



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

L

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 16-117531-00000-0000
Fecha: 2016-05-05 15:27:38 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 95 - 96

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO Proceso para micropropagación
in vitro de material de planta y proceso
para la producción, a gran escala
y elevado volumen de mudas - - -

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE Fibra Celulose S.a.

DOMICILIO Brasil

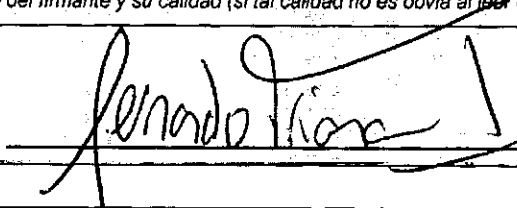
74. APODERADO Fernando Triana Soto

22. BOGOTÁ, D. C., Mayo 5/2016

	 No. 16-117531- -00000-0000 Fecha: 2016-05-05 15:27:38 Dep. 2020 DIR.NUEVASCF Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 95 - 96
---	---

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL -PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/ BR2014/000391	Fecha 30/10/2014
Publicación Internacional No.		WO 2015/061871 A1	Fecha 07/05/2015
3	TÍTULO DE LA INVENCION (200 caracteres o espacios máximos)		
PROCESO PARA MICROPROPAGACIÓN IN VITRO DE MATERIAL DE PLANTA Y PROCESO PARA LA PRODUCCIÓN, A GRAN ESCALA Y ELEVADO VOLUMEN, DE MUDAS CLONALES DE PLANTAS LISTAS PARA SU DESARROLLO EN CAMPO			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)		
A01H 4/00 (2006.01) C12M 3/00 (2006.01) A01G 7/06 (2006.01)			
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN
FIBRIA CELULOSE S.A			
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN ALAMEDA SANTOS, 1.357 - 6º ANDAR, CERQUEIRA CÉSAR, CEP:1419-001 SÃO PAULO		No. TELÉFONO	
CIUDAD SÃO PAULO		CORREO ELECTRÓNICO	
DEPARTAMENTO/ESTADO		NACIONALIDAD O	
PAÍS DE RESIDENCIA BRASIL		LUGAR DE CONSTITUCIÓN BRASIL	
7	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1	PENCHEL	RICARDO MIGUEL	BRASIL
2	REIS	JOCEMAR PALAURO DOS	BRASIL
3	OLIVEIRA	MILA LIPARIZE DE	BRASIL
4			
5			
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
1 BRASIL		SÃO PAULO	ALBERTO AGUIAR WEISSOHN 337, CASA 4, CENTRO, GUARAREMA, CEP 08900-000 SÃO PAULO
2 BRASIL		ARACRUZ	RUA RIO SANTA MARIA, 63, BAIRRO DE FÁTIMA, CEP 29192-204 ARACRUZ
3 BRASIL		SÃO JOSÉ DOS CAMPOS	AVENIDA NOVE DE JULHO, 579 - APTO 36, VILA ADYANA, CEP 12243-000 SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
4			
5			
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)			
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.			
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
APELLIDOS		NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
TRIANA SOTO		FERNANDO	C.C. 79.154.036 T.P. 45.265
DIRECCIÓN CALLE 93B No. 12-48, Piso 4o, BOGOTA, D.C., COLOMBIA		No. TELÉFONO 6019660	
CIUDAD BOGOTÁ, D.C., COLOMBIA		CORREO ELECTRÓNICO tum@tumnet.com	
PAÍS COLOMBIA		No. RADICACIÓN DE PROTOCOLO DE PODER GENERAL	

10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD		☒ SI ☐ NO
1	(33) PAÍS DE ORIGEN ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	CÓDIGO PAÍS US	(31) NÚMERO 61/897,680
2			(32) FECHA (AAAA/MM/DD) 30/10/2013
3			
11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS		
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen. ☐ SI ☒ NO Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.			
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES		
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina. ☐ SI ☒ NO Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.			
13	REDUCCIÓN DE TASAS		
Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente. ☐ SI ☒ NO Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento. Micro, pequeñas y medianas empresas ☐ Universidades públicas o privadas ☐ Entidades sin ánimo de lucro ☐			
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos			
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☒ NO		
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.			
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	N°	Fecha
16	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL		
Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio) 			
17	ANEXOS		
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano		Documentación Jurídica	
1. ☒ Descripción N° de folios: 2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 12 3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios: 4. ☒ Resumen. 5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso. 6. ☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso. 7. ☒ Arte final 12 x 12. 8. ☐ Anexo formato digital. 9. ☐		9. ☐ Poderes, si fuera el caso. 10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del invento al solicitante o a su causante. 11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso. 12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso. 13. Reducción de tasas Micro, pequeñas o medianas empresas ☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea. ☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004. Universidades públicas o privadas ☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación Entidades sin ánimo de lucro ☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio. ☐ Hoja de información complementaria. ☐ Otros, especificar 14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. 15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.	

- | | |
|--|---|
| | <p>16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.</p> <p>17. ☒ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.</p> |
|--|---|

Informe Descriptivo de la Patente de Invención
"PROCESO PARA MICROPROPAGACIÓN *IN VITRO* DE MATERIAL DE PLANTA
Y PROCESO PARA LA PRODUCCIÓN, A GRAN ESCALA Y ELEVADO
VOLUMEN, DE MUDAS CLONALES DE PLANTAS LISTAS PARA SU
5 **DESARROLLO EN CAMPO"**

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención está referida a un proceso de producción de mudas clonales de especies arbóreas, especialmente eucalipto, a gran escala y elevado volumen, según el cual la etapa de propagación vegetativa, realizada *in vitro*, ocurre en condiciones tales que es maximizada la obtención de microesquejes saludables y vigorosos de la especie arbórea mientras es minimizada la tasa de hiperhidricidad en la fase de micropropagación en régimen de inmersión temporal.

FUNDAMENTOS DE LA INVENCION

La micropropagación consiste en una técnica de cultivo de tejidos vegetales que es utilizada como base para la formación de mudas, siendo un método práctico, rápido y seguro de propagación masiva de plantas en espacio reducido. Convencionalmente, la micropropagación es realizada vía sistema semisólido, normalmente en medio gelificante con agar. Sin embargo, esta aún es una práctica costosa, abriendo espacio para el uso de equipos y nuevas tecnologías, que auxilian en la producción de plantas a gran escala operacional, con reducción de los altos costos de mano de obra, en equipos llamados biorreactores.

Los biorreactores son equipos para el cultivo de plántulas en régimen de inmersión temporal o permanente para la obtención de plantas. El biorreactor consiste en un conjunto de recipientes conteniendo compartimentos y

accesorios para la óptima manipulación de los principales factores de crecimiento en busca de maximizar las reacciones biológicas. Por medio de estos equipos es posible obtener mayores tasas de multiplicación del cultivo por el uso de
5 medio nutriente líquido, inyección e intercambios de gases, por ejemplo, de aire enriquecido con gas carbónico, dentro del recipiente, así como de mejor control fisiológico de las condiciones de cultivo y automatización del proceso. Varios son los modelos de biorreactores, pudiendo variar en función
10 de los recipientes de cultivo y del medio de cultivo, del tipo de inmersión (temporal o permanente) y de su funcionalidad. Los sistemas de inmersión temporal que son más conocidos en el Brasil son RITA® (recipiente de inmersión temporal automatizada - por ejemplo, el empleado en CIRAD-
15 França) y BIT® (biorreactor de inmersión temporal - por ejemplo, aquel creado en Embrapa-Cenargen).

Debido al potencial de la técnica de micropropagación, hay un creciente interés en esa tecnología como demuestra el estado de la técnica. Por ejemplo, en el documento WO
20 2012/061950 es descrito un método y biorreactor para micropropagación de una especie vegetal antártica, en el cual el método está caracterizado por la utilización de condiciones y medio nutriente apropiados para el desarrollo de dicha especie vegetal y, adicionalmente, es empleado un
25 protocolo de suministro de radiación UV y control de temperatura para la producción de metabolitos valiosos para uso medicinal y cosmético.

En el documento WO 2012/156440 está descrito un sistema de inmersión temporal y método de micropropagación de
30 especies vegetales caracterizados por la disposición de condiciones adecuadas para el desarrollo de la plántula, tales como iluminación, temperatura y régimen de inmersión con intervalos variando de 1 hasta 10 veces al día y con

tiempo de inmersión de 1 a 2 minutos, o de 3 a 4 minutos, dependiendo de la especie vegetal en desarrollo.

Watt (ver Watt, M.P. "The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation". African
5 Journal of Biotechnology, Vo. 11(76), pp. 14025-14035, 20/09/2012) realizó una retrospectiva de las técnicas de micropropagación de plantas, particularmente con relación a las propuestas para reducir la hiperhidricidad, mencionando como principales factores, la reducción del tiempo de
10 inmersión y el aumento del período de descanso (tiempo entre dos inmersiones sucesivas).

