro compuesto de la familia de reguladores de desarrollo de citoquinina tal como, por ejemplo, 6-bencilamino purina (BAP) se encuentran únicamente presentes en la capa superior de fluido en una concentración lo suficientemente elevada para promover la multiplicación del escapo pero suficientemente baja para evitar la presencia de efectos no deseados, pero específicamente en una concentración de aproximadamente entre 0,001 mg/l y 2,0 mg/l, más específicamente entre aproximadamente 0,005 y 1,0 mg/l, pero especialmente entre 0,01 y 0,1 mg/ml.

Otros compuestos que se pueden usar de manera apropiada como enriquecimiento para el medio de inicio o de proliferación son, por ejemplo, inositol, pero al menos uno de sus nuevos isómeros distintos tal como mio-inositol, además, biotina, ácido fólico, cisteína o polivinil pirrolidona (PVP) o cualquier otro compuesto que se sabe o que se ha demostrado que favorece de manera directa o indirecta el desarrollo y/o la propagación potencial de las especies de plantas objeto de multiplicación.

Otro compuesto que se puede usar como enriquecimiento en el medio de propagación de acuerdo con la invención es una fuente apropiada de carbono, especialmente un compuesto de azúcar tal como, por ejemplo, sacarosa o glucosa, o cualquier otro compuesto de azúcar usado en el cultivo de plantas, o una de sus combinaciones.

Los filamentos de color blanco obtenidos de este modo o cualesquiera otros ciclos de propagación pueden ser colocados en condiciones de oscuridad que permiten la conservación de los filamentos para su posterior enraizamiento o como reserva para posteriores intentos de propagación. Por ejemplo, filamentos almacenados a una temperatura de entre 2 °C y 10 °C, de manera específica entre 3 °C y 8 °C, pero especialmente entre 4 °C y 6 °C se pueden almacenar durante al menos hasta 10 meses, de manera específica durante al menos hasta 7 meses, pero especialmente durante al menos hasta 5 meses.

De este modo, la fase de micro-propagación se puede llevar a cabo de manera ventajosa de nuevo, con tanta frecuencia como sea necesario en ciclos de entre aproximadamente 3 semanas a 12 semanas, de manera específica entre aproximadamente 4 semanas y 6 semanas, pero especialmente de entre aproximadamente 4 semanas a 5 semanas, con el fin de obtener grandes cantidades de filamentos de color blanco.

De acuerdo con otra característica del presente procedimiento, que permite garantizar la calidad de las plantas

producidas en términos de salud, las plantas resultantes del cultivos de meristemos y/o filamentos de color blanco se someten a un sistema de ensayo apropiado tal como, por ejemplo, un ensayo de tipo "ELISA" y cualesquiera muestras que representan un positivo de ensayo son eliminadas, mientras que las que representan un negativo de ensayo son conservadas.

- 5 En segundo lugar, de acuerdo con otra característica ventajosa, es posible almacenar en oscuridad durante tanto tiempo como sea necesario las partes de los filamentos de color blanco, a temperatura ambiente, en un medio de proliferación que se sustituye de manera periódica, antes de la fase de enraizamiento, durante la cual el brote produce una micro-plántula enraizada que cuyo uso se pretende para cultivos *in vivo*.

- 10 Varias especies de plantas ya se han sometido a tratamiento de micro-propagación de acuerdo con el procedimiento de la presente invención.

De este modo, ha sido posible demostrar que, mediante el uso de un medio del tipo tradicional "MS" enriquecido con citoquininas o una combinación de citoquininas con auxinas como medio de inicio de escape o de proliferación, se han producido de manera satisfactoria micro-plántulas de pelargonio, por ejemplo, de geranio zonal, de geranio de hoja de hiedra doble, o de geranio de hoja de hiedra sencillo, así como petunia y micro-plántulas de osteospermum.

- 15 Además, el procedimiento de acuerdo con la invención también se puede aplicar a otras especies de plantas que pertenecen al grupo de las ornamentales herbáceas tal como, por ejemplo, plantas de petunia incluyendo petunia colgante, calancoe, torenia, verbena y rosal para producir micro-plántulas de forma satisfactoria.

- 20 Además, aplicando el procedimiento de acuerdo con la invención también se ha encontrado que las plantas jóvenes o las reservas micro-parentales obtenidas a partir de micro-plántulas presentaban características particularmente interesantes.

- 25 Las plantas producidas a través de este procedimiento presentan de forma natural un grado de ramificación muy elevado, un enraizamiento rápido, desarrollo homogéneo en términos de volumen, endurecimiento rápido de la planta, una zona foliar que es menor que la de las plantas que se obtienen en los procedimientos de cultivo tradicionales, y un pronunciado carácter juvenil, que se puede observar en particular en micro-plántulas de geranio zonal, una reserva micro-parental de geranio zonal y una reserva micro-parental de petunia colgante, respectivamente.

