

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 699 811**

51 Int. Cl.:

<b>A01H 3/00</b>	(2006.01)
<b>C09D 167/00</b>	(2006.01)
<b>C10L 5/44</b>	(2006.01)
<b>A01G 22/00</b>	(2008.01)
<b>A01H 4/00</b>	(2006.01)
<b>A01H 5/06</b>	(2008.01)
<b>C09D 105/00</b>	(2006.01)
<b>C09D 191/06</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.06.2013 PCT/GB2013/051543**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **19.12.2013 WO13186558**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.06.2013 E 13739482 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.09.2018 EP 2858480**

54 Título: **Propagación de plantas**

30 Prioridad:

**12.06.2012 GB 201210374**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**12.02.2019**

73 Titular/es:

**NEW ENERGY FARMS LIMITED (100.0%)  
305 Essex Road 18  
Leamington, ON N8H 3V5, CA**

72 Inventor/es:

**CARVER, PAUL ADRIAN y  
TIESSEN, DEAN WILLIAM**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 699 811 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

## Propagación de plantas

La presente solicitud se refiere en general al campo de la propagación de plantas. En particular, la presente invención se refiere a un procedimiento para aumentar la formación de yemas en mini rizomas y mini esquejes de tallo. La invención proporciona también mini rizomas encapsulados y mini esquejes de tallo. La invención proporciona y describe también diversos usos finales para los mini rizomas encapsulados y los mini esquejes de tallo y para las plantas que crecen a partir de los mismos. La invención proporciona también un procedimiento de modificación de la arquitectura de los rizomas y los rizomas que tienen una arquitectura modificada y un procedimiento de modificación de la arquitectura de los esquejes de tallo y los esquejes de tallo que tienen una arquitectura modificada. La invención proporciona y describe también un revestimiento para un propágulo (mini rizomas y mini esquejes de tallo) y un propágulo revestido con el mismo.

## Antecedentes

Recientemente, ha existido un gran interés en las fuentes de energía alternativas que pueden reducir nuestra dependencia de las fuentes de energía tradicionales, tales como el carbón, el petróleo y la energía nuclear. Una fuente de energía alternativa de este tipo la representan los biocombustibles, que es un combustible derivado de cultivos (cultivos energéticos) que pueden quemarse para producir calor y electricidad o que pueden tratarse con enzimas para producir azúcares que pueden usarse para producir etanol o hidrógeno. *Miscanthus* es un ejemplo de una hierba perenne que se ha identificado como un cultivo energético debido a sus altos rendimientos de biomasa.

Hay una serie de especies de *Miscanthus*, pero en la actualidad el clon más productivo es un híbrido estéril, *Miscanthus x giganteus*, que es el resultado de un cruce natural entre *M. sacchariflorus* y *M. Sinensis*. *Miscanthus* es una hierba con semillas, pero el híbrido *M. x giganteus* es un triploide que, por lo tanto, es estéril y no produce semillas. Por lo tanto, solo puede multiplicarse por medios vegetativos, lo que ha restringido severamente su introducción comercial.

La principal preocupación con las variedades sembradas de *Miscanthus* es su potencial para convertirse en invasivas, sin embargo, la alternativa a las variedades sembradas implica depender de la propagación vegetativa, que es en gran medida ineficiente. Los medios convencionales para la propagación vegetativa de *Miscanthus* implican plantar esquejes de rizomas producidos a partir de cultivos de multiplicación dedicados, siendo los rizomas tallos subterráneos. Debido a que los cultivos comerciales de *Miscanthus* se desarrollan durante 20 años o más, sus complejos de raíces pueden llegar a ser bastante grandes y leñosos. Los rizomas que son adecuados para establecer nuevos cultivos generalmente se producen específicamente en campos de multiplicación y, frecuentemente, se siembran a alta densidad y se cosechan después de 2-4 años. Estos rizomas convencionales tienen una forma desigual y, frecuentemente, pueden tener numerosos pelos radicales y raíces adventicias, lo que dificulta su procesamiento usando equipos de cultivo convencionales y dificultando su almacenamiento y manipulación debido al enredado de los pelos radicales y debido a su naturaleza de gran tamaño, desigual y voluminosa. Los esquejes de rizomas se obtienen a partir de estos "complejos de raíces", que normalmente tienen una longitud de aproximadamente 12-15 cm y un peso de aproximadamente 50 g, incluyendo el suelo circundante. Aunque estos rizomas parecen robustos, son bastante sensibles a la deshidratación y, por lo tanto, requieren un almacenamiento y una manipulación cuidadosos. Los factores indicados anteriormente hacen que la multiplicación de *Miscanthus* sea relativamente cara en comparación con otros cultivos. Por ejemplo, bajo condiciones de crecimiento típicas en Europa, la tasa de multiplicación de los rizomas de *Miscanthus* es de aproximadamente 3-5 veces en una temporada de crecimiento, lo que significa que un rizoma producirá un máximo de cinco rizomas después de un crecimiento de un año. Esto contrasta con los cereales que tienen una tasa de multiplicación de hasta 80 veces y con la colza que tiene una tasa de multiplicación de más de 5.000 veces. De manera similar, los costes de la plantación de rizomas de *Miscanthus* convencional son también altos en comparación con los costes de limpieza, de procesamiento y de siembra de cultivos sembrados.

Se han realizado intentos para resolver los problemas indicados anteriormente mediante la adaptación del equipo de siembra para adaptarlo a los rizomas, incluyendo la introducción de siembra de precisión, habiendo aumentado ambos la fiabilidad del establecimiento del cultivo. Sin embargo, hasta la fecha, no se han realizado intentos para adaptar el propio rizoma para adaptarlo mejor a los aparatos de cultivo convencionales.

Muchos de los cultivos (hierbas perennes) requeridos para producir materia prima para combustible, alimento y fibra no poseen rizomas en absoluto o en cantidades suficientes y, por lo tanto, requieren la propagación por tallo. Sin embargo, existen problemas similares con la propagación de plantas basada en esquejes de tallo. Por ejemplo, la caña de azúcar es un cultivo económicamente importante para la producción de azúcar y para la producción de biocombustibles, pero la producción de caña de azúcar requiere gran cantidad de mano de obra y depende del uso de maquinaria especializada. El cultivo de caña de azúcar implica un proceso bastante prolongado de aproximadamente 2 años para la producción de semilla de caña usando técnicas de micropropagación, seguido de ensayos y selección para desarrollar nuevos cultivares de caña de azúcar. Con una alta presión de las enfermedades, los nuevos cultivares pueden tardar hasta cinco años en

llegar al mercado. Entonces comienza la multiplicación de la caña de azúcar a partir de la semilla de caña, un proceso que generalmente dura aproximadamente 3 años antes de que pueda comenzar la producción comercial. Típicamente, aproximadamente el 20% de la superficie total de cultivo se reserva para la multiplicación, lo que significa que aproximadamente el 20% de la tierra está comprometida durante al menos 3 años, aunque no de manera continua, sí para ciclos de multiplicación sucesivos. Las tasas de multiplicación durante el período de 3 años son también relativamente ineficientes, con un aumento de aproximadamente 8 veces.

Se ha informado acerca de algunas mejoras de eficiencia para cultivos rizomatosos, tales como la cúrcuma y el bambú, mediante el uso de técnicas de micropropagación. Por ejemplo, una publicación a nombre de Nayak (Plant Growth Regulation 32: 41-47, 2000) describe la multiplicación in vitro de la cúrcuma usando técnicas de cultivo de tejidos y describe además la inducción de micro-rizomas usando sacarosa y 6-benciladenina y un fotoperíodo especificado. De manera similar, Lo-apirukkul et al., (J Nat Med (2012) 66: 265-270) describen la micropropagación de una planta medicinal tailandesa, Curcuma comosa Roxb., y la inducción de micro-rizomas. Kapoor y Rao (Kapoor and Rao (Plant Cell, Tissue and Organ Culture (2006) 85: 211-217) han informado acerca de la inducción in vitro de rizomas en bambú. Las mejoras de eficiencia informadas en los procedimientos de la técnica anterior que implican el uso de técnicas de micropropagación in vitro muestran una mejora de aproximadamente siete veces en comparación con los procedimientos convencionales. Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de procedimientos cada vez más eficientes para la propagación de plantas de reproducción vegetativa.