González (ver González, R. y colaboradores. "Multiplicación *in vitro* de *Eucalyptus globulus* mediante sistema de inmersión temporal". Bosque 32(2): 147-154, 2011)
15 relata los factores que afectan el estadio de multiplicación *in vitro* de *Eucalyptus globulus* por inmersión temporal y concluye que la tasa de multiplicación de microesquejes de esta especie arbórea aumenta significativamente cuando se emplea un tiempo de inmersión de 1-2 minutos y una frecuencia
20 de inmersión (período de descanso) de 12 horas. Estos autores también concluyeron que la hiperhidricidad aumenta con la concentración de macronutrientes y sacarosa.

Oliveira (ver Oliveira M. L. de, "Micropropagação de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* em biorreatores
25 de imersão temporária". Disertación de Tesis de Maestría. Universidad Federal de Viçosa. 2011) relata el estudio de micropropagación *in vitro* de dos especies de eucalipto, concluyendo que hay ocurrencia de elevado porcentual de hiperhidricidad en el desarrollo de los plántulas cuando es
30 empleada la técnica de inmersión temporal. La autora también concluye que "hay necesidad de ajuste en la manipulación del cultivo en las fases de multiplicación y alargamiento para la obtención de brotes con mayor vigor, aptos para enraizar en

condiciones *ex vitro* para hacer tal técnica viable a gran escala".

El estado de la técnica líneas arriba mencionado muestra que a pesar de haber sucedido un gran avance en la técnica de micropropagación *in vitro* de plantas, aún resta resolver el problema de la hiperhidricidad y, al mismo tiempo, emplear condiciones adecuadas para la obtención de mudas clonales de plantas, en particular de especies arbóreas y más particularmente de la especie eucalipto, para posibilitar la producción de dichas mudas clonales a gran escala y elevado volumen y alcanzar la producción comercial de mudas saludables y exuberantes.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a la obtención de mudas clonales de plantas, en particular de especies arbóreas, y particularmente especies de eucalipto, empleando la técnica de micropropagación *in vitro* de material vegetal, incluyendo las etapas de multiplicación, alargamiento, enraizamiento, climatización, crecimiento y aclimatación de las mudas listas para comercialización.

En una primera concretización, la presente invención trata respecto a un proceso para micropropagación *in vitro* de material de planta, especialmente de planta arbórea, particularmente de una especie de eucalipto, comprendiendo las etapas de multiplicación y alargamiento de los brotes desarrollados a partir de plántulas de planta por el método de inmersión temporal, siendo que: (a) en la etapa de multiplicación de los brotes, el material a ser propagado es colocado sobre un soporte adecuado en un primer recipiente (recipiente de propagación vegetativa) y es sometido a manipulación de inmersión temporal en medio nutriente líquido, proveniente de un segundo recipiente (recipiente de

almacenamiento del medio líquido), comprendiendo dicha manipulación períodos alternados de inmersión y de descanso, siendo el período de inmersión preferencialmente de por lo menos 1 minuto, preferentemente por un máximo de 3 minutos, más preferiblemente de 1 a 2 minutos, y el período de descanso siendo preferencialmente de por lo menos 2 horas, preferentemente por un máximo de 4 horas, más preferiblemente de 2 a 3 horas; (b) en la etapa de alargamiento de los brotes, el material en propagación es sometido a manipulación de inmersión temporal, preferentemente empleando el mismo medio nutriente de la etapa (a), comprendiendo dicha manipulación períodos alternados de inmersión y de descanso, siendo preferencialmente el período de inmersión de por lo menos 20 segundos, preferentemente por un máximo de 60 segundos, más preferiblemente de 20 a 30 segundos, y el período de descanso siendo preferencialmente de por lo menos 4 horas, preferentemente por un máximo de 6 horas, más preferiblemente de 4 a 5 horas; siendo caracterizado dicho proceso por el hecho de que, en dicha etapa de alargamiento, los referidos períodos de inmersión son significativamente más cortos y los referidos períodos de descanso son más largos en comparación con los períodos de inmersión y de descanso, respectivamente, en la etapa de multiplicación.

En una segunda concretización, la invención trata respecto a un proceso para la producción de mudas clonales de plantas listas para el desarrollo en campo comprendiendo las etapas de: (i) someter plántulas de planta a condiciones de propagación vegetativa *in vitro* por inmersión temporal comprendiendo los estadios de: (a) multiplicación de los brotes en que el material a ser propagado es colocado sobre soporte adecuado en un primer recipiente (recipiente de micropropagación) y someter dicho material a manipulación de inmersión temporal en medio nutriente líquido, proveniente de

un segundo recipiente (recipiente de almacenamiento del medio líquido), comprendiendo dicha manipulación períodos alternados de inmersión y de descanso, siendo el período de inmersión preferencialmente de por lo menos 1 minuto, 5 preferentemente por un máximo de 3 minutos, más preferiblemente de 1 a 2 minutos, y el período de descanso siendo preferencialmente de por lo menos 2 horas, preferentemente por un máximo de 4 horas, más preferiblemente de 2 a 3 horas; (b) alargamiento de los brotes en que el 10 material en propagación es sometido a manipulación de inmersión temporal, preferentemente empleando el mismo medio nutriente del estadio (a), comprendiendo dicha manipulación períodos alternados de inmersión y de descanso, siendo el período de inmersión preferencialmente de por lo menos 20 15 segundos, preferentemente por un máximo de 60 segundos, más preferiblemente de 20 a 30 segundos, y el período de descanso siendo preferencialmente de por lo menos 4 horas, preferentemente por un máximo de 6 horas, más preferiblemente de 4 a 5 horas; (ii) enraizamiento y climatización de las 20 multibrotaduras obtenidas en la etapa (i) en recipientes y condiciones apropiadas para mantener la turgencia vegetal y disminuir la demanda de evaporación; y (iii) crecimiento y aclimatación de los microesquejes obtenidos en la etapa (ii).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

25 La Figura 1 ilustra el proceso de la presente invención mostrando el material micropropagado / microesquejes en cada etapa.

La Figura 2 muestra la etapa de micropropagación *in vitro* en régimen de inmersión temporal en medio nutriente 30 líquido.

La Figura 3 muestra las etapas de desarrollo de mudas clonales a gran escala y elevado volumen, desde la selección del clon adecuado hasta la introducción en el mercado.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

5 El sistema de producción de microesquejes clonales de especies arbóreas, por ejemplo, eucalipto, en gran escala y alta productividad en biorreactores de inmersión temporal tiene como principal objetivo la substitución gradual de los tradicionales jardines clonales de los viveros forestales
10 operacionales por biofábricas de plantas, procurando la producción industrial de microesquejes, para su subsiguiente enraizamiento y climatización en casas de vegetación específicas (estufins).

En biorreactores es posible la obtención de mayores
15 tasas de multiplicación y crecimiento del cultivo mediante el uso continuo de medio nutriente líquido, complementado con inyección de aire y enriquecimiento con gas carbónico y radiación fotosintéticamente activa con lámparas de diodos-
20 leds dentro del recipiente de las plantas. De esta forma, la manipulación de producción de brotes y fitomasa es optimizado al máximo a través de la manipulación automatizada de los principales factores de crecimiento, permitiendo un mejor control fisiológico de las condiciones de cultivo.

Lo que se ha buscado en esta técnica es la minimización
25 de la hiperhidricidad, que causa disturbios y degeneraciones a las mudas clonales obtenidas mediante el método de inmersión temporal y, al mismo tiempo, manteniendo las ventajas de esta técnica en términos de costos de producción y de salud / vigor de las mudas producidas. Este reto fue
30 enfrentado por los creadores de esta invención que crearon un método en el cual los periodos alternados de inmersión y de descanso del material en propagación vegetativa están

diferenciados en los estadios de multiplicación y de alargamiento de los brotes. Este procedimiento hizo posible minimizar la hiperhidricidad y maximizar la producción de mudas clonales de plantas, particularmente de especies
5 arbóreas, y más preferencialmente de especies de eucalipto. En la Figura 1, estos dos estadios son representados como actividades realizadas en el laboratorio, siendo que la micropropagación, es decir, la etapa incluyendo los estadios de multiplicación y alargamiento, en general, toma un tiempo
10 de aproximadamente 45 días.

El proceso de la presente invención fue personalizado para atender a las demandas fisiológicas para la propagación vegetativa de especies arbóreas, especialmente del eucalipto, permitiendo el desarrollo intensivo y de precisión de
15 plantas, diferenciado para resultar en mejor estándar de calidad, uniformidad y vigor de brotes producidos, proporcionando el mayor enraizamiento de microesquejes y la subsiguiente mejor climatización y precocidad de producción de mudas clonales para uso industrial en gran escala.

20 El proceso de la presente invención posibilita obtener una productividad como mínimo 30 veces superior al sistema tradicional de producción de mudas de los viveros comerciales, además de proporcionar una reducción del 33% en el tiempo del ciclo de producción de una muda clonal.
25 Adicionalmente, la implantación operacional del proceso de la invención en viveros permite la reducción de mano de obra y reducción en el costo de construcción civil de los jardines clonales.