El presente procedimiento también ofrece una solución ventajosa que hace posible una mayor productividad y flexibilidad en el procedimiento de producción en comparación con las técnicas de cultivo tradicionales, en particular mediante la reducción de las superficies que se ubican en el cultivo de la reserva parental por un factor de cuatro.

- 30 Además, aplicando el procedimiento de acuerdo con la invención sería posible conseguir tasas de proliferación, que son mucho mayores que las que se obtienen actualmente llevando a cabo la fase de proliferación en presencia de luz. Si se asume que cada filamento de color blanco obtenido a partir de una plántula de parte es capaz de proporcionar al menos cinco brotes auxiliares al mes, que, por sí mismos, son capaces de proporcionar cinco micro-plántulas enraizadas, cada una de las cuales, a su vez, es capaz de proporcionar cinco filamentos de color blanco al mes, esto conduciría, tras 9 ciclos de micro-propagación de un mes, a aproximadamente 2 millones de plantas obtenidas a partir de una única plántula de partida.
- 35

Además, la puesta en práctica del presente procedimiento además ofrece muchas ventajas que se reflejan en las diferentes redes hortícolas implicadas, en particular, en una mejora de las administración de los órdenes, y en la elevada calidad de la planta.

- 40 Los siguientes ejemplos de trabajo se refieren a ejemplos de la puesta en práctica del presente procedimiento, se aportan a modo de ilustración y no a modo de limitación y se refieren a la producción de plantas de pelargonio, petunia y osteospermum, de manera más específica a la producción de plantas que pertenecen a diferentes variedades o genotipos de pelargonio, petunia y osteospermum.

Ejemplos

- 45 **Ejemplo 1. Petunia**

1.1 Material de planta y ahilamiento

Se cultivan plantas de reserva madre certificada de petunia en invernadero durante al menos 6 semanas en condiciones fitosanitarias controladas. Se obtienen ramificaciones a partir de dichas plantas de reserva madre y se usan como explantes para la multiplicación de escapos y el ahilamiento.

- 50 Se retiran todas las hojas de las ramas y se esteriliza la superficie de las ramas defoliadas con una solución de hipoclorito de sodio de 1,3 % (blanqueo comercial de 30 %) durante 10 minutos y se lavan tres veces con agua destilada estéril. Tras la esterilización, se cortan en trozos las hojas defoliadas en condiciones axénicas, conteniendo cada pieza uno o dos nudos.

Se colocan horizontalmente los explantes sobre un medio de inicio de escape solidificado en una placa de Petri, con un máximo de tres explantes por placa de Petri. Se sellan las placas de Petri con Nescofilm.

5 Para el ahilamiento, se usaron medios basados en MS para el inicio del enraizamiento, MS1 y MS1-2. Los dos medios diferían básicamente en la concentración de macro elementos de MS, de manera que el medio MS1-2 contiene únicamente los macro-elementos en concentración de media intensidad. Ambos medios se usaron para el inicio del escape y el ahilamiento de los explantes de Petunia, aunque determinados genotipos parece que presentan preferencias por uno u otro medio.

10 El medio MS1 contiene micro sales de MS + macro sales de MS + vitaminas de MS, sacarosa como fuente de carbono, mio-inositol, biotina, ácido fólico como adicional, vitaminas no-MS, PVP (polivinil pirrolidona) como enriquecimiento adicional y BAP (6-bencilaminopurina) y 2iP (2-isopentenil-adenina) como hormonas de desarrollo de la familia de reguladores de desarrollo de citoquinina. El medio se solidifica con agar para plantas. Se fija el pH en 5,8 antes del tratamiento en autoclave (para más detalles sobre la composición del medio véase la tabla A siguiente).

15 El medio M1-2 contiene macro sales de MS de intensidad media + micro sales MS de intensidad completa y vitaminas MS, sacarosa como fuente de carbono, mio-inositol, biotina y ácido fólico como adicional, vitaminas no MS, PVP (polivinil pirrolidona) como enriquecimiento adicional y BA (6-bencilaminopurina) y 2iP (2-isopentenil-adenina) como hormonas de desarrollo de la familia de reguladores de desarrollo de citoquinina. El medio se solidifica con agar para plantas. Se fija el pH en 5,8 antes de someter a tratamiento de autoclave (para más detalles sobre la composición del medio véase la tabla A siguiente).

20 Se cultivan los explantes en oscuridad durante 4 semanas a una temperatura de entre 18 °C y 20 °C. En general, 60-90 % de los explantes forman filamentos (véase tabla 1 siguiente).

Tras un cultivo de cuatro a cinco semanas en oscuridad, se someten a ahilamiento los escapes auxiliares para dar lugar a filamentos de color blanco. Cada filamento presenta uno o más nudos auxiliares.