Uno de los principales obstáculos que previenen un cultivo más amplio de *Miscanthus* y otros cultivos similares son la propagación ineficiente descrita anteriormente debido, al menos en parte, a sus medios vegetativos para la reproducción. Por lo tanto, sigue existiendo una necesidad de medios económicamente más eficientes para el establecimiento de *Miscanthus* y otros cultivos que se reproducen de manera vegetativa.

### Sumario de la invención

La presente invención tiene como objetivo resolver algunos de los problemas indicados anteriormente asociados con la propagación de *Miscanthus* y otras plantas de reproducción vegetativa, mediante la provisión de un proceso de propagación de plantas más eficiente y mediante la provisión de un propágulo encapsulado que está en una forma lista para la siembra.

Las mejoras de eficiencia obtenidas mediante la realización de los procedimientos de la invención proporcionan una mejora, dependiendo de la planta en cuestión, de entre aproximadamente 50 veces y aproximadamente 200 veces en comparación con los procedimientos de la técnica anterior, lo que muestra una mejora de aproximadamente siete veces en comparación con las técnicas convencionales.

En la presente memoria, se describe un procedimiento para la propagación de una planta de reproducción vegetativa, que comprende las etapas de:

- (i) micropropagación del material vegetal a partir de una planta de reproducción vegetativa seguida de multiplicación para producir plántulas;
- (ii) poner en contacto las plántulas o una parte de las mismas de la etapa (i) con al menos una hormona vegetal y hacer crecer las plántulas y recolectar mini rizomas o mini esquejes de tallo a partir de las mismas;
- (iii) encapsular sustancialmente los mini rizomas o mini esquejes de tallo producidos en la etapa (ii) en un medio de crecimiento vegetal.

La presente invención proporciona mini rizomas encapsulados y mini esquejes encapsulados, a los que se hace referencia colectivamente en la presente memoria como "propágulos encapsulados". También se proporcionan en la presente memoria diversos usos para los propágulos encapsulados y se describen en la presente memoria varios usos para las plantas obtenidas a partir de los mismos.

La presente invención describe también un polímero biodegradable para el revestimiento de un propágulo y propágulos revestidos en el mismo.

Se proporciona también un procedimiento para alterar la arquitectura de un rizoma o un esqueje de tallo usando hormonas vegetales y realizando los procedimientos de la invención.

### Descripción detallada de la invención

Las ineficiencias asociadas a los procesos convencionales para la propagación de *Miscanthus* se superan en el proceso de la presente invención, lo que resulta en una mayor productividad y en un producto final más uniforme. Además, los procedimientos de la invención son más susceptibles a la automatización, resultando en mayores mejoras de eficiencia en comparación con los procesos convencionales. Además, debido al tamaño y a la forma más uniformes de los mini

rizomas y los mini esquejes de tallo producidos por los procedimientos, puede usarse fácilmente equipo agrícola convencional en el proceso de plantación después de una adaptación mínima, cuando sea necesario, eliminando de esta manera cualquier gasto adicional asociado al tener que producir equipos a medida.

5 En la presente memoria se describe un procedimiento para la propagación de una planta de reproducción vegetativa, que comprende las etapas de:

(i) micropropagación del material vegetal a partir de una planta de reproducción vegetativa seguida de multiplicación para producir plántulas;

(ii) poner en contacto las plántulas o una parte de las mismas de la etapa (i) con al menos una hormona vegetal y hacer crecer las plántulas y recolectar los mini-rizomas o los mini esquejes de tallo a partir de las mismas;

10 (iii) encapsular sustancialmente los mini-rizomas o los mini esquejes de tallo producidos en la etapa (ii) en un medio de crecimiento vegetal.

15 La micropropagación es una técnica hortícola estándar y bien conocida usada para el aumento rápido de grandes cantidades de plántulas. La micropropagación descrita en la etapa (i) del procedimiento tiene como objetivo la producción de grandes cantidades de material adecuado para entrar a la etapa (ii) del procedimiento. Las técnicas de micropropagación usadas pueden ser cualquier técnica de micropropagación convencional, tal como cultivo de tejidos o esquejes de tallo enraizados.

20 La micropropagación resulta en plántulas que están listas para ser multiplicadas, típicamente en un invernadero. Se usan medios convencionales para la multiplicación de plantas para esta etapa del procedimiento. La multiplicación en invernadero de las plántulas resulta típicamente en un aumento de 20-30 veces cada 2-3 meses. En el caso de *Miscanthus* y *Arundo Donax*, la micropropagación y la multiplicación resultan en que cada planta genera aproximadamente 10 plantas en un ciclo de aproximadamente 8 semanas; a continuación, esas 10 plantas pueden generar, a su vez, aproximadamente 100 plantas en un ciclo adicional de aproximadamente 8 semanas.

25 De manera ventajosa, la micropropagación seguida de una multiplicación puede resultar en que cada 1 (una) planta genere 10 millones de plántulas, cepellones o esquejes de raíces desnudas (que hacen referencia a tallos individuales que pueden separarse de plantas más grandes) en menos de 6 meses o en menos en 8 meses o en menos de 10 meses o en menos de 12 meses o en menos de 14 meses o en menos de 16 meses o en menos de 18 meses, dependiendo de la planta en cuestión.

30 De manera ventajosa, la micropropagación seguida por una multiplicación resulta en una tasa de mutación reducida en comparación con la micropropagación convencional, lo que una vez más contribuye a las mejoras de eficiencia globales conseguidas al realizar los procedimientos de la invención.

Entonces, las plántulas resultantes están listas para el tratamiento hormonal en la etapa (ii) del proceso.

35 Los términos "plántula", "cepellón de planta" y "esqueje de raíz desnuda" se usan indistintamente en la presente memoria y se considera que hacen referencia a las pequeñas plantas producidas siguiendo las técnicas de micropropagación y de multiplicación de la etapa (i) del procedimiento. El tamaño de la plántula variará dependiendo de la planta que está siendo propagada, y una persona con conocimientos tendrá a su disposición medios adecuados para generar plántulas a partir de cualquier planta determinada. En el caso de *Miscanthus*, las plántulas están comprendidas típicamente en el intervalo de al menos 2-5 cm de longitud.

40 El término "rizoma", tal como se usa en la presente memoria, se usa en su sentido convencional para hacer referencia a un tallo subterráneo de una planta, que produce típicamente raíces y brotes. El término planta "rizomatosa", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier planta capaz de producir un rizoma. El término "mini-rizoma" es un término conocido en la técnica y se refiere a un rizoma completo a partir de cualquier especie de planta determinada que es aproximadamente el 10% del tamaño de un rizoma completo típico para esa especie de planta, preferentemente aproximadamente el 5% del tamaño de un rizoma completo típico para esa especie de planta. Por ejemplo, un rizoma entero típico de *Miscanthus* tiene aproximadamente 50 g de peso y entre aproximadamente 12 a 15 cm de longitud, mientras que un mini-rizoma de la misma especie de planta es típicamente de aproximadamente 5 g de peso, preferentemente de aproximadamente 4 g o 3 g o 2 g de peso y de aproximadamente 2 a 5 cm de longitud, preferentemente entre aproximadamente 1 a 2 cm de longitud.