El proceso de la invención permite resolver, entre
30 otros, los siguientes problemas:

- Producción de mudas clonales a gran escala y elevado volumen, con uniformidad y calidad, para una máxima eficiencia y productividad de la propagación vegetativa de

plantas arbóreas, por ejemplo, eucalipto, con ciclos de producción y costos operacionales más reducidos.

— Reducción de disturbios y anomalías fisiológicas relacionadas a la hiperhidricidad de los explantes, fenómeno comúnmente conocido como vitrificación de las plantas. La manipulación de intercambios gaseosos es uno de los diferenciales del proceso de la invención, que preferencialmente es realizado en biorreactor tipo BIT, pero que puede ser realizado en otro tipo de biorreactor, tal como el RITA, y que prácticamente elimina estos problemas biológicos.

— Reducción del costo de producción de mudas clonales de eucalipto asociado a la reducción de la mano de obra involucrada en jardines clonales en el proceso operacional.

— La uniformización del estándar de calidad fisiológica de las plantas matrices y de microesquejes en la propagación vegetativa, realizada en biorreactor de inmersión temporal, contrasta con la falta de uniformidad de las plantas y miniesquejes obtenidos en plantas cultivadas en los jardines clonales, donde las condiciones ambientales no son uniformes.

— Dificultades de propagación vegetativa de especies y clones de especies arbóreas, incluyendo eucalipto, recalcitrantes son contornados con la propagación vegetativa *in vitro* en biorreactores, permitiendo la utilización de clones nuevos y más productivos que no serían producidos por los medios convencionales.

— Limpieza clonal, por medio de la obtención de plantas matrices y cultivos libres de microorganismos fitopatógenos y, también, cultivos de alta fidelidad genética de un único clon sin mezclas de otros clones.

— Aceleración de los programas de mejoramiento mediante la multiplicación de clones superiores, buscando producir

mudas en menor tiempo y mayor cantidad en espacio reducido, además del rejuvenecimiento de clones y matrices seleccionados.

Es importante observar que la utilización de los brotes
5 (o productos de la micropropagación) obtenidos de acuerdo con el proceso de la invención, para siembra directa en recipientes específicos (que pueden ser tubos, plugs, bandejas de espuma de poliestireno u otro tipo), substituye el suministro, al mercado, de brotes de los conocidos
10 jardines clonales (o minijardines clonales o microhuertos clonales). Este es un gran diferencial de la técnica de micropropagación empleada en el proceso de la presente invención y que hace con que la producción de eucaliptos presente un rendimiento en términos de cantidad y calidad
15 incomparable con la técnica utilizada en los jardines clonales.

Descripción de los Medios Nutritivos para Cultivo en Biorreactor de Acuerdo con la Invención

Durante todo el proceso de crecimiento y desarrollo de
20 las plantas en el biorreactor, dos medios básicos de cultivo pueden ser utilizados, conforme al cuadro a continuación. Estos medios son modificados químicamente de acuerdo con la presente invención para atender clones específicos, conforme a la necesidad y fase fisiológica del cultivo. Los medios son
25 complementados con fitorreguladores del crecimiento, en busca de promover la multiplicación de yemas, alargamiento de los brotes y pre inducción del enraizamiento ex vitro de los microesquejes.

Los tipos de concentraciones de los fitorreguladores,
30 así como su manejo de utilización en el proceso del biorreactor son aquellos comúnmente empleados en la técnica, con la debida adaptación para el cultivo de la especie que se

desea propagar, incluyendo preferencialmente la especie arbórea y más preferiblemente el eucalipto.

5 **Cuadro 1:** Medio nutriente líquido del tipo JADS (ver Correia, D. 1993. "Crescimento e desenvolvimento de gemas na multiplicação de Eucalyptus in vitro em meio de cultura líquido e sólido". Disertación de Maestría en Ciencias Forestales, Escuela Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba)

JADS			
Tipo	Reactivo	Formulación	Concentración (mg/L)
Inorgánicos	Nitrato de amonio	NH ₄ NO ₃	1650
	Nitrato de potasio	KNO ₃	809
	Fosfato de potasio monobásico	KH ₂ PO ₄	408
	Sulfato de magnesio heptahidratado	MgSO ₄ .7H ₂ O	739,6
	Nitrato de calcio tetrahidratado	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	1181
	Sulfato ferroso heptahidratado	FeSO ₄ .7H ₂ O	55,6
	EDTA disódico	Na ₂ EDTA	74,6
	Sulfato de manganeso hidratado	MnSO ₄ .H ₂ O	17
	Sulfato de zinc heptahidratado	ZnSO ₄ .7H ₂ O	4,32
	Molibdato dihidratado	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,15
	Sulfato cúprico pentahidratado	CuSO ₄ .5H ₂ O	1,25
	Cloruro de cobalto hexahidratado	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,25
	Ácido bórico	H ₃ BO ₃	3,1
Orgánicos	Ácido nicotínico		0,5
	Pirodoxina		0,5
	Tiamina		5
	Meso Inositol		100
	Glutamina		146
	Arginina		7
	Cistefna		5
	Pantotenato de Calcio		2,4

10 **Cuadro 2:** Medio nutriente líquido tipo MS (ver Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised médium for rapid growth and bioassay with tabacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15:473-497)

MS			
Tipo	Reactivo	Formulación	Concentración (mg/L)
Inorgánicos	Nitrato de amonio	NH ₄ NO ₃	1650
	Nitrato de potasio	KNO ₃	1900
	Fosfato de potasio monobásico	KH ₂ PO ₄	170
	Ácido bórico	H ₃ BO ₃	6,2
	Molibdato dihidratado	Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,25
	Cloruro de Calcio dihidratado	CaCl ₂ . 2H ₂ O	440
	Cloruro de cobalto hexahidratado	CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,025
	Sulfato de magnesio heptahidratado	MgSO ₄ . 7H ₂ O	370
	Sulfato de manganeso hidratado	MnSO ₄ . H ₂ O	16,9

	Sulfato de zinc heptahidratado	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6
	Sulfato cúprico pentahidratado	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
	Sulfato ferroso heptahidratado	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,85
	EDTA disódico	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37,3
Orgánicos	Myo Inositol		100
	Tiamina HCl		10
	Ácido Nicotínico		0,5
	Piridoxina HCl		0,5
	L-Glutamina		100

Siembra de Microesquejes en Plugs Biodegradables

Tal como es mostrado en la Figura 1, los brotes alargados son transferidos del laboratorio a un ambiente controlado, conocido por la denominación de Estufim, donde
 5 serán realizados los estadios de Enraizamiento y Climatización. Para ello, los brotes son separados y los individuos son colocados, cada uno, en recipiente conteniendo medio sólido, siendo estos recipientes colocados en bandejas o estantes. Son diversos los tipos de recipientes específicos
 10 para el enraizamiento de mudas clonales pudiendo ser citados los tipos a continuación.

Recipientes y Bandejas de Siembra:

Ellepot EP: Tubo degradable producido por la empresa
 15 dinamarquesa Ellegaard®, comprendiendo: membrana blanca de celulosa o poliéster y agujeros, teniendo forma cilíndrica; Capacidades: 85 cm³ y 110 cm³; Dimensiones: 30 x 100 mm y 40 x 100 mm.

Jiffy Pellet: Tubo biodegradable producido por la empresa
 20 noruega Jiffy®, comprendiendo una pastilla expansible con fibra de coco y turba de *Sphagnum*, de forma cilíndrica; Capacidades: 85 cm³ y 100 cm³; Dimensiones: 30 x 100 mm y 36 x 100 mm.

Pastillas Expansibles tipo Care-Free® Peat Pellet:
 25 Dimensiones: 30x100 y 36x100, de una combinación de Turba de *Sphagnum* deshidratada y prensada, Perlita y Aditivos

Minerales, revestidos con una membrana permeable y Biodegradable de PLA, producidos por la filial canadiense de la empresa noruega Jiffy®.

5 Bandeja Air-Tray®117: destinada a servir de soporte para los Jiffy-Pellets CareFree® 30x100 mm, con 390 x 590 mm (2.301 cm²), con 117 células, y con área promedio de 19,6 cm²/célula, para la bandeja con el 100% de ocupación (tratamiento T-1).

10 Bandeja Air-Tray®64: destinada a servir de soporte para los Jiffy-Pellets CareFree® 36x100 mm, con 380 x 380 mm (1.444 cm²), con 64 células, y con área promedio de 22,5 cm²/célula, para la bandeja con el 100% de ocupación (tratamiento T-2).

15 Después de la debida colocación de los pellets en las bandejas, estas deben ser colocadas con su parte inferior (base) en contacto con una lámina rasa de agua pura, de modo que los pellets dentro de las bandejas no sean recubiertos (o floten) en el agua. Este es el proceso de expansión de los pellets, que en este caso se "rehidratan" por capilaridad. Es
20 importante resaltar que la base de los pellets debe ser mantenida en contacto con esta lámina de agua, hasta la total expansión de los mismos. En caso que la lámina de agua se reduzca (debido a la absorción por los pellets), ella debe ser repuesta. No debe haber preocupación con "exceso de
25 agua". Esta operación dura pocos minutos. En caso que se quiera acelerar el proceso de expansión, se puede echar mano de agua calentada aproximadamente a 45°C. En este caso, es esencial efectuar la expansión de los pellets con algunos minutos de antecendencia, de modo que su temperatura se
30 aproxime a la temperatura ambiente, antes de ser llevados para recibir los microesquejes.