Tabla 1: Número de filamentos por explante tras 4 semanas

genotipo	MS1	MS1-2
A971-1	3,0	5,0
A895-3	4,5	8,0
A1019-1	-	6,2
A938-5	5,0	1,0
A1010-3	5,0	17,0
A948-1	6,0	10
media	3,9	7,9

25 1.2 Proliferación

Para el mantenimiento, se cortan en trozos los filamentos de color blanco obtenidos en el Ejemplo 1.1, conteniendo cada pieza uno o dos nudos auxiliares y se transfieren a un medio nuevo MS1 ó MS1-2 en placas de Petri. Para conservar la reserva se pueden colocar las placas de Petri en oscuridad a 4 °C durante al menos 4 meses.

30 Para una proliferación eficaz, se usan filamentos que contienen más que un nudo auxiliar. No obstante, también se pueden obtener resultados satisfactorios con filamentos que únicamente contienen un nudo auxiliar como material de partida.

35 Los filamentos o sus piezas obtenidas a través del corte de los filamentos que comprenden entre 2 y 6 nudos auxiliares se cultivan en recipientes de vidrio que contienen 66 ml de medio. El medio es SP1, que contiene macro sales de MS, micro sales de MS + vitaminas de MS, sacarosa como fuente de carbono, mio-inositol, biotina, ácido fólico como vitaminas no-MS adicionales, BAP (6-bencilaminopurina) como representativo de la familia de reguladores de desarrollo de citoquinina e IAA (ácido indol-3-acético) como representante de la familia de reguladores de desarrollo de auxina. El medio se solidifica con agar para plantas (para más detalles sobre la composición del medio véase la Tabla A siguiente).

40 Se colocan 6 filamentos o sus trozos en un recipiente, con el primer nudo justo por debajo de la superficie del agar. Se colocan los recipientes en oscuridad a una temperatura de entre 18 °C y 22 °C durante 5-6 semanas. Tras cinco

a ocho semanas, se llevan a cabo ciclos de sub-cultivo siguiendo básicamente el mismo procedimiento que se ha descrito anteriormente.

5 En cada sub-cultivo, se puede determinar la tasa de proliferación o la tasa de multiplicación dividiendo el número de filamentos formado (tras separar o cortar el tejido hasta recuperar el número original de nudos) entre el número inicial de filamentos. Se determinan las tasas de proliferación para 6 genotipos de 2 sub-cultivos consecutivos de entre 4 y 5 semanas (véase la tabla 2 siguiente).

Tabla 2: Tasas de proliferación de los genotipos

sub-cultivo	1	2
A971-1	7,0	5,5
A895-3	3,0	4,8
A1019-1	3,0	4,2
A938-5	1,0	5,8
A1010-3	2,0	1,4
A948-1	3,5	8,0
media	3,3	5,0

1.3. Enraizamiento

10 Se usan explantes pequeños para el enraizamiento. Cada filamento contiene uno o dos nudos auxiliares. Se transfieren los explantes a recipientes ventilados (cajas de ecolina con filtro XX). El medio de enraizamiento es MS0-2 (macro sales MS de intensidad media, micro sales de MS de intensidad completa y vitaminas MS, sacarosa como fuente de carbono, mio-inositol, biotina, ácido fólico como vitaminas no-MS, y agar para plantas como agente de solidificación) o RAI2-2 (macro sales MS de intensidad media, micro sales MS de intensidad completa y vitaminas MS, sacarosa como fuente de carbono, mio-inositol, biotina, ácido fólico como vitaminas no-MS adicionales, ácido indol-acético, ácido indol-butírico como reguladores de desarrollo de la familia de auxina y agar para plantas como agente de solidificación).

15 Se pueden usar ambos medios y dan resultados similares. Se enraizan las plantas durante cuatro semanas a una temperatura de entre 18 °C y 22 °C en un fotoperíodo de 16 h de aproximadamente 3000 lux. Se determinan los porcentajes de enraizamiento tras 4-6 semanas.

20 Se sacan las plántulas enraizadas fuera de los recipientes y se lavan en agua para retirar las trazas de medio y de agar. Se transfieren las plántulas al suelo en el invernadero a 20 °C donde se aclimatan y se tratan como plantas normales de cultivo de tejido.

Ejemplo 2. Osteospermum

25 2.1. Material de planta y ahilamiento

Se cultivan plantas de reserva madre certificadas de osteospermum en invernadero durante al menos 6 semanas en condiciones fitosanitarias controladas. Se obtienen ramificaciones para dichas plantas de reserva madre y se usan como explantes para multiplicación de escapos y ahilamiento.

30 Se retiran todas las hojas de las ramas y se esteriliza la superficie de las ramas defoliadas con una solución de hipoclorito de sodio de 1,3 % (blanqueo comercial de 30 %) durante 10 minutos y se lavan tres veces con agua destilada estéril.

Tras la esterilización, se cortan en trozos las ramas defoliadas en condiciones axénicas, conteniendo cada pieza uno o dos nudos auxiliares. Se colocan horizontalmente los explantes sobre un medio de inicio de escapo solidificado en una placa de Petri, con un máximo de dos explantes por placa de Petri. Se sellan las placas de Petri con Nescofilm.