50 La expresión "esqueje de tallo", tal como se usa en la presente memoria, se usa en su sentido convencional en el que se extrae una parte de una planta madre determinada y se estimula para que crezca como una planta independiente colocando la parte de planta extraída en un medio de crecimiento adecuado, tal como uno o más de los siguientes: tierra, compost, tierra para macetas, lana de roca, perlita, vermiculita, fibra de coco, pellets de arcilla expandida, hidrogel y agua, lo que facilita el crecimiento de nuevas raíces y/o tallos, lo que permite que el esqueje de tallo se convierta en una planta

independiente de la planta de origen. La expresión "mini esqueje de tallo", tal como se usa en la presente memoria, hace referencia a un esqueje de tallo a partir de cualquier especie de planta determinada que es aproximadamente el 10% del tamaño de un esqueje de tallo típico para esa especie de planta, preferentemente aproximadamente el 5% del tamaño de un esqueje de tallo típico para esa especie de planta. Por ejemplo, un esqueje de tallo típico de *Arundo donax* tiene aproximadamente 100 g de peso y entre aproximadamente 40 a 60 cm de longitud, mientras que un mini esqueje de tallo de la misma especie de planta tiene típicamente aproximadamente 10 g de peso, preferentemente de aproximadamente 4 g o 3 g o 2 g de peso y entre aproximadamente 2 a 4 cm de longitud. En el caso de la caña de azúcar, un esqueje de tallo convencional es de 30 a 40 cm de longitud, mientras que un mini esqueje de tallo de la misma especie de caña de azúcar tiene típicamente aproximadamente de 2 a 4 cm de longitud.

Las plántulas producidas en la etapa (i) del proceso se someten a continuación a la etapa (ii) del proceso, que comprende un tratamiento hormonal de las plántulas con citoquinina(s) y/o auxina(s). Se aplica cualquier hormona vegetal determinada a una tasa inferior a aproximadamente 1.000 ppm, inferior a aproximadamente 900 ppm, inferior a aproximadamente 800 ppm, inferior a aproximadamente 700 ppm, inferior a aproximadamente 600 ppm, inferior a aproximadamente 500 ppm, inferior a aproximadamente 400 ppm, inferior a aproximadamente 300 ppm, inferior a aproximadamente 200 ppm, inferior a aproximadamente 100 ppm, inferior a aproximadamente 90 ppm, inferior a aproximadamente 80 ppm, inferior a aproximadamente 70 ppm, inferior a aproximadamente 60 ppm, inferior a aproximadamente 50 ppm, inferior a aproximadamente 40 ppm, inferior a aproximadamente 30 ppm, inferior a aproximadamente 20 ppm o inferior a aproximadamente 10 ppm.

La citoquinina puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en kinetina, zeatina, 6-bencilaminopurina, difenilurea y tidiazurón (TDZ). La auxina puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en ácido indol-3-actético (IAA), ácido 4-cloroindol-3-actético (4-Cl-IAA), ácido 2-fenilactético (PAA) y ácido indol-3-butírico (IBA). Es preferente una combinación de bencilaminopurina, TDZ e IAA en el caso de la propagación de *Miscanthus*. Preferentemente, cada uno de entre bencilaminopurina, TDZ e IAA se aplica a una tasa inferior a aproximadamente 1.000 ppm, inferior a aproximadamente 900 ppm, inferior a aproximadamente 800 ppm, inferior a aproximadamente 700 ppm, inferior a aproximadamente 600 ppm, inferior a aproximadamente 500 ppm, inferior a aproximadamente 400 ppm, inferior a aproximadamente 300 ppm, inferior a aproximadamente 200 ppm, inferior a aproximadamente 100 ppm, inferior a aproximadamente 90 ppm, inferior a aproximadamente 80 ppm, inferior a aproximadamente 70 ppm, inferior a aproximadamente 60 ppm, inferior a aproximadamente 50 ppm, inferior a aproximadamente 40 ppm, inferior a aproximadamente 30 ppm, inferior a aproximadamente 20 ppm o inferior a aproximadamente 10 ppm. Las combinaciones y las concentraciones de hormonas vegetales pueden ser optimizadas fácilmente, si es necesario, por una persona con conocimientos en la materia, dependiendo de la planta a ser propagada.

Según la presente invención, después de la etapa (i) del proceso y después del tratamiento hormonal de la etapa (ii), pero antes de la recolección de los mini rizomas o los mini esquejes de tallo, las plantas se someten a un estrés abiótico y mecánico temporal.

El estrés abiótico puede comprender someter a la planta en crecimiento a cualquier cambio ambiental temporal en comparación con las condiciones de crecimiento normales para la planta en cuestión. El estrés puede ser uno o más de entre: (i) un estrés osmótico (que puede ser causado por un límite o un exceso de sal o agua en comparación con los niveles normales de sal o agua); (ii) un estrés por temperatura (que puede ser causado por la exposición de la planta a calor o frío excesivos en comparación con las condiciones normales de crecimiento de la planta en cuestión); (iii) un estrés de nutrientes (que puede ser causado por la falta de nitrógeno, fósforo, azufre, etc.); o (iv) un estrés oxidativo. La exposición de las plantas al estrés abiótico y/o mecánico temporal sirve para estimular la formación de yemas.

El estrés mecánico se refiere a cualquier estrés no ambiental resultante de una acción física en una planta e implica recortar las partes aéreas de la planta hasta un punto justo encima de un nudo.

La referencia en la presente memoria a un estrés "temporal" se entiende que significa una exposición a un estrés no continuo, que puede implicar la exposición de la planta a uno o más estreses determinados en períodos intermitentes. Por ejemplo, los períodos intermitentes de estrés pueden ser 1, 2, 3, 4 o 5 o más ocasiones de exposición separadas de la planta a un estrés entre períodos sin estrés.

La etapa (ii) del proceso (poner en contacto las plántulas con al menos una hormona vegetal), que comprende la exposición de las plantas a un estrés abiótico o mecánico, puede durar entre aproximadamente 12 y 24 semanas, dependiendo de la planta en cuestión y dependiendo de si se han formado o no suficientes yemas.

El contacto de las plántulas con al menos una hormona vegetal puede ocurrir antes, después o durante la exposición de las plantas a un estrés abiótico y mecánico temporal. Las hormonas vegetales preferentes incluyen bencilaminopurina, TDZ e IAA, uno o más de los cuales pueden aplicar a una tasa de <1.000 ppm (menos de mil partes por millón).

Según la presente invención, se proporciona un procedimiento para aumentar la formación de yemas en mini rizomas y

mini esquejes de tallo, que comprende las etapas de:

(i) micropropagación del material vegetal a partir de una planta de reproducción vegetativa seguida de multiplicación para producir plántulas;

(ii) poner en contacto las plántulas o una parte de las mismas de la etapa (i) con al menos una hormona vegetal;

5 (iii) exponer las plántulas después de la etapa (ii) anterior a un estrés abiótico y mecánico temporal, en el que el estrés temporal comprende una exposición no continua a uno o más estreses en períodos intermitentes entre periodos sin estrés y en el que dicho estrés abiótico comprende uno cualquiera o más de entre: (i) un estrés osmótico; (ii) un estrés por temperatura; (iii) un estrés nutricional; y (iv) un estrés oxidativo y en el que el estrés mecánico comprende recortar las partes aéreas hasta un punto justo encima de un nudo;

10 (iv) cultivar las plántulas y cosechar los mini rizomas o los mini esquejes de tallo que pesan menos de aproximadamente 25 g; y

(v) encapsular los mini rizomas o mini esquejes de tallo producidos en la etapa (iv) en un medio de crecimiento vegetal.

15 A continuación, las plantas tratadas con hormonas se cultivan en un campo o en un invernadero bajo condiciones de crecimiento óptimas. En el caso de *Arundo donax* u otras plantas producidas a partir de esquejes de tallo, esta fase de crecimiento puede abarcar un período de aproximadamente 12 meses. Los brotes que salen de las nuevas yemas se eliminan y se cortan (con máquina o a mano) en longitudes cortas, lo que resulta en mini esquejes de tallo.

20 En el caso de *Miscanthus*, esta fase de crecimiento puede abarcar un período de aproximadamente 12 meses o hasta que el tamaño de la planta sea de aproximadamente 20 cm de longitud y los rizomas tengan un peso de aproximadamente 2 a 5 g y/o hasta que la capacidad de las yemas de los rizomas sea de aproximadamente 20 yemas por rizoma.