Técnica de Climatización de Plántulas de Eucalipto
Micropropagadas

En general, en una población de plantas micropropagadas de eucalipto, es probable que una pequeña subpoblación presente anomalías anatómicas, morfológicas y fisiológicas, en función de desequilibrios de las condiciones en el interior de los biorreactores y otros frascos en la micropropagación. Todas estas alteraciones asociadas a condiciones no adecuadas para los procesos de enraizamiento de los microesquejes y la subsiguiente climatización de las plántulas, consecuentemente, reducen las tasas de sobrevivencia y calidad de las mudas.

La aplicación de técnicas de climatización procura proporcionar mayor graduación en la transición entre el ambiente *in vitro* (biorreactor) y el externo (vivero). Entre estas técnicas, se destacan la utilización de los sistemas de *mist* y *fog*, que contribuyen a mantener la turgencia vegetal y disminuir la demanda de evaporación. El sombreado auxilia en la reducción de los elevados niveles de luminosidad del ambiente externo y, también, contribuye a reducir la temperatura y el estrés de las plantas en climatización.

Alternativamente, otros productos y ambientes protegidos son utilizados en la siembra de los microesquejes producidos en biorreactores. Entre los productos, son utilizados substratos estabilizados por polímeros para siembra en recipientes biodegradables de fibra de madera, fibra de coco y turba de *Sphagnum*. Estos recipientes funcionan como pastillas prensadas y expansibles cuando son hidratadas.

Sistema de cultivo con *fog* en estufim

Este sistema utiliza la generación de una niebla de gotas de agua extremadamente pequeñas, con diámetro igual o menor a 15 μm , que son nebulizadas dentro del ambiente del estufim a través de boquillas específicas o nebulizador ultrasónico, que genera un *fog* ultrafino ($< 5 \mu\text{m}$) y seco. Estas gotas son tan pequeñas que permanecen en suspensión en

el aire hasta evaporarse, contribuyendo al aumento de la humedad y reducción de la temperatura y, al mismo tiempo, evitando el humedecimiento foliar. Estas gotas de agua en suspensión son capaces de mantener una finísima película de vapor de agua en ambas caras foliares, lo que mantiene las mudas turgentes y con temperatura controlada.

El sistema de *fog* es utilizado en conjunto con la estructura de estufim, preferentemente una estructura desarrollada específicamente para el enraizamiento y climatización del eucalipto. El estufim consiste en el montaje de un mini-invernadero o sobre-túneles dentro de un invernadero normal, mantenidos suspendidos en mesas rollizas. Durante el crecimiento y desarrollo de las mudas en el estufim, es utilizado el sistema de irrigación de sub-superficie (*floating*), que propicia inmersiones temporales de la base de los *plugs* biodegradables en agua o solución nutritiva, procurando suplir los nutrientes para plantas sin el humedecimiento de la parte aérea de las mudas.

Técnica de Trasplante de Microesquejes en Plugs Biodegradables

El sistema de siembra de los microesquejes producidas en el biorreactor en recipientes biodegradables consiste en seleccionar los microesquejes de patrón de cualidad satisfactorios e insertar la base de los microesquejes en bolsas o pastillas prensadas previamente hidratadas (*plugs*), tal como descritas líneas arriba.

- Estadio de Rehidratación y Expansión del Jiffy:

— Después de la colocación de las pastillas en las bandejas, estas deberán ser posicionadas con su parte inferior (base) en contacto con una lámina rasa de agua pura, a temperatura ambiente, de modo que los Pellets dentro de las bandejas no sean recubiertos (o floten) en

el agua, hasta su total expansión, antes de la siembra de los microesquejes.

— La rehidratación de las pastillas es realizada sólo por capilaridad y no por sumersión de las mismas en el agua.

5 Es importante resaltar que la base de los Pellets debe ser mantenida en contacto con la lámina de agua, hasta la total expansión de los mismos. En caso que la lámina de agua se reduzca (debido a la absorción de los Pellets), ella debe ser repuesta. No debe haber
10 preocupación con el exceso de agua. Esta operación dura pocos minutos.

— En caso que se quiera acelerar el proceso de expansión, se puede echar mano de agua calentada aproximadamente a 45°C. En este caso, es esencial efectuar la expansión de
15 los pellets con algunos minutos de antecendencia, de modo que su temperatura se aproxime a la temperatura ambiente, antes de ser llevados para recibir los microesquejes durante la siembra.

A título de ejemplo no limitativo, son proporcionadas
20 algunas informaciones sobre las técnicas disponibles para la realización de la siembra de los microesquejes producidos en el biorreactor.

- Especificaciones Técnicas de los Plugs y Bandejas (PLA Net = Resina biodegradable de almidón de maíz)

Producto	Objetivo
Jiffy-7 Care Free Horticulture Peat Plug, 30 x 100 mm, 6 mm indent, PLA net	Siembra directa del microesqueje para producción de mudas para siembra en el campo
Jiffy-7 Care Free Horticulture Peat Plug, 30 x 80 mm, 6 mm indent, PLA net	Siembra directa del microesqueje para producción de mudas para siembra en el campo
Jiffy-7 Forestry Peat Pellet, 18 x 25 mm, 9 mm indent, PLA net	Siembra directa del microesqueje en mini-plug para producción de mudas para siembra en jardín clonal
Jiffy-7 Forestry Peat Pellet, 18 x 32 mm, 9 mm indent, PLA net	Siembra directa del microesqueje en mini-plug para producción de mudas para siembra en jardín clonal
Jiffy-7 Horticulture Peat Pellet, 36 x	Trasplante de la muda enraizada en el

75 mm, TP 40 mm, PLA net	mini-plug 18x25 al plug 36x75 y siembra en el campo
Jiffy-7 Horticulture Peat Pellet, 36 x 75 mm, TP 25 mm, PLA net	Trasplante de la muda enraizada en el mini-plug 18x25 al plug 36x75 y siembra en el campo
New Mini-18 mm thermo forn tray para J7 pellet 18x32; tray size 33 x 45 x 4 cm	Bandejas para soporte de los mini-plugs y crecimiento de las mudas.

• Manipulación de Espaciamiento de Mudas en las Bandejas:

Tipo de Tubo	Fase de la Producción	Duración (días)	Densidad (cm ² / muda)	Capacidad (cant. / bandeja)	Capacidad (% / bandeja)
Jiffy 30x100mm	Enraizamiento	10	20	117	100
	Aclimatación	10	39	59	50
	Crecimiento	15	96	24	20
	Fortalecimiento	15	96	24	20
Jiffy 36x100mm	Enraizamiento	10	23	64	100
	Aclimatación	10	45	32	50
	Crecimiento	15	90	16	20
	Fortalecimiento	15	90	16	20

• Manejo de la Irrigación:

- La aplicación de lámina de agua de irrigación deberá ser ajustada para alcanzar la capacidad de campo de cada substrato, principalmente, en las fases de Enraizamiento (CV) y Aclimatación (CA), donde el Ellepot y Jiffy no deben quedar saturados de agua.
- En la casa de vegetación, el manejo de la irrigación debe contemplar un turno de riego de corta duración e intervalos entre irrigaciones, por ejemplo, 6 segundos de duración por cada 10 a 15 minutos entre irrigaciones, procurando aumentar el tenor de la humedad relativa del aire sin que ocurra la irrigación del substrato.

— En la casa de aclimatación, el manejo de la irrigación debe permitir el completo humedecimiento del substrato del Ellepot y Jiffy, sin causar exceso y saturación de los mismos. El sombreado, por ejemplo, con pantalla tipo sombrite, debe permanecer extendido solo en las horas más calurosas del día, por ejemplo, desde las 11 hasta las 14 horas.

— En las fases de Crecimiento (PC) y Fortalecimiento (PR), al contrario, el Ellepot y el Jiffy deben quedar casi que saturados, por haber necesidad de una lámina mayor de agua para compensar pérdidas por evaporación a partir del recipiente, absorción radicular y transpiración foliar.

— En el patio de crecimiento y fortalecimiento, adicionalmente, se recomienda realizar la irrigación de los Ellepot y Jiffy con barra de irrigación o ducha hasta el humedecimiento uniforme de todo el substrato.

• Monitoreo de la Humedad del Substrato:

— Durante los procesos de enraizamiento y crecimiento de las mudas en el recipiente Ellepot y Jiffy, hay necesidad del monitoreo del tenor de humedad en el substrato, con el fin de recomendar el turno de irrigación (duración e intervalos) para que la humedad del substrato permanezca dentro del rango ideal de capacidad de campo.