35 Para el ahilamiento, se usaron medios basados en MS, MS1-2 y MS2Z, que diferían básicamente en la concentración de macro elementos de MS y en la composición de la hormona de desarrollo. Ambos medios se pueden usar para el ahilamiento de explantes de osteospermum, aunque determinados genotipos parece que presentan preferencias por uno u otro medio.

40 El medio MS1-2 contiene macro sales de MS de intensidad media + micro sales de MS de intensidad completa y vitaminas de MS, sacarosa como fuente de carbono, mio-inositol, biotina, ácido fólico como vitamina adicional, PVP

(polivinil pirrolidona) como enriquecimiento adicional y BAP (6-bencilaminopurina) y 2iP (2-isopentenil-adenina) como representativos de factores de desarrollo de la familia de reguladores de desarrollo de citoquinina. El medio se solidifica con agar para plantas. Se fija el pH en 5,8 antes del tratamiento en autoclave (para más detalles sobre la composición del medio véase la tabla A siguiente).

- 5 El medio MS2Z contiene micro sales de MS de intensidad completa + macro sales MS + vitaminas MS, sacarosa como fuente de carbono, mio-inositol, biotina y ácido fólico como vitaminas no-MS adicionales y zeatina como factor de desarrollo de la familia de reguladores de desarrollo de citoquina. El medio se solidifica con agar para plantas. Se fija el pH en 5,8 antes de someter a tratamiento de autoclave (para más detalles sobre la composición del medio véase la tabla A siguiente).
- 10 Se cultivan los explantes en oscuridad a una temperatura de 18 °C. Después de cuatro semanas de cultivo en oscuridad se someten a ahilamiento los escapos auxiliares para dar lugar a filamentos de color blanco. Cada filamento presenta uno o más nudos auxiliares.

Tabla 3: Número de filamentos por explante tras 4 semanas

genotipo	MS1-2	MS2Z
E192-1	0,75	0
D209-3	0	0
E207-2	3,3	2,2
E206-1	0,6	0,3
media	1,2	0,6

15 2.2. Proliferación

2.2.1. Cultivo de capa sencilla

Se cortan en trozos los filamentos de color blanco obtenidos en el Ejemplo 2.1, conteniendo cada pieza uno o dos nudos y se transfieren a un medio nuevo MS1-2 en placas de Petri para el mantenimiento después de cuatro-cinco semanas. Para conservar la reserva se pueden colocar las placas de Petri en oscuridad a 4 °C durante al menos 4 meses.

- 20 Para una proliferación eficaz, se usan filamentos que contienen al menos dos nudos auxiliares. Las otras etapas básicamente se llevan a cabo como se ha descrito en el Ejemplo 1.2 para petunia.

Tabla 4: Tasas de proliferación de los filamentos después de 4 semanas en placa de Petri

genotipo	Sub 1	Sub 2
E192-1	1,0	4,7
D209-3	0,8	4,3
E207-2	4,8	6,5
E206-1	5,5	4,5
media	3,0	5,0

25 2.2.2 Cultivo de doble capa

En un segundo experimento se cultivan los filamentos de color blanco o sus piezas obtenidas por medio de corte y que comprenden al menos 2 nudos auxiliares en recipientes de vidrio que contienen 66 ml de medio. El medio es MS0, que contiene micro MS + macro sales MS + vitaminas MS, sacarosa como fuente de carbono, mio-inositol, biotina, ácido fólico como vitamina no MS adicional y agar para plantas como agente de solidificación (para más detalles de la composición del medio véase la Tabla A siguiente).

- 30 Se colocan aproximadamente 5 filamentos en un recipiente, estando el primer nudo justo por debajo de la superficie del agar. Posteriormente, se añaden 2 ml de medio B1 líquido (micro MS + macro sales de MS + vitaminas de MS, sacarosa como fuente de carbono, mio-inositol, biotina, ácido fólico como vitaminas no MS adicionales y zeatina y

BAP (6-bencilaminopurina) como reguladores de desarrollo de la familia de citoquinina (para más detalles de la composición del medio véase la Tabla 1 siguiente)) sobre la parte superior del medio sólido. Para 100 ml de medio sólido, se usan 3 ml de B1 líquido. Se colocan los recipientes en oscuridad a 18-22 °C durante cinco semanas.

5 Para cada sub-cultivo, se puede determinar la tasa de proliferación o de la tasa de multiplicación dividiendo el número de filamentos formado (tras separar o cortar el tejido para recuperar el número original de nudos) entre el número inicial de filamentos.