25 A continuación, el material vegetal rizomatoso que crece en el campo o en un invernadero puede someterse a una trituración o separación ligera del complejo de la raíz con el fin de separar los mini rizomas a partir del mismo. De manera ventajosa, este proceso de trituración o de separación puede ser automatizado para tomar directamente el material vegetal desde el campo o el invernadero y para separar los mini rizomas a partir del complejo de raíces listos para la etapa de encapsulación.

30 El tratamiento hormonal seguido por el ciclo de crecimiento en el campo o en invernadero conduce a la generación de mini rizomas a partir de las plántulas de la etapa (i). De manera ventajosa, en el caso de la propagación de *Miscanthus*, los mini rizomas tienen aproximadamente un peso de 2 a 5 g en comparación con el peso aproximado de 30 a 50 g de los rizomas producidos mediante los procedimientos de producción convencionales. Una ventaja adicional de los mini rizomas de *Miscanthus* es también que su forma y tamaño son más uniformes que los de los rizomas de las plantas de *Miscanthus* de producción convencional, lo que significa que pueden plantarse con una adaptación mínima (cuando sea necesario) de la maquinaria agrícola disponible, evitando de esta manera el gasto asociado con la provisión de maquinaria agrícola especialmente adaptada o hecha a medida.

35 Los pequeños mini rizomas o mini esquejes de tallo con forma uniforme resultantes de la etapa (ii) del procedimiento están entonces listos para su encapsulación. De manera ventajosa, el proceso de encapsulación puede ser automatizado. La automatización combinada de los procesos de trituración (en el caso de plantas rizomatosas) y de encapsulación contribuirán a mayores mejoras de eficiencia.

40 De manera ventajosa, el mini rizoma o mini sección o esqueje de tallo pueden encapsularse en cualquier medio de crecimiento de plantas, tal como compost, tierra para macetas, turba, hidrogel, tierra, lana de roca, perlita, vermiculita, espuma, espuma de sosa, piedra pómez, fibra de coco, pellets de arcilla expandida, etc. El rizoma encapsulado o el propágulo de mini esqueje de tallo encapsulado resultante es una unidad de siembra estable de menos de aproximadamente 10 g, o menos de aproximadamente 15 g para algunos cultivos, y tiene una forma lista para la siembra de precisión usando equipos agrícolas convencionales mínimamente adaptados o preparados para el almacenamiento hasta que sea necesario.

45 El material de encapsulación puede comprender también compuestos, tales como hormonas vegetales (como citoquininas o auxinas), reguladores del crecimiento de plantas, micorrizas, organismos endofíticos, organismos simbióticos u otros organismos beneficiosos, tensioactivos, geles, fungicidas, nematocidas, insecticidas, nutrientes orgánicos e inorgánicos, agua, súper absorbentes basados en polímeros y compuestos orgánicos, etc. para ayudar al almacenamiento de los mini rizomas y los mini esquejes para prevenir cualquier pérdida de material debida al deterioro y  
50 para mejorar la supervivencia y el rendimiento de los propágulos una vez plantados en el campo.

Según una característica preferente de la presente invención, a continuación, el material encapsulado se reviste

sustancialmente en un polímero biodegradable, que tiene preferentemente un punto de fusión comprendido entre 30 y 65°C.

Preferentemente, el polímero se selecciona de uno o más de entre cera, poliéster, parafina o plástico basados en petróleo, polisacárido o cualquier plástico basados en plantas.

- 5 Preferentemente, el revestimiento comprende también un componente de fibra que comprende al menos hasta el 20%, al menos hasta el 30%, al menos hasta el 40%, al menos hasta el 50%, al menos hasta el 60%, al menos hasta el 70%, al menos hasta el 80% o al menos hasta el 90% del revestimiento. La fibra puede ser uno o más de entre las siguientes: (i) fibra de residuos de biomasa agrícola (por ejemplo, paja de cereal, algodón, cáscara de cacahuate, paja de soja, forraje de maíz); (ii) fibras dedicadas (por ejemplo, *Miscanthus*, *Arundo*, caña de azúcar, bagazo, cáñamo, kenaf); (iii) fibras procesadas (por ejemplo, papel, cartón reciclado, harina de madera, serrín de madera); y (iv) fibras artificiales o procesadas (por ejemplo, nylon, poliéster, algodón).
- 10

El revestimiento puede comprender también fungicidas, organismos endofíticos, nutrientes de plantas, hormonas, tintes u otros medios de identificación, tales como códigos de barras o transpondedores o similares, para ayudar a la clasificación.

- 15 El revestimiento se aplica al propágulo encapsulado mediante inmersión (al menos una vez) o mediante coextrusión o mediante termo-formación del revestimiento alrededor del propágulo. El revestimiento que cubre el propágulo tiene menos de 1 mm (milímetro) de espesor, preferentemente menos de 0,5 mm de espesor.

En la presente memoria se describe un procedimiento para la propagación de una planta de reproducción vegetativa, que comprende las etapas de:

- 20 (i) micropropagación del material vegetal a partir de una planta de reproducción vegetativa seguida de multiplicación para producir plántulas;
- (ii) poner en contacto las plántulas o una parte de las mismas de la etapa (i) con al menos una hormona vegetal y hacer crecer las plántulas y recolectar los mini-rizomas o los mini esquejes de tallo a partir de las mismas;
- (iii) encapsular sustancialmente los mini-rizomas o los mini esquejes de tallo producidos en la etapa (ii) en un medio de crecimiento vegetal; y
- 25 (iv) revestir sustancialmente el mini rizoma o el mini esqueje de tallo encapsulado de la etapa (iii) en un polímero biodegradable.

Según una realización preferente adicional de la presente invención, se proporciona un procedimiento para aumentar la formación de yemas en mini rizomas o mini esquejes de tallo, que comprende las etapas de:

- 30 (i) micropropagación del material vegetal a partir de una planta de reproducción vegetativa seguida de multiplicación para producir plántulas;
- (ii) poner en contacto las plántulas o una parte de las mismas de la etapa (i) con al menos una hormona vegetal;
- (iii) exponer las plántulas después de la etapa (ii) anterior a un estrés abiótico y mecánico temporal, en el que el estrés temporal comprende una exposición no continua a uno cualquiera o más estreses en periodos intermitentes entre periodos sin estrés y en el que dicho estrés abiótico comprende uno cualquiera o más de entre: (i) un estrés osmótico;
- 35 (ii) un estrés por temperatura; (iii) un estrés nutricional; y (iv) un estrés oxidativo y en el que el estrés mecánico comprende recortar las partes aéreas hasta un punto justo encima de un nudo;
- (iv) cultivar las plántulas y cosechar los mini rizomas o los mini esquejes de tallo que pesen menos de aproximadamente 25 g; y
- 40 (v) encapsular sustancialmente los mini rizomas o los mini esquejes de tallo producidos en la etapa (iv) en un medio de crecimiento vegetal; y
- (vi) revestir sustancialmente el mini rizoma encapsulado o el mini esqueje de tallo de la etapa (v) en un polímero biodegradable.

Un procedimiento preferente para aumentar la formación de yemas en un mini rizoma comprende las etapas de:

- (i) micropropagación del material vegetal de una planta rizomatosa seguida de multiplicación para producir plántulas;
- 45 (ii) poner en contacto las plántulas o una parte de las mismas de la etapa (i) con al menos una hormona vegetal y hacer crecer las plántulas;

- (iii) exponer las plántulas después de la etapa (ii) anterior a un estrés abiótico y mecánico temporal, en el que el estrés temporal comprende una exposición no continua a uno cualquiera o más estreses en períodos intermitentes entre periodos sin estrés y en el que dicho estrés abiótico comprende uno cualquiera o más de entre: (i) un estrés osmótico; (ii) un estrés por temperatura; (iii) un estrés nutricional y (iv) un estrés oxidativo y en el que el estrés mecánico comprende recortar las partes aéreas hasta un punto justo encima de un nudo;
- (iv) cultivar las plántulas y cosechar los mini rizomas a partir de las mismas que pesen menos de aproximadamente 25 g;
- (v) triturar o separar el complejo de la raíz para separar los mini rizomas del mismo; y
- (vi) encapsular sustancialmente los mini rizomas producidos en la etapa (iv) o (v) en un medio de crecimiento vegetal; y opcionalmente
- (vii) revestir sustancialmente el mini rizoma encapsulado de la etapa (vi) en un polímero biodegradable.