— Estas mediciones instantáneas y en tiempo real de la humedad del substrato deben ser realizadas por medio del medidor portátil de humedad + conductividad + temperatura, por ejemplo, el de marca Delta-T, modelo WET Sensor. Este equipo debe ser previamente calibrado en el laboratorio apropiadamente para el substrato que está siendo utilizado en la prueba.

- El sensor de humedad debe ser insertado en al menos dos posiciones (profundidades) dentro del Ellepot y Jiffy, pues solo la punta del sensor es capaz de registrar los valores con precisión en la región de la rizosfera. En la CV, esta posición debe ser superficial (2-3 cm), en la CA esta posición debe ser mediana (3-6 cm) y en el PC la posición debe ser final (7-9 cm).
- Entre una medición y otra es necesario aguardar un período de tiempo (10-15 segundos) para la estabilización del sensor en el substrato húmedo. En un mismo Ellepot o Jiffy, debe ser procesada la 1ª medición en un punto de menor humedad, y la 2ª medición en un punto de mayor humedad.
- Se recomiendan los siguientes rangos de humedad para el substrato utilizado en la prueba, medido con Sensor Húmedo, conforme al cuadro siguiente:

Humedad substrato	Humedad Mecprec (%, v/v)	Humedad Ellepot y Jiffy (%, v/v)	Observación
Saturado	> 40 %	< 50 %	Exceso elevado de agua.
Semi saturado	21 a 40 %	40 a 50 %	Exceso moderado de agua.
Adecuado	16 a 20 %	25 a 39 %	Condición ideal de humedad.
Semi seco	10 a 15 %	15 a 24 %	Deficiencia moderada agua.
Seco	< 10 %	< 15 %	Deficiencia alta de agua.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 - Obtención de mudas clonales de eucalipto

El proceso de la invención, aplicado a la obtención de mudas clonales de eucalipto en biorreactor mediante la técnica de inmersión temporal, comprende las siguientes etapas:

Etapas 1 - El material vegetal permanece en reposo durante el intervalo entre las inmersiones del cultivo vegetal en el medio e intercambios gaseosos de la atmosfera del compartimento interno del biorreactor. El medio queda
5 almacenado en el recipiente externo (inferior) y los explantes en el compartimento interno (superior). La radiación fotosintética activa del biorreactor es ejecutada por medio de luminarias tubulares con lámparas Led en los colores azul, rojo y blanco.

10 **Etapas 2** - La válvula solenoide es accionada por un temporizador en intervalo de tiempo y duración preestablecidos. Esto permite la entrada de aire comprimido en el recipiente externo, aumentando la presión en el compartimento externo (inferior), haciendo con que el medio
15 de cultivo líquido sea transferido al compartimento interno (superior) de las plantas, pasando por canales de conexión entre los recipientes, y que entre en contacto con la base de los cultivos vegetales. La manipulación de inmersión temporal varía conforme al tipo de clon de eucalipto y también con la
20 fase del cultivo. En la fase de multiplicación de brotes, se utiliza de 2 a 3 horas de intervalo entre inmersiones temporales e inmersiones con duración entre 1 y 2 minutos. En la fase de alargamiento de brotes, se utiliza de 4 a 5 horas de intervalo entre inmersiones temporales e inmersiones con
25 duración entre 20 y 30 segundos.

Etapas 3 - Después del período de inmersión, la válvula solenoide es desactivada y el medio retorna al compartimento externo a través de los drenajes, por la fuerza de la gravedad. En esta etapa, ocurre el intercambio con la
30 inyección de aire comprimido en el recipiente interno, donde el material vegetal queda localizado. Este intercambio gaseoso (aire y gas carbónico) es accionado por una válvula solenoide controlada por temporizador.

Etapla 4 - El intercambio gaseoso sucede con la inyección de concentraciones específicas de CO_2 en el recipiente interno, con caudal de 1,3 litros por minuto, flujo de 500 $\mu\text{mol CO}_2$ por segundo, en la concentración de 800 a 1.000 $\mu\text{mol CO}_2$ por mol
5 de aire, donde crece el material vegetal, procurando aumentar la capacidad fotosintética y productiva de los cultivos. Este intercambio gaseoso también es accionado por una válvula solenoide controlada por temporizador.

Radiación RFA - Durante todo el ciclo de producción es
10 utilizada la radiación fotosintéticamente activa (RFA), que corresponde al intervalo de 400 a 700 nm, para el crecimiento y desarrollo del cultivo. En este caso, se utilizan luminarias eléctricas con diodos emisores de luz (LED), al contrario de las tradicionales lámparas fluorescentes
15 empleadas en las biofábricas. Las plantas absorben principalmente los espectros en el rango del rojo (600-700 nm) y del azul (400-500 nm), por lo tanto, el manejo de iluminación es controlado para proporcionar una relación de 3/1 (rojo/azul) a 2/1 (rojo/azul), respectivamente para
20 multiplicación y alargamiento. La intensidad de RFA también varía conforme al estadio fisiológico del cultivo. Normalmente, en la fase de multiplicación se utiliza de 20 a 30 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ y en la fase de alargamiento de 40 a 60 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$.

25 Todas las publicaciones y pedidos de patente mencionados en la presente descripción son indicativos del nivel de aquellos especialistas en la técnica al cual el presente modelo de utilidad se refiere. Todas las publicaciones y pedidos de patente están aquí incorporados a título de
30 referencia, en la misma extensión como si cada publicación individual o cada pedido de patente fuese específica e individualmente indicado para ser incorporado a título de referencia.

A pesar de que ciertas concretizaciones hayan sido descritas, ellas fueron presentadas como un modo ejemplificativo solamente, y no hay intención de limitar el ámbito del presente modelo de utilidad. Las reivindicaciones
5 que acompañan esta descripción y sus equivalentes son consideradas como cubriendo tales formas o modificaciones, en la medida en que ellas pueden estar dentro del ámbito y espíritu del presente modelo de utilidad.

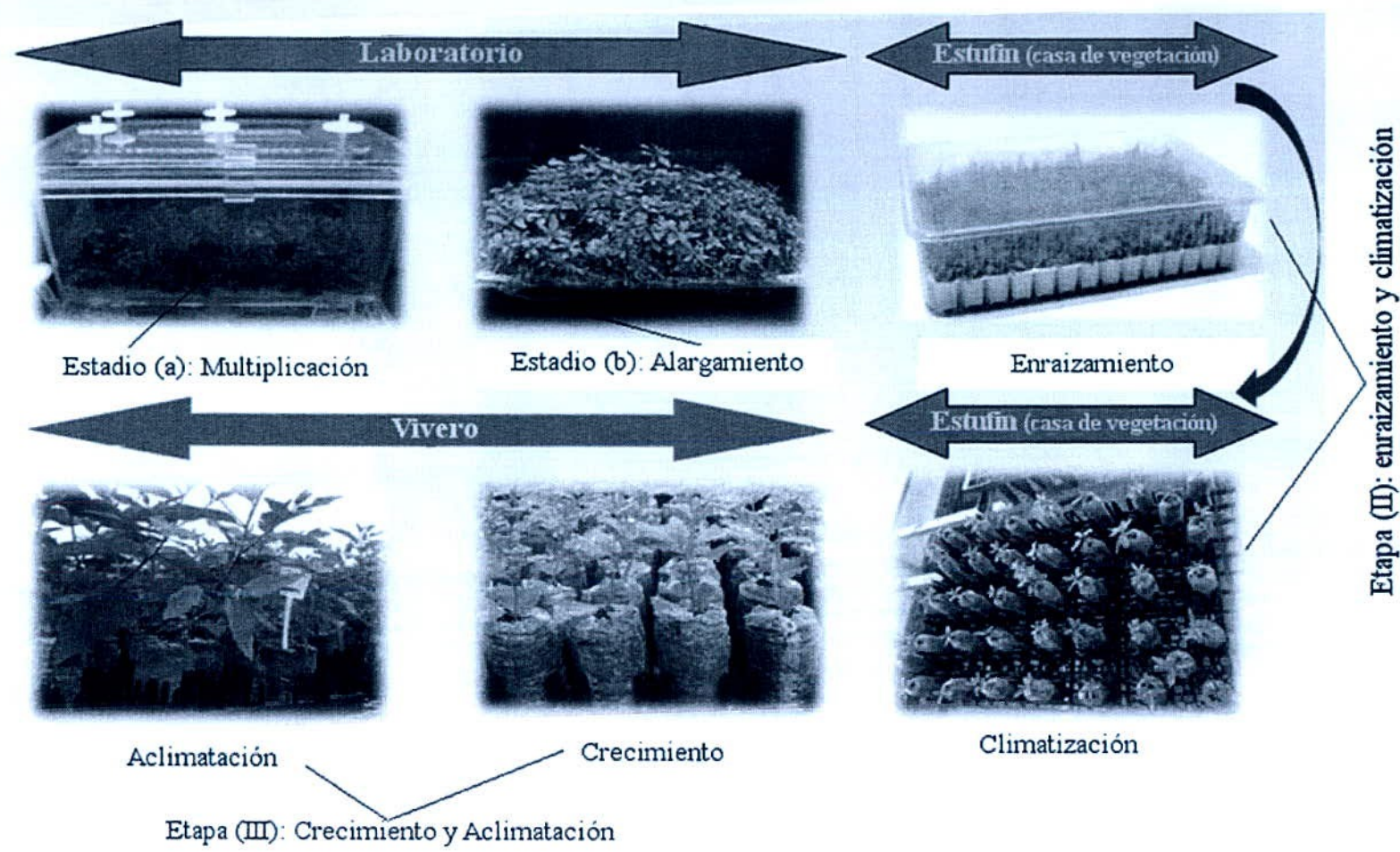
RESUMEN DE LA PATENTE DE INVENCION

"PROCESO PARA MICROPROPAGACION *IN VITRO* DE MATERIAL DE PLANTA Y PROCESO PARA LA PRODUCCION, A GRAN ESCALA Y ELEVADO VOLUMEN, DE MUDAS CLONALES DE PLANTAS LISTAS PARA SU DESARROLLO EN CAMPO"