2.3. Enraizamiento

10 Se usan explantes pequeños para el enraizamiento. Cada filamento contiene uno o dos nudos auxiliares. Se transfieren los explantes a recipientes ventilados (cajas de ecolina con filtro XX). El medio de enraizamiento es MS0-2 (macro sales MS de intensidad media, micro sales de MS de intensidad completa y vitaminas MS, sacarosa como agente de solidificación) o RAI2-2 (macro sales MS de intensidad media, micro sales MS de intensidad completa y vitaminas MS, sacarosa como fuente de carbono, mio-inositol, biotina, ácido fólico como vitaminas no-MS adicionales, y agar para plantas como agente de solidificación) o RAI2-2 (macro sales MS de intensidad media, micro sales MS de intensidad completa y vitaminas MS, sacarosa como fuente de carbono, mio-inositol, biotina, ácido fólico como vitaminas no-MS adicionales, ácido indol-acético, ácido indol-butírico como reguladores de desarrollo de la familia de auxina y agar para plantas como agente de solidificación).

15 Se pueden usar ambos medios y dan resultados similares. Se enraizan las plantas durante cuatro semanas a una temperatura de entre 18 °C y 22 °C en un fotoperíodo de 16 h de aproximadamente 3000 lux. Se determinan los porcentajes de enraizamiento tras 4-6 semanas.

20 Se sacan las plántulas enraizadas fuera de los recipientes y se lavan en agua para retirar las trazas de medio y de agar. Se transfieren las plántulas al suelo en el invernadero a 20 °C donde se aclimatan y se tratan como plantas normales de cultivo de tejido.

Ejemplo 3. Pelargonio

3.1. Material de planta y ahilamiento

25 Se cultivan plantas de reserva madre certificadas de pelargonio en invernadero durante al menos 6 semanas en condiciones fitosanitarias controladas. Se obtienen ramificaciones para dichas plantas de reserva madre y se usan como explantes para ahilamiento. Se retiran todas las hojas antes de la esterilización. Se esteriliza la superficie de los explantes con una solución de hipoclorito de sodio de 1,3 % (blanqueo comercial de 30 %) durante 15 minutos y se lavan tres veces con agua destilada estéril.

30 Se cortan en trozos las ramas defoliadas de manera que cada pieza resultante contenga uno o dos nudos. Se colocan horizontalmente los explantes sobre un medio en una placa de Petri, con un máximo de tres explantes por placa de Petri. Se sellan las placas de Petri con Nescofilm.

35 Para la multiplicación de escapos y el ahilamiento, se usaron medios basados en MS diferentes (MS1 y MS2Z). Ambos medios se pueden usar para la multiplicación de escapos y el ahilamiento de explantes de pelargonio. Determinados genotipos ensayados parece que presentan preferencias por uno u otro medio, no obstante, todos los resultados obtenidos son muy similares para ambos medios.

40 El medio MS1 contiene micro MS de intensidad media + macro sales de MS + vitaminas de MS, sacarosa como fuente de carbono, mio-inositol, biotina, ácido fólico como vitaminas no-MS adicionales, PVP (polivinil pirrolidona) como enriquecimiento adicional y BAP (6-bencilaminopurina) y 2iP (2-isopentenil-adenina) como reguladores de desarrollo de la familia de citoquinina y agar para plantas como agente de solidificación. Se fija el pH en 5,8 antes del tratamiento en autoclave (para más detalles sobre la composición del medio véase la tabla A siguiente).

El medio MS2Z contiene micro MS de intensidad completa + macro sales MS + vitaminas MS, sacarosa como fuente de carbono, mio-inositol, biotina y ácido fólico como vitaminas no-MS adicionales, zeatina como regulador de desarrollo de la familia de reguladores de desarrollo de citoquinina. Se fija el pH en 5,8 antes de someter a tratamiento de autoclave (para más detalles sobre la composición del medio véase la tabla A siguiente).

45 Se cultivan los explantes en oscuridad a una temperatura de entre 22 °C y 24 °C durante 3 a 4 semanas. En general, 60-80 % de los explantes forma un filamento.

Después de tres a cuatro semanas en oscuridad se someten a ahilamiento los escapos auxiliares para dar lugar a filamentos de color blanco. Cada filamento presenta uno o más nudos auxiliares.

3.2. Proliferación

50 Los filamentos de color blanco obtenidos en el Ejemplo 3.1 se transfieren a un medio nuevo MS1 ó MS2Z en placas de Petri para el mantenimiento. Se cortan en trozos que contienen uno o dos nudos. Para conservar la reserva se pueden colocar las placas de Petri en oscuridad a 4 °C durante al menos 4 meses.

5 Para una proliferación eficaz, cada filamento o sus trozos obtenidos pro medio de corte contienen al menos dos o tres, pero preferentemente cuatro nudos auxiliares al comienzo del sub-cultivo. Los filamentos se cultivan en recipientes de vidrio que contienen 66 ml de medio. El medio es MS0, que contiene micro MS, macro sales de MS + vitaminas de MS, sacarosa como fuente de carbono, mio-inositol, biotina, ácido fólico como vitaminas no-MS adicionales y agar para plantas como agente de solidificación (para más detalles sobre la composición del medio véase la Tabla A siguiente).