Los aspectos preferentes de las etapas (i) a (vii) anteriores son tal como se han descrito anteriormente en la presente memoria.

Un procedimiento preferente para aumentar la formación de yemas en mini esquejes de tallo comprende las etapas de:

- (i) micropropagación del material vegetal a partir de un tallo vegetal seguido de multiplicación para producir plántulas;
- (ii) poner en contacto las plántulas o una parte de las mismas de la etapa (i) con al menos una hormona vegetal y hacer crecer las plántulas;
- (iii) exponer las plántulas después de la etapa (ii) anterior a un estrés abiótico y mecánico temporal, en el que el estrés temporal comprende una exposición no continua a uno cualquiera o más estreses en períodos intermitentes entre periodos sin estrés y en el que dicho estrés abiótico comprende uno cualquiera o más de entre: (i) un estrés osmótico; (ii) un estrés por temperatura; (iii) un estrés nutricional y (iv) un estrés oxidativo y en el que el estrés mecánico comprende recortar las partes aéreas hasta un punto justo encima de un nudo;
- (iv) cultivar las plántulas y cosechar los mini esquejes de tallo que pesan menos de aproximadamente 25 g de los brotes producidos; y
- (v) encapsular sustancialmente los mini esquejes de tallo producidos en la etapa (iv) en un medio de crecimiento vegetal; y opcionalmente
- (vi) revestir sustancialmente el mini esqueje de tallo encapsulado de la etapa (v) en un polímero biodegradable.

Los aspectos preferentes de las etapas (i) a (vi) anteriores son tal como se han descrito anteriormente en la presente memoria.

- De manera ventajosa, los procedimientos de la invención pueden aplicarse a cualquier planta capaz de reproducción vegetativa. En particular, los procedimientos de la invención son particularmente adecuados para plantas rizomatosas y plantas que se propagan por tallo. Por ejemplo, los procedimientos de la invención son particularmente adecuados para pastos energéticos, tales como *Miscanthus* (pasto de elefante), *Pennisetum purpureum* (pasto de Napier), *Panicum virgatum* (pasto varilla), caña energética (el complejo *Saccharum*), Arundo donax (caña gigante), caña de azúcar, *Bambusa* (bambú), *Curcuma*, *Humulus* (salto), espárragos, *Zingiber* (jengibre), iris, género *Erianthus*, *Fallopia sachalinensis* (Igniscum), Ipomoea batatas (batata) y wasabi. Además, existen aplicaciones para otros alimentos y cultivos medicinales que se propagan usando rizomas o tallos, tales como la fresa (género *Fragaria*), la hierba medicinal ortiga (género *Urtica*) y la cúrcuma.

- Arundo donax* (caña gigante), *Pennisetum purpureum* (pasto de Napier), caña energética, *Saccharum officinarum* (caña de azúcar), *Hevea* (caucho) y *Manihot* (yuca), por ejemplo, son más adecuados para la multiplicación usando esquejes de tallo. Cuando se multiplican usando esquejes de tallo, las plántulas, derivadas de la micropropagación, se plantan y se cultivan a una altura adecuada y cualquier crecimiento sobre el suelo se recorta a un punto justo encima de un nudo. Este procedimiento estimula una mayor formación de brotes que puede ser estimulada adicionalmente mediante la aplicación de citoquininas y auxinas. Los brotes que salen de las nuevas yemas son retirados y cortados a máquina a longitudes cortas para formar mini esquejes de tallo que están listos para ser encapsulados. Aunque no todos los esquejes de tallo que se producen contendrán yemas, la tasa de multiplicación que se consigue es muchas veces mayor que la que se conseguiría con los procedimientos convencionales.

Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un mini rizoma sustancialmente encapsulado o un mini esqueje de tallo sustancialmente encapsulado producido mediante el procedimiento según la invención. El mini rizoma

encapsulado o el mini esqueje de tallo encapsulado pueden revestirse sustancialmente en un polímero biodegradable.

La presente invención proporciona también una unidad de siembra que pesa menos de aproximadamente 25 g o menos de aproximadamente 20 g o menos de aproximadamente 15 g o menos de aproximadamente 10 g o menos de aproximadamente 5 g o menos de aproximadamente 2 g, que comprende un mini rizoma o un mini esqueje de tallo contenido sustancialmente en el interior de un medio de crecimiento de plantas y opcionalmente revestido en un polímero biodegradable. El peso de la unidad de siembra descrita anteriormente no incluye el medio de crecimiento. En una realización de la presente invención, la unidad de siembra comprende un rizoma de una planta *Miscanthus*, caña energética, *Arundo donax* o una planta de caña de azúcar.

La invención describe también un procedimiento de producción de plantas que comprende las etapas de hacer crecer un mini rizoma encapsulado o un mini esqueje de tallo producido mediante los procedimientos según la invención. Se describen también plantas que pueden obtenerse a partir de dicho un mini rizoma o un mini esqueje de tallo encapsulado y de la progenie y los ancestros de los mismos.

De manera ventajosa, las plantas producidas a partir de los mini esquejes de tallo o los mini rizomas producidos mediante los procedimientos según la presente invención tienen un mayor vigor. Si se toma como ejemplo *Miscanthus*, esto se manifiesta en un aumento del número de macollos (aumento del 200 al 400%); aumento de la altura (un aumento de hasta el 30%); aumento del volumen de la raíz (aumento de hasta el 300%); aumento de yemas subterráneas (aumento de hasta el 400%); aumento de cobertura del dosel (aumento de hasta el 200%); y aumento de la superficie foliar (aumento de hasta el 800%).

En el caso de *Miscanthus*, de 60 a 90 días después de la germinación, las plantas producidas mediante los procedimientos de la invención se parecen a las plantas producidas convencionalmente que tienen un año o más.

Según la presente invención, se proporciona el uso de un mini rizoma o un mini esqueje de tallo encapsulado obtenido mediante el procedimiento de la invención para la producción de plantas y para aumentar el vigor de las plantas con relación a las plantas de la misma especie cultivadas de manera convencional.

De manera ventajosa, los mini esquejes de tallo y los mini rizomas producidos mediante los procedimientos de la presente invención ofrecen un material de partida para la propagación de las plantas que tiene la misma capacidad de crecimiento, pero que tiene un peso muy reducido en comparación con el material de partida convencional, ahorrando de esta manera costes de transporte, de almacenamiento y de manipulación, etc. Por ejemplo, el peso del material de partida (mini esquejes de tallo y mini rizomas) será de aproximadamente 0,25 toneladas por hectárea en comparación con 1,5 toneladas por hectárea en el caso de *Miscanthus* cultivado de manera convencional, 6 toneladas por hectárea para el pasto de Napier cultivado de manera convencional y 10 toneladas por hectárea para la caña de azúcar cultivada de manera convencional.

De manera ventajosa, los mini esquejes de tallo o los mini rizomas producidos mediante los procedimientos de la presente invención permiten que el ciclo de cosecha de las plantas de cultivo que se cultivan a partir de los mismos se acorte en comparación con el ciclo de cosecha de la misma planta que se cultiva mediante procedimientos convencionales. Los mini esquejes de tallo o los mini rizomas producidos mediante los procedimientos de la presente invención ofrecen múltiples ventanas de plantación en comparación con la ventana de plantación para la misma planta cultivada mediante procedimientos convencionales. En la presente memoria se describe el uso de un mini rizoma o un mini esqueje de tallo encapsulado o plantas producidas a partir de los mismos para alterar el ciclo de cosecha de una planta.