5

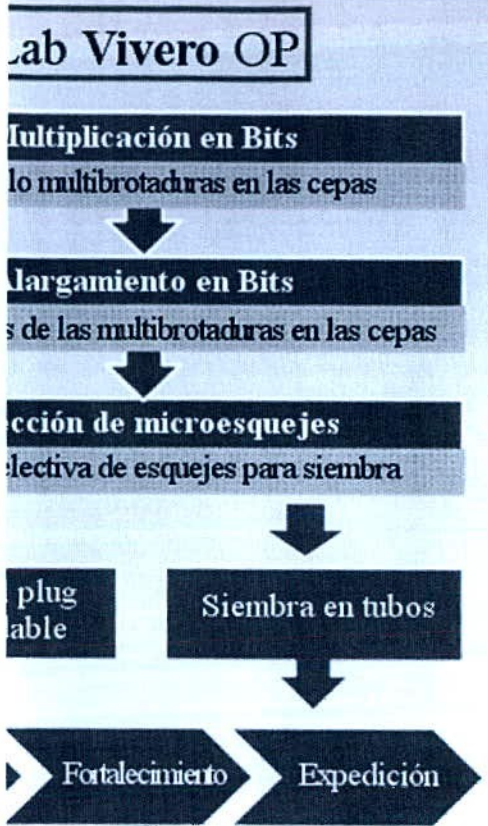
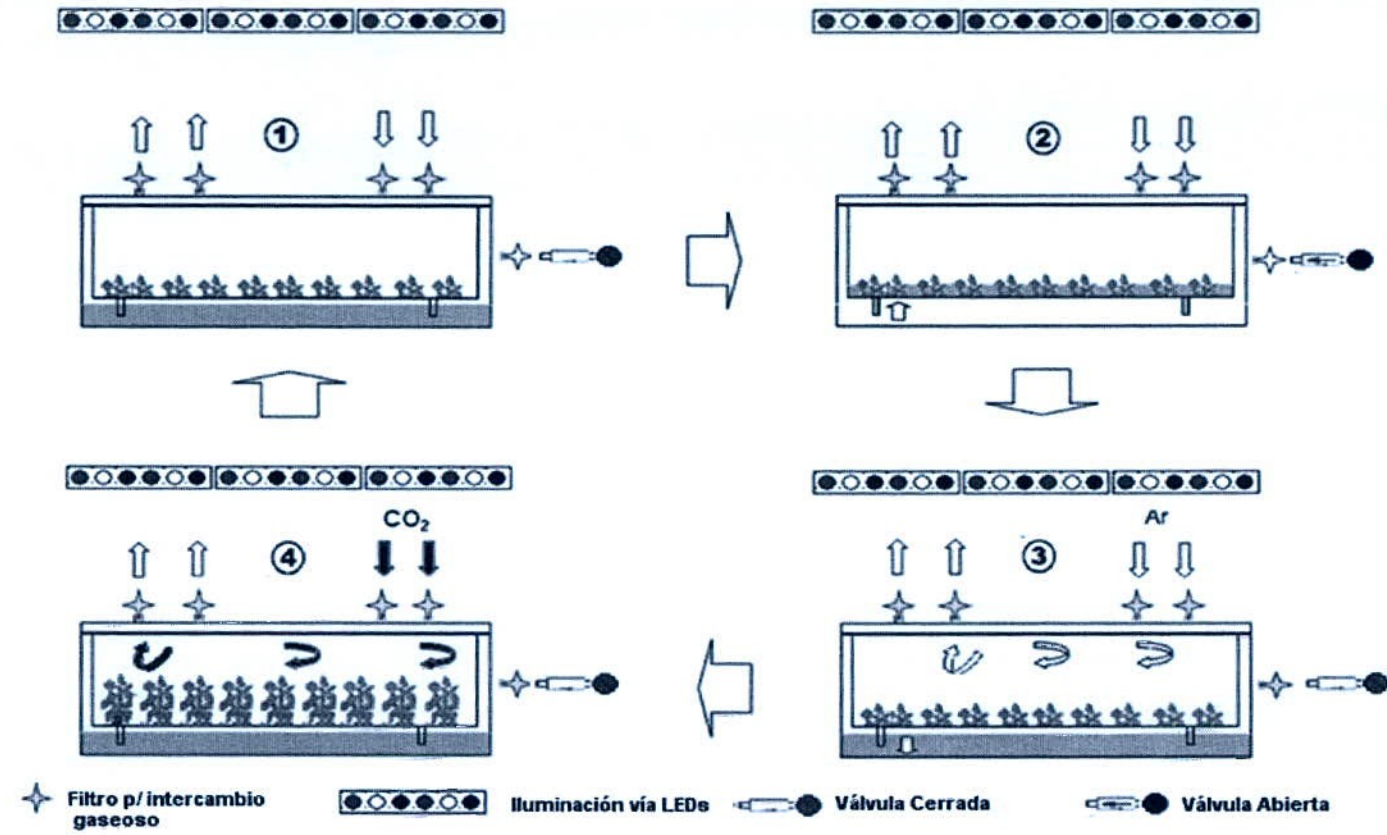
La presente invención está referida a un proceso para micropropagación *in vitro* de material de planta comprendiendo las etapas de multiplicación y alargamiento de los brotes desarrollados a partir de plántulas de planta. La invención
10 comprende, también, un proceso para la producción de mudas clonales de plantas a gran escala listas para su desarrollo en campo, como substitución de los jardines clonales tradicionales por biofábricas '*in vitro*'.

FIGURA 1



Handwritten signature or mark.

FIGURA 2



REIVINDICACIÓN

1. Proceso para micropropagación *in vitro* de material de planta comprendiendo las etapas de multiplicación y alargamiento de los brotes desarrollados a partir de
5 plántulas de planta por el método de inmersión temporaria, siendo que:

(a) en la etapa de multiplicación de los brotes, el material a ser propagado es colocado sobre soporte adecuado en un primer recipiente (recipiente de
10 propagación vegetativa) y es sometido a manipulación de inmersión temporal en medio nutriente líquido, proveniente de un segundo recipiente (recipiente de almacenamiento del medio líquido), comprendiendo dicha manipulación períodos alternados de inmersión y de
15 descanso;

(b) en la etapa de alargamiento de los brotes, el material en propagación es sometido a manipulación de inmersión temporal, preferentemente empleando el mismo medio nutriente de la etapa (a), comprendiendo dicha
20 manipulación períodos alternados de inmersión y de descanso,

siendo dicho proceso **caracterizado** por el hecho de que, en la tal etapa (b) (de alargamiento), los referidos períodos de inmersión son significativamente más cortos y los referidos
25 períodos de descanso son más largos en comparación con los períodos de inmersión y de descanso, respectivamente, en la etapa (a) (de multiplicación).

2. Proceso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** por el hecho de que dicho material de planta es de planta
30 arbórea.

3. Proceso de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizado** por el hecho de que dicha planta arbórea es una especie de eucalipto.

4. Proceso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** por el hecho de que, en la etapa (a), dicho período de inmersión es de por lo menos 1 minuto y dicho período de descanso es de por lo menos 2 horas.

5. Proceso de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizado** por el hecho de que dicho período de inmersión es de un máximo de 3 minutos y dicho período de descanso es de un máximo de 4 horas.

6. Proceso de acuerdo con cualquier de las reivindicaciones 4 o 5, **caracterizado** por el hecho de que dicho período de inmersión es de 1 a 2 minutos y dicho período de descanso es de 2 a 3 horas.

7. Proceso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** por el hecho de que, en la etapa (b), dicho período de inmersión es de por lo menos 20 segundos y dicho período de descanso es de por lo menos 4 horas.

8. Proceso de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizado** por el hecho de que dicho período de inmersión es de un máximo de 60 segundos y dicho período de descanso es de un máximo de 6 horas.

9. Proceso de acuerdo con cualquier de las reivindicaciones 7 o 8, **caracterizado** por el hecho de que dicho período de inmersión es de 20 a 30 segundos y dicho período de descanso es de 4 a 5 horas.

10. Proceso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** por el hecho de que la micropropagación *in vitro* del material de planta es realizado en biorreactor tipo BIT.