10 Se colocan aproximadamente 15 ± 5 filamentos en un recipiente, con el primer nudo justo por debajo de la superficie del agar. Posteriormente se añaden 2 ml de medio KE líquido (micro MS + sales macro MS + vitaminas MS, sacarosa como fuente de carbono, mio-inositol, biotina, ácido fólico como vitaminas no MS adicionales, zeatina y tidiazuron como reguladores de desarrollo de la familia de reguladores de desarrollo de citoquinina (para más detalles de la composición del medio véase la Tabla A siguiente)) sobre la parte superior del medio sólido. Para 100 ml de medio sólido se usan 3 ml de líquido KE. Se colocan los recipientes en oscuridad a 22-24 °C durante cuatro semanas. Tras cuatro semanas se pudo repetir el mismo procedimiento, como se ha descrito anteriormente.

15 En cada sub-cultivo, se puede determinar la tasa de proliferación o la tasa de multiplicación dividiendo el número de filamentos formado (tras separar o cortar el tejido hasta recuperar el número original de nudos) entre el número inicial de filamentos. Se determinan las tasas de proliferación para 10 genotipos de 3 sub-cultivos (véase la tabla 5 siguiente).

Tabla 5: Tasas de proliferación de 10 genotipos

sub-cultivo	1	2	3
Apache	4,7	5,0	3,7
Mirage	5,2	5,0	4,7
Charlotte	4,7	5,1	4,2
Helios	5,2	5,2	3,7
Olavi	5,4	4,9	3,6
Verseau	4,3	4,0	4,4
P.Blanche	4,7	5,5	3,9
Super Rose	5,0	4,4	3,9
Philiomel 1	4,8	4,8	4,5
Balcon Rose	4,5	5,0	3,6
media	4,9	4,9	4,0

3.3. Enraizamiento

20 Se usan explantes pequeños para el enraizamiento. Cada filamento contiene uno o dos nudos auxiliares. Se transfieren los explantes a recipientes ventilados (cajas de ecolina con filtro XXL). El medio de enraizamiento es MS0-2 (macro sales MS de intensidad media, micro sales de MS de intensidad completa y vitaminas MS, sacarosa como fuente de carbono, mio-inositol, biotina, ácido fólico como vitaminas no-MS adicionales, y agar para plantas como agente de solidificación) o RA12-2 (macro sales MS de intensidad media, micro sales MS de intensidad completa y vitaminas MS, sacarosa como fuente de carbono, mio-inositol, biotina, ácido fólico como vitaminas no-MS adicionales, ácido indol-acético, ácido indol-butírico como reguladores de desarrollo de la familia de auxina y agar para plantas como agente de solidificación).

25

30 Se pueden usar ambos medios y dan resultados similares. Se enraizan las plantas durante cuatro semanas a una temperatura de entre 22 °C y 24 °C en un fotoperíodo de 16 h de aproximadamente 3000 lux. Se determinan los porcentajes de enraizamiento para 10 genotipos, después de 4 semanas (véase tabla 6 siguiente).

Tabla 6: % de enraizamiento de 10 genotipos

sub-cultivo	MS0-2	RAI2-2
Apache	93	100
Helios	91	91
Charlotte	97	97
Olavi	90	85
Mirage	95	nd
S. Rose	87	100
P.Blanche	79	93
Philiomel 1	100	100
B. Rose	88	83
Verseau	82	100
media	90	94

Se sacan las plántulas enraizadas fuera de los recipientes y se lavan con agua para retirar las trazas de medio y de agar. Se transfieren las plántulas al suelo en invernadero a 20 °C donde se aclimatan y se tratan como plantas de cultivo tisular normales.