Las plantas producidas mediante el cultivo de un mini rizoma encapsulado o un mini esqueje de tallo pueden ser útiles también en la producción de biocombustibles o bioetanol. En la presente memoria se describe el uso de un mini rizoma o un mini esqueje de tallo encapsulado o una planta producida a partir de los mismos en la producción de biocombustibles o bioetanol.

De manera ventajosa, los mini esquejes de tallo y los mini rizomas producidos mediante los procedimientos de la presente invención pueden encontrar uso en aplicaciones de bio-recuperación para limpiar áreas que tienen agua contaminada. En la presente memoria, se describe el uso de un mini rizoma o mini esqueje de tallo encapsulado o una planta producida a partir de los mismos en la bio-recuperación.

En la presente memoria, se describe también un procedimiento para alterar la arquitectura del rizoma, que comprende las etapas de:

(i) micropropagación del material vegetal de una planta rizomatosa para producir plántulas; y

(ii) poner en contacto las plántulas de la etapa (i) con hormonas vegetales seleccionadas de entre el grupo que consiste en bencilaminopurina, TDZ e IAA;

(iii) obtener mini rizomas de forma sustancialmente uniforme que pesen menos de aproximadamente 25 g.

El procedimiento de alteración de la arquitectura del rizoma indicado anteriormente puede comprender también las etapas adicionales de trituración y/o de encapsulación de los rizomas, tal como se ha descrito anteriormente.

Por lo tanto, el procedimiento de alteración de la arquitectura del rizoma puede comprender las etapas de:

- 5 (i) micropropagación del material vegetal de una planta rizomatosa seguida de multiplicación para producir plántulas;
- (ii) poner en contacto las plántulas o una parte de las mismas de la etapa (i) con una hormona vegetal seleccionada de entre el grupo que consiste en bencilaminopurina, TDZ e IAA y cultivar las plántulas;
- (iii) exponer las plántulas antes, después o durante la etapa (ii) anterior a un estrés abiótico o mecánico;
- (iv) cultivar las plántulas y cosechar los mini-rizomas a partir de las mismas;
- 10 (v) triturar o separar el complejo de la raíz para separar los mini rizomas de la misma;
- (vi) obtener mini rizomas con forma sustancialmente uniforme que pesen menos de aproximadamente 25 g.

En la presente memoria, se describe también un procedimiento de alteración de la arquitectura del tallo, que comprende las etapas de:

- (i) micropropagación del material vegetal a partir de un tallo vegetal para producir plántulas; y
- 15 (ii) poner en contacto las plántulas de la etapa (i) con una hormona vegetal seleccionada de entre el grupo que consiste en bencilaminopurina, TDZ e IAA;
- (iii) obtener mini esquejes de tallo con forma sustancialmente uniforme que pesen menos de aproximadamente 25 g.

El procedimiento de alteración de la arquitectura del tallo puede comprender las etapas de:

- (i) micropropagación del material vegetal a partir de un tallo vegetal seguido de multiplicación para producir plántulas;
- 20 (ii) poner en contacto las plántulas o una parte de las mismas de la etapa (i) con una hormona vegetal seleccionada de entre el grupo que consiste en bencilaminopurina, TDZ e IAA y cultivar las plántulas;
- (iii) exponer las plántulas antes, después o durante la etapa (ii) anterior a un estrés abiótico o mecánico;
- (iv) cultivar las plántulas y cosechar los mini esquejes de tallo a partir de las yemas producidas;
- (v) obtener mini esquejes de tallo con forma sustancialmente uniforme que pesen menos de aproximadamente 25 g.

25 La presente invención proporciona mini rizomas y mini esquejes de tallo que pueden obtenerse mediante los procedimientos descritos en la presente memoria. El procedimiento de alteración de la arquitectura del rizoma o mini tallo resulta en mini rizomas o mini esquejes de tallo que pesan menos de aproximadamente 25 g o que pesan menos de aproximadamente 20 g o que pesan menos de aproximadamente 15 g o que pesan menos de aproximadamente 10 g o que pesan menos de aproximadamente 5 g o que pesan menos de aproximadamente 2 g.

30 Preferentemente, cada uno de entre la bencilaminopurina, el TDZ y el IAA se aplican (individualmente, no en combinación) a una tasa inferior a aproximadamente 1.000 ppm, inferior a aproximadamente 900 ppm, inferior a aproximadamente 800 ppm, inferior a aproximadamente 700 ppm, inferior a aproximadamente 600 ppm, inferior a aproximadamente 500 ppm, inferior a aproximadamente 400 ppm, inferior a aproximadamente 300 ppm, inferior a aproximadamente 200 ppm, inferior a aproximadamente 100 ppm, inferior a aproximadamente 90 ppm, inferior a

35 aproximadamente 80 ppm, inferior a aproximadamente 70 ppm, inferior a aproximadamente 60 ppm, inferior a aproximadamente 50 ppm, inferior a aproximadamente 40 ppm, inferior a aproximadamente 30 ppm, inferior a aproximadamente 20 ppm o inferior a aproximadamente 10 ppm.

El procedimiento de alteración de la arquitectura del rizoma es particularmente adecuado para los rizomas de plantas de *Miscanthus*, pero puede ser usado también para otras plantas rizomatosas.

40 Las combinaciones y las concentraciones de hormonas vegetales pueden optimizarse fácilmente, si es necesario, por una persona con conocimientos en la materia, dependiendo de la planta a ser propagada. Los mini rizomas o mini esquejes de tallo resultantes que tienen una arquitectura modificada pueden usarse a continuación en un procedimiento para la producción de una planta, que comprende las etapas de hacer crecer un rizoma o un rizoma encapsulado o un mini esqueje de tallo o un mini esqueje de tallo encapsulado que puede obtenerse mediante los procedimientos indicados

45 anteriormente para alterar la arquitectura del rizoma o del mini esqueje de tallo.

Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de bencilaminopurina, TDZ e IAA para modificar la arquitectura de los rizomas, particularmente rizomas de *Miscanthus*, o para modificar la arquitectura de los mini esquejes de tallo.

5 Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de bencilaminopurina, TDZ e IAA para aumentar el rendimiento de las plantas rizomatosas o el rendimiento de las plantas propagadas usando esquejes de tallo en comparación con los rendimientos obtenidos usando los procedimientos de producción convencionales. El uso de bencilaminopurina, TDZ e IAA es tal como se ha descrito anteriormente en el procedimiento para la propagación de plantas.

10 En dicho uso, cada uno de entre la bencilaminopurina, el TDZ y el IAA se aplica (individualmente, no en combinación) a una tasa inferior a aproximadamente 1.000 ppm, inferior a aproximadamente 900 ppm, inferior a aproximadamente 800 ppm, inferior a aproximadamente 700 ppm, inferior a aproximadamente 600 ppm, menos inferior a aproximadamente 500 ppm, inferior a aproximadamente 400 ppm, inferior a aproximadamente 300 ppm, inferior a aproximadamente 200 ppm, inferior a aproximadamente 100 ppm, inferior a aproximadamente 90 ppm, inferior a aproximadamente 80 ppm, inferior a aproximadamente 70 ppm, inferior a aproximadamente 60 ppm, inferior a aproximadamente 50 ppm, inferior a aproximadamente 40 ppm, inferior a aproximadamente 30 ppm, inferior a aproximadamente 20 ppm o inferior a aproximadamente 10 ppm.

15 La arquitectura de los rizomas y los mini esquejes de tallo se modifica de manera que los mini rizomas o los mini esquejes de tallo resultantes después de la aplicación de las hormonas vegetales tengan una forma sustancialmente uniforme y pesen menos de aproximadamente 25 g o pesen menos de aproximadamente 20 g o pesen menos de aproximadamente 15 g o pesen menos de aproximadamente 10 g o pesen menos de aproximadamente 5 g o pesen menos de aproximadamente 2 g.

Un aspecto adicional descrito en la presente memoria es un revestimiento para un propágulo que comprende un polímero biodegradable, que tiene preferentemente un punto de fusión comprendido entre 30 y 65°C y propágulos revestidos con dicho polímero biodegradable.