11. Proceso para la producción, a gran escala y elevado volumen, de mudas clonales de plantas listas para el desarrollo en campo, siendo dicho proceso **caracterizado** por el hecho de comprender las etapas de: (i) realizar la
5 propagación vegetativa de material de planta por proceso como definido en las reivindicaciones de 1 a 10; (ii) permitir el enraizamiento y climatización de los brotes alongados obtenidos en la etapa (i) en recipientes y condiciones apropiadas para mantener la turgencia vegetal y disminuir la
10 demanda de evaporación; y (iii) posibilitar el crecimiento y aclimatación de los microesquejes obtenidos en la etapa (ii) hasta el tamaño de mudas clonales adecuadas para su transferencia al campo.

12. Proceso de acuerdo con la reivindicación 11,
15 caracterizado por el hecho de que la etapa (ii) es realizada en ambiente húmedo, en el cual las gotas de vapor de agua son tan pequeñas que permanecen en suspensión en el aire hasta evaporarse y al mismo tiempo es evitada la humidificación foliar.

1/27

Specification of the Patent Invention

"PROCESS FOR IN VITRO MICROPROPAGATION OF PLANT MATERIAL AND PROCESS FOR PRODUCTION, IN LARGE-SCALE AND HIGH VOLUME, OF CLONAL SEEDLINGS OF PLANTS READY FOR FIELD DEVELOPMENT"

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to a process for the production of clonal plants of arboreal species, especially eucalyptus, in large-scale and high-volume, whereby the step of vegetative propagation, performed in vitro, occurs under conditions such that the obtaining of healthy and vigorous microcuttings of the arboreal species is maximized, while the rate of hyperhydricity of the micropropagation phase in the temporary immersion regime is minimized.

FUNDAMENTALS OF THE INVENTION

Micropropagation consists of a technique of plant tissue culture which is used as a basis for the formation of seedlings, being a practical, safe and fast method of mass propagation of plants in a reduced space. Conventionally, micropropagation is performed via the semi-solid system, typically in a gelling medium with agar. However, this is still a costly practice, allowing room for the use of equipment and new technologies with equipment called bioreactors that help in the production of plants in large scale operation and reduce the high cost of labor.

Bioreactors are devices for the cultivation of seedlings in a regime of temporary or permanent immersion to obtain plants. The bioreactor consists of a set of containers with compartments

2/27

and accessories for optimal management of key growth factors to maximize the biological reactions. By means of this equipment, it is possible to obtain higher rates of multiplication of the culture by the use of a liquid nutrient medium, injection and exchange of gases, e.g. air enriched with carbon dioxide, inside the container, as well as better physiological control of cultivation conditions and process automation. There are various types of bioreactors, which may vary depending on the culture container and culture medium, the immersion-type (temporary or permanent), and their functionality. The temporary immersion systems best known in Brazil are RITA® (temporary automated immersion container - for example, created by CIRAD-France) and BIT® (temporary immersion bioreactor - for example, created by Embrapa-Cenargen).

Due to the potential of the micropropagation technique, there is growing interest in this technology as demonstrated by the prior art. For example, document WO 2012/061950 describes a method and bioreactor for the micropropagation of an Antarctic plant species, wherein the method is characterized by the use of a nutrient medium and appropriate conditions for the development of said plant species, and additionally employs a protocol for supplying UV radiation and temperature control for the production of valuable metabolites for medical and cosmetic use.

Document WO 2012/156440 describes a temporary immersion system and method of micropropagation of plant species characterized by the provision of appropriate conditions for the development of propagules, such as lighting, a temperature and immersion system with intervals ranging from 1 to 10 times per

day, and immersion time of 1 to 2 minutes or 3 to 4 minutes depending upon the plant species being developed.

Watt (see Watt, MP "The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation." African Journal of Biotechnology, Vol. 11 (76), p. 14025-14035, 09/20/2012) provided a retrospective of the micropropagation of plants, particularly with respect to proposals to reduce hyperhydricity, citing as the main factors, the shortening of the immersion time and increasing periods of rest (time between two successive immersions).

González (see Gonzalez, R. et al. "Multiplication in vitro of *Eucalyptus globulus* by temporal immersion system." Bosque 32(2): 147-154, 2011) reported the factors affecting the stage of in vitro multiplication of *Eucalyptus globulus* by temporary immersion and concludes that the rate of multiplication of microcuttings of this arboreal species increases significantly when a soak time of 1-2 min and a frequency of immersion (rest period) for 12 hours are employed. These authors also concluded that hyperhydricity increases with the concentration of nutrients and sucrose.

Oliveira (see Oliveira ML, "Micropropagation of clones of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* in a temporary immersion bioreactor." Master's Thesis Dissertation. Federal University of Viçosa. 2011) reports the study of in vitro micropropagation of two eucalyptus species, concluding that there is a high percentage of occurrence of hyperhydricity in the development of propagules when the technique of temporary immersion is employed. The author also concluded that "there is a need for adjustment in

4/27

the crop management phases of multiplication and elongation to obtain shoots with greater vigor, able to root in ex vitro conditions in order to make this technique feasible on a large scale."

The aforementioned prior art shows that although there has been great progress in the technique of in vitro micropropagation of plants, the problem of hyperhydricity remains to be solved and, at the same time, employing suitable conditions to obtain clonal seedlings of plants, particularly of the arboreal species, and more particularly of the eucalyptus species, enabling the production of said cloned seedlings on a large scale and high volume and to achieve commercial production of healthy and luxuriant plants.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention refers to the obtaining of clonal plant seedlings, in particular of arboreal species, particularly the species of eucalyptus, using the technique of in vitro micropropagation of plant material, comprising the steps of multiplication, elongation, rooting, acclimatization, and growth and acclimatization of seedlings ready for commercialization.

In a first embodiment, the present invention relates to a process for in vitro micropropagation of plant material, especially of arboreal species, particularly from a species of eucalyptus, comprising the steps of multiplication and elongation of shoots developed from plant propagules by the temporary immersion method, as follows: (a) in the step of multiplication of the shoots, the material to be propagated is placed on a suitable support in a first container (plant propagation

5/27

container) and is subjected to management of temporary immersion in a liquid nutrient medium from a second container (storage container of a liquid medium), said management comprising alternated periods of immersion and rest, with the immersion time being preferably at least 1 minute, preferably at most for 3 minutes, more preferably for 1 to 2 minutes, with the resting period preferably at least 2 hours, preferably for up to 4 hours, more preferably for 2 to 3 hours; (b) in the step of elongation of shoots, the propagation material is subjected to management of temporary immersion, preferably employing the same nutrient medium of step (a), said management comprising alternated periods of immersion and rest, the immersion time being preferably for at least 20 seconds, preferably for at most 60 seconds, more preferably for 20 to 30 seconds, with the rest period preferably being at least 4 hours, preferably for at most 6 hours, more preferably for 4 to 5 hours; said method being characterized by the fact that, in said elongation step, said immersion periods are significantly shorter and said rest periods are longer compared with the periods of immersion and rest, respectively, in the multiplication step.

In a second embodiment, the invention relates to a process for the production of clonal plant seedlings ready for field development comprising the steps of: (i) subjecting the plant propagules to vegetative propagation conditions of temporary immersion in vitro comprising the stages of: (a) multiplication of the shoots in which the material to be spread on suitable support is placed in a first container (micropropagation container) and said material is subjected to the management of temporary immersion in a liquid nutrient medium, from a second

6/27

container (liquid medium storage container), with said management comprising alternating periods of immersion and rest, with the immersion time preferably at least 1 minute, preferably at for most 3 minutes, more preferably for 1 to 2 minutes, and with the period of rest being preferably at least 2 hours, preferably for at most 4 hours, more preferably for 2 to 3 hours; (b) elongation of shoots in which the material is subjected to propagation management of temporary immersion, preferably using the same nutrient medium of stage (a), said management comprising alternating periods of rest and immersion, with the immersion period being preferably at least 20 seconds, preferably for at most 60 seconds, more preferably for 20 to 30 seconds, and the rest period being preferably at least 4 hours, preferably for at most 6 hours, more preferably for 4 to 5 hours; (ii) rooting and acclimatization of the multi buds obtained in step (i) in containers and conditions suitable to maintain plant turgor and reduce evaporative demand; and (iii) growth and acclimatization of the microcuttings obtained in step (ii).

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 illustrates the process of the present invention showing the micropropagated / microcutting of the material at each step.

Figure 2 shows the step of in vitro micropropagation in a regime of temporary immersion in a liquid nutrient medium.

Figure 3 shows the development stages of clonal seedlings in large scale and high volume, from selection of the correct clone to market introduction.

7/27

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The production system of microcuttings of clonal arboreal species, such as eucalyptus, in high scale and high productivity in temporary immersion bioreactors has as its main objective the gradual replacement of traditional clonal gardens of operational forest nurseries by plant biofactories, aimed at producing industrial micropiles for subsequent rooting and acclimatization in specific greenhouses (cloches).