5

Tabla A: Medios

Compuesto	MS0	MS0-2	MS1	MS1-2	MS2Z	SP1	B1	KE	RAI2-2
Macro elementos	MS	MS media	MS	MS media	MS	MS mod.	MS	MS	MS media
KNO ₃	1,9 g l ⁻¹	0,95 g l ⁻¹	1,9 g l ⁻¹	0,95 g l ⁻¹	1,9 g l ⁻¹	1,8 g l ⁻¹	1,9 g l ⁻¹	1,9 g l ⁻¹	0,95 g l ⁻¹
NH ₄ NO ₃	1,65 g l ⁻¹	0,825 g l ⁻¹	1,65 g l ⁻¹	0,825 g l ⁻¹	1,65 g l ⁻¹	0,4 g l ⁻¹	1,65 g l ⁻¹	1,65 g l ⁻¹	0,825 g l ⁻¹
Ca(NO ₃) ₂ x 4 H ₂ O	-	-	-	-	-	1,2 g l ⁻¹	-	-	-
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,44 g l ⁻¹	0,22 g l ⁻¹	0,44 g l ⁻¹	0,22 g l ⁻¹	0,44 g l ⁻¹		0,44 g l ⁻¹	0,44 g l ⁻¹	0,22 g l ⁻¹
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,37 g l ⁻¹	0,185 g l ⁻¹	0,37 g l ⁻¹	0,185 g l ⁻¹	0,37 g l ⁻¹	0,36 g l ⁻¹	0,37 g l ⁻¹	0,37 g l ⁻¹	0,185 g l ⁻¹
KH ₂ PO ₄	0,17 g l ⁻¹	0,085 g l ⁻¹	0,17 g l ⁻¹	0,085 g l ⁻¹	0,17 g l ⁻¹	0,27 g l ⁻¹	0,17 g l ⁻¹	0,17 g l ⁻¹	0,085 g l ⁻¹
Micro elementos	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS
Vitaminas	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS
Sacarosa	30 g l ⁻¹	30 g l ⁻¹	30 g l ⁻¹	30 g l ⁻¹	30 g l ⁻¹	20 g l ⁻¹	30 g l ⁻¹	30 g l ⁻¹	10 g l ⁻¹
Mio-inositol	0,1 g l ⁻¹	0,1 g l ⁻¹	0,1 g l ⁻¹	0,1 g l ⁻¹	0,1 g l ⁻¹	0,1 g l ⁻¹	0,1 g l ⁻¹	0,1 g l ⁻¹	0,1 g l ⁻¹
Biotina	0,05 mg l ⁻¹	0,05 mg l ⁻¹	0,05 mg l ⁻¹	0,05 mg l ⁻¹	0,05 mg l ⁻¹	0,1 mg l ⁻¹	0,05 mg l ⁻¹	0,05 mg l ⁻¹	0,05 mg l ⁻¹
Ácido fólico	0,5 mg l ⁻¹	0,5 mg l ⁻¹	0,5 mg l ⁻¹	0,5 mg l ⁻¹	0,5 mg l ⁻¹	0,5 mg l ⁻¹	0,5 mg l ⁻¹	0,5 mg l ⁻¹	0,5 mg l ⁻¹
PVP (polivinil pirrolidona)			0,5 mg l ⁻¹	0,5 mg l ⁻¹					
BA (6-bencilaminopurina)			0,1 mg l ⁻¹	0,1 mg l ⁻¹		0,25 mg l ⁻¹	5,0 mg l ⁻¹		
2iP (2-isopenteniladenina)			0,1 mg l ⁻¹	0,1 mg l ⁻¹					
Zeatina					0,2 mg l ⁻¹		0,2 mg l ⁻¹	0,2 mg l ⁻¹	
Tidiazuron (TDZ)								0,05 mg l ⁻¹	
IAA (ácido indol-3-acético)						0,1 mg l ⁻¹			0,5 mg l ⁻¹
IBA (ácido indol-butírico)									0,5 mg l ⁻¹
Agar para plantas	6 mg l ⁻¹	6 mg l ⁻¹	6 mg l ⁻¹	6 mg l ⁻¹	6 mg l ⁻¹	6 mg l ⁻¹	6 mg l ⁻¹		6 mg l ⁻¹
pH	5,8 (antes de autoclave)	5,8 (antes de autoclave)	5,8 (antes de autoclave)	5,8 (antes de autoclave)	5,8 (antes de autoclave)	5,8 (antes de autoclave)	5,8 (antes de autoclave)	5,8 (antes de autoclave)	5,8 (antes de autoclave)