25 Preferentemente, el propágulo se encapsula antes de revestirse en el polímero biodegradable. De manera ventajosa, el propágulo puede encapsularse en cualquier medio de crecimiento de plantas, tal como compost, tierra para macetas, turba, hidrogel, tierra, lana de roca, perlita, vermiculita, espuma, espuma de sosa, piedra pómez, fibra de coco, pellets de arcilla expandida, etc. El material de encapsulación puede comprender también compuestos, tales como hormonas vegetales (tales como citoquininas o auxinas), reguladores del crecimiento de plantas, micorrizas, organismos endofíticos, organismos simbióticos u otros organismos beneficiosos, tensoactivos, geles, fungicidas, nematocidas, insecticidas, nutrientes orgánicos e inorgánicos, agua, súper absorbentes basados en polímeros y en compuestos orgánicos y compuestos de estabilización, etc., para ayudar al almacenamiento del propágulo con el fin de prevenir cualquier pérdida de material debida al deterioro y para mejorar la supervivencia y el rendimiento de los propágulos una vez plantados en el campo.

30 Preferentemente, el polímero es uno o más de entre cera, poliéster, parafina o plástico basado en petróleo, polisacárido o cualquier plástico basado en plantas.

Preferentemente, el revestimiento comprende también una fibra, que puede comprender al menos hasta el 20%, al menos hasta el 30%, al menos hasta el 40%, al menos hasta el 50%, al menos hasta el 60%, al menos hasta el 70%, al menos hasta el 80% o al menos hasta el 90% del revestimiento.

40 La fibra puede ser una o más de las siguientes (i) fibra de residuos de biomasa agrícola (por ejemplo, paja de cereal, algodón, cáscara de cacahuete, paja de soja, forraje de maíz); (ii) fibras dedicadas (por ejemplo, *Miscanthus*, *Arundo*, caña de azúcar, bagazo, cáñamo, kenaf); (iii) fibras procesadas (por ejemplo, papel, cartón reciclado, harina de madera, serrín de madera); y (iv) fibras artificiales o procesadas (por ejemplo, nylon, poliéster, algodón).

45 El revestimiento puede comprender también fungicidas, organismos endofíticos, nutrientes de plantas, hormonas, tintes u otros medios de identificación, tales como códigos de barras o transpondedores o similares, para ayudar a la clasificación.

El revestimiento se aplica al propágulo (encapsulado) por ejemplo mediante inmersión (al menos una vez) o mediante coextrusión o mediante termo-formación del revestimiento alrededor del propágulo. El revestimiento que cubre el propágulo (encapsulado) tiene menos de 1 mm (milímetro) de espesor, preferentemente menos de 0,5 mm de espesor.

50 Según un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona el uso de un polímero biodegradable que preferentemente tiene un punto de fusión comprendido entre 30°C y 65°C para el revestimiento de un propágulo.

Un "propágulo", tal como se define en la presente memoria, es cualquier parte de la planta que pueda crecer o regenerarse en una planta completa. Por lo tanto, un propágulo puede comprender rizomas, mini rizomas, esquejes de

tallos, mini esquejes de tallo, tubérculos, semillas, etc.

En el caso en el que el propágulo es una semilla, cualquier variedad de semilla comercial o no comercial puede, primero, encapsularse opcionalmente, tal como se ha descrito anteriormente, y a continuación puede revestirse en un polímero biodegradable, tal como se ha descrito. La semilla puede ser una semilla transgénica o no transgénica. Las semillas preferentes incluyen semillas de melón y de tomate.

### Figuras

La presente solicitud se describirá a continuación con referencia a las figuras siguientes, proporcionadas solo a modo de ilustración, en las que:

La Figura 1a muestra un rizoma de *Miscanthus* producido mediante procedimientos convencionales (con un peso aproximado de 30 g) y la Figura 1b muestra un mini rizoma de Miscanthus producido mediante los procedimientos de la presente invención (que pesa aproximadamente 2 g).

La Figura 2 muestra plántulas de Miscanthus que experimentan micropropagación según la etapa (i) del procedimiento de la invención.

La Figura 3 muestra el establecimiento de los cultivos en el campo de plantas de *Miscanthus* producidas a partir de los mini rizomas encapsulados (mitad derecha de la imagen) producidos mediante los procedimientos de la presente invención en comparación con las plantas producidas a partir de los rizomas convencionales (mitad izquierda de la imagen).

### Ejemplos

La presente solicitud se describirá a continuación con referencia a los ejemplos siguientes.

#### 20 **Ejemplo 1: Micropropagación y multiplicación de *Miscanthus***

El material de explante se seleccionó de entre material vegetal de *Miscanthus* libre de enfermedades. El material de explante se esterilizó superficialmente, se enjuagó con agua esterilizada y se sembró en un medio de crecimiento basado en agar que contenía nutrientes (sacarosa y otros nutrientes estándar) y hormonas vegetales para estimular la división celular. A continuación, el callo resultante se volvió a sembrar en un medio de crecimiento infundido con nutrientes y hormonas vegetales (citoquininas y auxinas) para estimular la diferenciación celular en raíces y brotes y la producción de plántulas. Los ciclos repetidos de este proceso permitieron aumentar una muestra de explante de una a miles de plántulas.

#### **Ejemplo 2: Manipulación de hormonas**

A continuación, las plántulas se plantaron en compost y se cultivaron en un invernadero hasta que se establecieron de 5 a 10 brotes. A continuación, las plántulas se sometieron a una sequía temporal mediante la suspensión del riego de las plantas durante un período de 1 día. Cuando medían aproximadamente 10 cm de altura, los brotes se sometieron a un procedimiento de separación que consistió en separar manualmente cada brote con un sistema de raíces dedicado y colocar en macetas este brote en compost. A continuación, los brotes colocados en macetas se trataron con una combinación de bencilaminopurina, TDZ e IAA, cada uno a una tasa de < 1.000 ppm (menos de mil partes por millón) para mejorar el inicio de brotes y raíces.

Después de aproximadamente 30 a 45 días, el tejido de la planta por encima del nivel de suelo se retiró y los sistemas de enraizamiento se retiraron de las macetas y se separaron ligeramente. Entonces, estos mini rizomas estaban listos para el proceso de encapsulación descrito en el Ejemplo 4 a continuación.

#### **Ejemplo 3: Uso de mini esquejes de tallo**

*Arundo donax* (caña gigante), *Pennisetum purpureum* (pasto de Napier) y la caña energética son más adecuados para la multiplicación usando esquejes de tallo. Las plántulas de *Arundo donax*, *Pennisetum purpureum*, caña de azúcar y caña energética se sometieron a micropropagación y multiplicación, tal como se ha descrito en el Ejemplo 1. Las plántulas derivadas de la micropropagación y de la multiplicación se sembraron en compost y se cultivaron hasta una altura de aproximadamente 10 cm. El crecimiento por encima del nivel del suelo se redujo a un punto justo encima de un nudo para estimular una mayor formación de yemas, que se estimuló adicionalmente mediante la aplicación de bencilaminopurina, TDZ e IAA, cada uno a una tasa de < 1.000 ppm (menos de mil partes por millón). Los brotes que surgieron de las nuevas yemas se retiraron y se cortaron a máquina en longitudes cortas para formar mini esquejes de tallo. A continuación, estos mini esquejes de tallo se encapsularon, tal como se describe en el Ejemplo 4.

#### **Ejemplo 4: Encapsulación**

5 La encapsulación se llevó a cabo usando la maquinaria disponible en la industria hortícola para encapsular semillas o esquejes, pero adaptada para cubrir completamente el mini-rizoma o el mini esqueje de tallo. El mini-rizoma o esqueje de tallo se introdujo en un flujo de compost que contenía citoquininas, auxinas, micorrizas, tensioactivos, geles, fungicidas e insecticidas. A continuación, el compost que rodeaba el mini-rizoma o esqueje de tallo se comprimó. La unidad resultante de mini-rizoma o mini esqueje de tallo en compost comprimido se envolvió luego en un revestimiento de papel para aumentar la estabilidad del propágulo revestido. A continuación, el propágulo revestido se almacenó hasta que se requirió para la siembra.

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para aumentar la formación de yemas en mini rizomas o mini esquejes de tallo, que comprende las etapas de:

- 5 (i) micropropagación del material vegetal a partir de una planta de reproducción vegetativa seguida de multiplicación para producir plántulas;
- (ii) poner en contacto las plántulas o una parte de las mismas de la etapa (i) con al menos una hormona vegetal;
- 10 (iii) exponer las plántulas, después de la etapa (ii) anterior, a un estrés abiótico y mecánico temporal, en el que dicho estrés temporal comprende una exposición no continua a uno cualquiera o más estreses en períodos intermitentes entre periodos sin estrés y en el que dicho estrés abiótico comprende uno cualquiera o más de entre: (a) un estrés osmótico; (b) un estrés por temperatura; (c) un estrés nutricional o (d) un estrés oxidativo y en el que dicho estrés mecánico comprende recortar las partes aéreas hasta un punto justo encima de un nudo;
- (iv) cultivar las plántulas y cosechar los mini rizomas o los mini esquejes de tallo de los mismos que pesen menos de aproximadamente 25 g; y
- 15 (v) encapsular los mini rizomas o los mini esquejes de tallo producidos de la etapa (iv) en un medio de crecimiento vegetal.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho mini rizoma o mini esqueje de tallo encapsulado está revestido en un polímero biodegradable; y/o preferentemente en el que dicho polímero biodegradable tiene un punto de fusión comprendido entre aproximadamente 30 y 65°C; y/o preferentemente en el que dicho polímero biodegradable comprende uno o más de entre cera, poliéster, parafina o plástico basados en petróleo, polisacárido o cualquier plástico basado en plantas; y/o preferentemente en el que dicho revestimiento comprende un componente de fibra de al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80% o al menos el 90% del revestimiento; y/o preferentemente en el que dicha fibra comprende uno o más de entre las siguientes: (i) fibra de residuo de biomasa agrícola; (ii) fibras dedicadas; (iii) fibras artificiales o procesadas; y/o preferentemente en el que dicho revestimiento comprende uno o más de entre los siguientes: fungicidas, organismos endofíticos, nutrientes de plantas, hormonas, colorantes u otros medios para la identificación, tales como códigos de barras o transpondedores.

20

25

3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que dicha planta de reproducción vegetativa es una planta rizomatosa o en el que dicha planta se propaga usando un esqueje de tallo; y/o preferentemente en el que dicha planta se selecciona de entre *Miscanthus*, *Pennisetum purpureum*, *Panicum virgatum*, caña energética, *Arundo Donax*, caña de azúcar, *Bambusa*, *Curcuma*, *Humulus*, espárragos, *Zingiber*, iris, género *Erianthus*, *Fallopia sachalinensis*, fresa, hierba ortiga, *Hevea* y *Manihot*, cúrcuma, wasabi y *Ipomoea batatas*.

30

4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha micropropagación comprende cultivo de tejidos.

5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha hormona vegetal comprende citoquininas y auxinas; y/o preferentemente en el que dichas hormonas vegetales comprenden bencilaminopurina, TDZ e IAA.

35

6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dichos mini rizomas o mini esquejes de tallo tienen una arquitectura alterada o tienen la misma capacidad de crecimiento, pero tienen un peso reducido o una forma más uniforme en comparación con los esquejes de tallo y los rizomas producidos de manera convencional.

7. Un mini rizoma o mini esqueje de tallo encapsulados obtenibles mediante el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dichos mini rizomas o mini esquejes de tallo tienen la misma capacidad de crecimiento, pero tienen un peso reducido en comparación con los esquejes de tallo y los rizomas producidos de manera convencional; preferentemente en el que dicho mini rizoma o mini tallo encapsulado está revestido con un polímero biodegradable.

40

8. Un mini rizoma o mini esqueje de tallo encapsulado según la reivindicación 7, a partir de una planta seleccionada de entre *Miscanthus*, *Pennisetum purpureum*, *Panicum virgatum*, caña energética, *Arundo Donax*, caña de azúcar, *Bambusa*, *Curcuma*, *Humulus*, espárragos, *Zingiber*, iris, género *Erianthus*, *Fallopia sachalinensis*, fresa, hierba ortiga, *Hevea* y *Manihot*, cúrcuma, wasabi y *Ipomoea batatas*.

45

9. Un mini rizoma o mini tallo encapsulado según la reivindicación 7 u 8, que pesa menos de 25 g o menos de 20 g o menos de 15 g o menos de 10 g o menos de 5 g o menos de 2 g.

10. Un mini rizoma o mini tallo encapsulado según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que dicho polímero biodegradable tiene un punto de fusión comprendido entre aproximadamente 30 y aproximadamente 65°C; y/o

50

preferentemente en el que dicho polímero biodegradable se selecciona de uno o más de entre cera, poliéster, parafina o plástico basados en petróleo, polisacárido o cualquier plástico basado en plantas; y/o preferentemente dicho revestimiento comprende un componente de fibra de hasta el 20%, hasta el 30%, hasta el 40%, hasta el 50%, hasta el 60%, hasta el 70%, hasta el 80% o hasta el 90% del revestimiento; y/o preferentemente en el que dicha fibra comprende una o más de  
5 entre las siguientes: (i) fibra de residuo de biomasa agrícola; (ii) fibras dedicadas, por ejemplo, *Miscanthus*, *Arundo*, caña de azúcar, bagazo, cáñamo, kenaf; (iii) fibras artificiales o procesadas; y/o preferentemente en el que dicho revestimiento comprende uno o más de entre los siguientes: fungicidas, organismos endofíticos, nutrientes de plantas, hormonas, colorantes, códigos de barras o transpondedores; y/o preferentemente en el que dicho revestimiento se aplica al propágulo encapsulado mediante inmersión al menos una vez, mediante coextrusión o mediante termo-formación del revestimiento  
10 alrededor del propágulo.

11. Uso de un mini rizoma o mini esqueje de tallo encapsulado obtenido mediante un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para la producción de plantas.

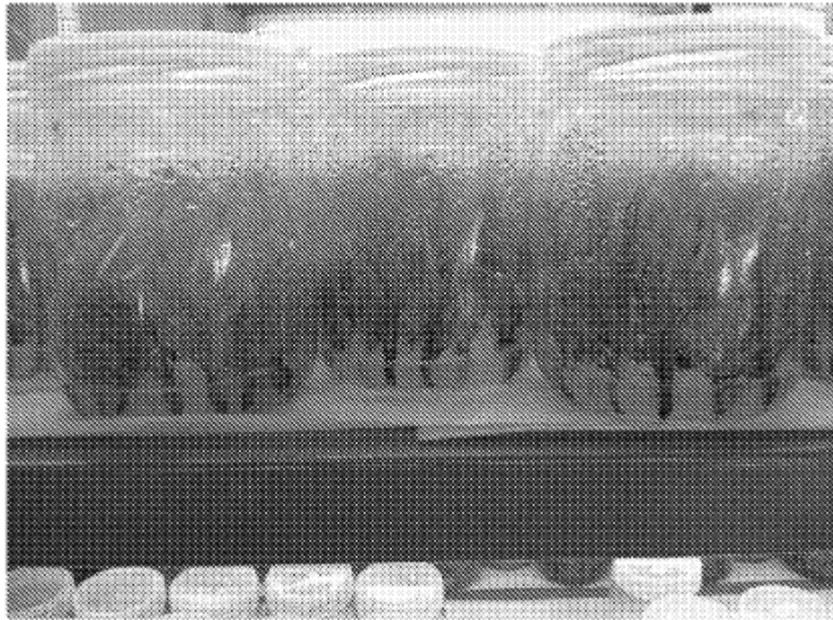
**Figura 1a**



**Figura 1b**



**Figura 2**



**Figura 3**