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la producción de plántulas y/o una reserva de plantas micro-parental que pertenecen al grupo de ornamentales herbáceas, comprendiendo dicho procedimiento una fase de cultivo *in vitro* durante la cual los explantes obtenidos a partir de la reserva parental de especies objeto de propagación, se someten a micro-propagación que se lleva a cabo en condiciones apropiadas y en un medio de cultivo apropiado, con el fin de producir micro-plántulas que, cuando se someten a una fase de cultivo *in vivo*, se pretende que se desarrollen para dar lugar a plantas o para dar lugar a la reserva micro-parental, **que se caracteriza porque**, para llevar a cabo dicha micro-propagación:
- a) los tallos de explantes de ramas se obtienen a partir de la reserva parental de especies objeto de propagación,
 - b) los explantes se colocan, en condiciones axénicas, en oscuridad durante un período de tiempo apropiado, en un medio de inicio de escapo que está constituido de manera tal que se adapta a cada especie de planta objeto de propagación, dando lugar a la inducción de una primera generación de formación de filamentos de color blanco, comprendiendo dicha primera generación de filamentos uno o más brotes auxiliares,
 - c) cada filamento de color blanco se encuentra dividido en una pluralidad de trozos, comprendiendo cada uno de ellos al menos un brote auxiliar, y dichos filamentos y/o trozos obtenidos a partir de una primera generación de filamentos de color blanco son colocados de nuevo en condiciones axénicas y en oscuridad en un medio de proliferación durante un período de tiempo apropiado para permitir que los tejidos de los esquejes de plantas se multipliquen con el fin de producir un gran cantidad de filamentos de color blanco ahilados, que comprenden entre 2 y 10 nudos auxiliares, con el fin de inducir la formación de una nueva generación de filamentos de color blanco, y se repite el procedimiento tanto como sea necesario para producir generaciones consecutivas diferentes de filamentos de color blanco hasta que se haya obtenido la cantidad deseada de filamentos de color blanco;
 - d) y dichos filamentos y/o trozos se colocan en condiciones axénicas, en presencia de luz, y durante un período de tiempo apropiado, o en el interior de un medio de enraizamiento, que permite que cada brote auxiliar produzca una micro-plántula que presenta raíces.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **que se caracteriza porque** se usan meristemos tomados de la reserva parental como explantes que se cultivan en condiciones axénicas en presencia de luz durante un primer período de tiempo en un medio de desarrollo común a cada variedad de planta objeto de propagación, con el fin de producir la formación de pequeñas plántulas que presentan unos primeros primordios foliares y posteriormente, durante un segundo período de tiempo, en un medio de enraizamiento común para cada variedad de planta, con el fin de obtener plántulas enraizadas que se encuentran libres de bacterias y virus con la intención de colocarlas en el medio de proliferación en oscuridad para producir dichos filamentos de color blanco.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, **que se caracteriza porque** se usan micro-esquejes tomados de la reserva parental certificada libre de bacterias y de virus como explantes.
4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, **que se caracteriza porque**, los filamentos y/o sus trozos obtenidos a partir de una primera generación de filamentos de color blanco se vuelven a colocar en condiciones axénicas en un medio de proliferación nuevo y se cultivan en oscuridad durante un período de tiempo apropiado con el fin de inducir la formación de una nueva generación de filamentos de color blanco, y se repite el procedimiento tanto como sea necesario con el fin de producir una generación consecutiva diferente de filamentos de color blanco hasta que se haya obtenido la cantidad deseada de filamentos de color blanco.
5. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **que se caracteriza porque** se emplea un sistema de cultivo de dos capas con el fin de favorecer la multiplicación del escapo **que se caracteriza porque** se proporciona el medio de inicio de escapo y/o el medio de proliferación en forma de un sistema de dos capas que comprende una capa inferior solidificada que comprende básicamente macro y micro-elementos, vitaminas y una fuente de carbono, pero no un regulador de desarrollo, estando superpuesta la capa inferior con una capa superior de fluido que comprende un regulador de desarrollo, que contribuye a la multiplicación del escapo favoreciendo la ruptura y el desarrollo de brotes auxiliares para dar lugar a escapos ahilados y además para dar lugar a filamentos de color blanco y/o el desarrollo de escapos en crecimiento para dar lugar a escapos que comprenden entre 2 y 10 nudos auxiliares.
6. El procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **que se caracteriza porque** el número de brotes auxiliares de un filamento de color blanco que se desarrolla a partir de un nudo inicial está al menos entre 2 y 10 brotes auxiliares/por nudo inicial.
7. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **que se caracteriza porque** se usa el medio de cultivo de tipo "MS" como medio de inicio y/o proliferación, enriquecido con un regulador de desarrollo que se proporciona en una concentración que contribuye a la multiplicación de escapos favoreciendo la ruptura y el desarrollo de brotes auxiliares para dar lugar a escapos ahilados y posteriormente para dar lugar a filamentos de color blanco y/o el desarrollo de escapos en crecimiento para dar lugar a escapos que comprenden entre 2 y 10 nudos auxiliares.

8. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **que se caracteriza porque** el medio de inicio y/o proliferación de escapo comprende un regulador de desarrollo que pertenece a la familia de reguladores de desarrollo de citoquinina o una combinación de reguladores de desarrollo que pertenecen a la familia de reguladores de desarrollo de citoquinina y a la familia de reguladores de desarrollo de auxina.
- 5 9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, **que se caracteriza porque** los reguladores de desarrollo que pertenecen a la familia de reguladores de desarrollo de citoquinina o a la familia de reguladores de desarrollo de auxina se proporcionan en una concentración de entre 0,01 mg/l y 5,0 mg/l.
- 10 10. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **que se caracteriza porque** los filamentos de color blanco se almacenan, a temperatura ambiente, y en oscuridad, en un medio de proliferación que se cambia periódicamente, antes de ser sometido a la fase de enraizamiento, durante la cual cada brote produce una micro-plántula enraizada con la intención de proporcionar un plantón o una reserva de planta micro-parental.
- 15 11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, **que se caracteriza porque** los filamentos de color blanco se almacenan a una temperatura de entre 2 °C y 10 °C, durante hasta 10 meses antes de ser sometidos a la fase de enraizamiento.
- 20 12. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **que se caracteriza porque** las plantas seleccionadas entre el grupo que consiste en pelargonio, petunia incluyendo petunia colgante, poinsettia, ciclamen, crisantemo, alegría, verbena y torenia, se usan en el procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones anteriores.