In bioreactors, it is possible to obtain higher rates of multiplication and crop growth by continuous use of a liquid nutrient medium, supplemented with air injection and carbon dioxide enrichment and photosynthetically active radiation with light-emitting diode lamps inside the plant containers. Thus, the management of production of shoots and biomass is best optimized via automated manipulation of key growth factors, enabling better physiological control of culture conditions.

What has been sought in this technique is the minimization of hyperhydricity, which causes disturbances and degeneration of the cloned seedlings obtained by the method of temporary immersion and, at the same time, retains the advantages of this technique in terms of production costs and health/vigor of the produced seedlings. This challenge was met by the inventors of this invention who have created a method in which alternating periods of immersion and rest of the material in vegetative propagation are differentiated in the stages of multiplication and elongation of shoots. This procedure has made it possible to reduce hyperhydricity and maximize the production of clonal plants seedlings, in particular arboreal species, and most

8/27

preferably of the eucalyptus species. In Figure 1, these two stages are represented as activities in the laboratory, wherein micropropagation, i.e. the step of including the stages of multiplication and elongation, generally takes a period of about 45 days.

The process of the present invention has been customized to meet the physiological demands for the vegetative propagation of arboreal species, especially eucalyptus, allowing the intensive and precision development of plants, differentiated to result in the best quality standard and uniformity and vigor of shoots produced, providing greater rooting of microcuttings and subsequent better acclimatization and early yield of clonal seedlings for industrial use on a large-scale.

The process of the present invention allows the obtaining of productivity at least 30 times greater than the traditional method of producing seedlings from commercial nurseries, in addition to providing a 33% reduction in cycle time for production of a clonal change. Additionally, the operational deployment of the process of the invention in nurseries provides a reduction of manpower and a reduction in the construction cost of clonal gardens.

The process of the invention solves, among others, the following problems:

— Production of clonal seedlings on a large scale and high volume, with uniformity in quality, for maximum efficiency and productivity of vegetative propagation of arboreal plants, for example, eucalyptus, with reduced operating costs and production cycles.

9/27

- Reduction of physiological abnormalities and disorders related to hyperhydricity of the explants, a phenomenon commonly referred to as plant vitrification. The management of gas exchange is one of the advantages of the invention, which is preferably performed in a bioreactor of the BIT type, but may be performed in a bioreactor of another type, such as RITA, which practically eliminates these biological problems.
- Reduction of the cost of production of eucalyptus clonal seedlings associated with reduced labor involved in clonal gardens in the operational process.
- Uniformity of the pattern of physiological quality of plant matrices and micropiles in vegetative propagation, performed in a temporary immersion bioreactor, in contrast with the lack of uniformity of plants and cuttings obtained from plants grown in clonal gardens, where environmental conditions are not uniform.
- Difficulties of the vegetative propagation of species and clones of arboreal species, including eucalyptus, recalcitrants are contoured with vegetative propagation in vitro in bioreactors, allowing the use of new and more productive clones that would not be produced by conventional means.
- Clonal cleaning, by obtaining matrices of plants and crops free of pathogenic microorganisms and, also, cultures of high genetic fidelity of single clone without mixing with other clones.
- Acceleration of breeding programs by multiplication of superior clones, aiming to produce seedlings in less time and in

10/27

greater quantity and reduced space, in addition to the rejuvenation of selected clones and matrices.

It is important to note that the use of sprouts (or products of micropropagation) obtained according to the process of the invention, for direct seeding in specific containers (which can be tubes, plugs, Styrofoam trays or otherwise), replaces the supply of shoots to the market from known clonal gardens (either clonal mini-gardens or clonal micro-gardens). This is a great advantage of the technique employed in the micropropagation process of the present invention, and one that, with the production of eucalyptus, presents a return in terms of unmatched quantity and quality which is not comparable with the technique used in clonal gardens.

Description of the Nutritive Media Culture in the Bioreactor
According to the Invention

Throughout the process of growth and development of plants in the bioreactor, two basic culture media can be used, as shown below. These media are chemically modified according to the present invention to attend specific clones, according to the need and physiological stage of the culture. The media are supplemented with growth phytohormones, fostering bud multiplication, elongation of shoots and pre-induction of ex-vitro rooting of microcuttings.

The types of concentrations of growth regulators, as well as their use in the management of the bioreactor process are those commonly employed in the art, with proper adaptation to the cultivation of the desired species for propagation, preferably including arboreal species, and more preferably eucalyptus.

Table 1: Liquid nutrient medium type JADS (see Correia, D. 1993. "Growth and development of buds in the multiplication of eucalyptus in vitro in liquid and solid culture medium." Master's Thesis Dissertation in Forestry Science, Luiz de Queiroz College of Agriculture, Piracicaba)

JADS			
Type	Reagent	Formulation	Concentration (mg/L)
Inorganics	Amonium Nitrate	NH_4NO_3	1650
	Potassium Nitrate	KNO_3	809
	Monobasic potassium phosphate	KH_2PO_4	408
	Magnesium sulfate heptahydrate	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	739.6
	Calcium nitrate tetrahydrate	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1181
	Iron sulfate heptahydrate	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	55.6
	Disodium EDTA	Na_2EDTA	74.6
	Manganese sulfate heptahydrate	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	17
	Zinc sulfate heptahydrate	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4.32
	Molybdate dihydrate	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.15
	Cupric sulfate pentahydrate	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.25
	Cobalt chloride hexahydrate	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.25
	Boric Acid	H_3BO_3	3.1
	Nicotinic Acid		0.5
Organics	Pyridoxine		0.5
	Thiamine		5
	Meso Inositol		100
	Glutamine		146
	Arginine		7
	Cysteine		5
	Calcium pantothenate		2.4

Table 2: Liquid nutrient medium MS type (see Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497)

MS			
Type	Reagent	Formulation	Concentration (mg/L)
Inorganics	Amonium Nitrate	NH_4NO_3	1650
	Potassium Nitrate	KNO_3	1900
	Monobasic potassium phosphate	KH_2PO_4	170
	Boric Acid	H_3BO_3	6.2
	Molybdate dihydrate	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
	Calcium chloride dihydrate	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
	Cobalt chloride hexahydrate	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
	Magnesium sulfate heptahydrate	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
	Manganese sulfate heptahydrate	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	16.9
	Zinc sulfate heptahydrate	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6
	Cupric sulfate pentahydrate	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
	Iron sulfate heptahydrate	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.85
	Disodium EDTA	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37.3
Organics	Myo Inositol		100

12/27

	Thiamine HCl		10
	Nicotinic acid		0.5
	Piridoxine HCl		0.5
	L-Glutamine		100

Planting of Microcuttings in Biodegradable Plugs

As shown in Figure 1, the elongated shoots are transferred from the laboratory to a controlled environment, known by the denomination of Cloche, where the stages of Rooting and Acclimatization are performed. To do so, the shoots are separated and the subjects are each placed in a container containing a solid medium, with such containers being placed in trays or on shelves. There are several specific types of containers for the rooting of clonal seedlings such as the types cited below.

Planting containers and trays:

Ellepot EP: Degradable plastic tubete produced by the Danish company Ellegaard®, comprising: white polyester or cellulose membrane and holes with cylindrical shape; Capacities: 85 cc and 110 cc; Dimensions: 30 x 100 mm and 40 x 100 mm.

Jiffy Pellet: Biodegradable plastic tubete produced by the Norwegian company Jiffy®, comprising expandable insert with coconut fiber and sphagnum peat, cylindrical; Capacities 85 cc and 100 cc; Dimensions: 30 x 100 mm and 36 x 100 mm.

Care-Free® type Peat Pellet Expandable Wafers: Dimensions: 30x100 and 36x100, a combination of dried and pressed sphagnum peat, perlite and mineral additives, coated with a permeable membrane and biodegradable PLA, produced by the Canadian branch of the Norwegian company Jiffy®.

Air-Tray® tray 117: Intended to serve as a support for the CareFree® Jiffy-Pellets 30x100 mm, with 390 x 590 mm (2,301 cm²), with 117 cells, and with an average area of 19.6 cm²/cell, for a tray with 100% occupancy (treatment T-1).

Air-Tray® tray 64: Intended to serve as a support for the CareFree® Jiffy-Pellets 36x100 mm, with 380 x 380 mm (1,444 cm²), with 64 cells, with an average area of 22.5 cm²/cell for a tray with 100% occupancy (treatment T-2).

After proper allocation of the pellets in the trays, they must be placed with their bottom (base) in contact with a shallow layer of pure water so that the pellets in the trays are not covered (or float) in the water. This is the process of expansion of the pellets, which in this case "rehydrates" them by capillarity. It is important to note, that the base of the pellets should be kept in contact with this layer of water until fully expanded. If the water depth is reduced (due to absorption by the pellets), the water must be replaced. There must be no concern about "excess water." This operation takes only a few minutes. If one wishes to speed up the expansion process, one can make use of heated water of approximately 45°C. In this case, it is essential to carry out the expansion of the pellets some minutes in advance, such that their temperature approaches room temperature, before being taken to receive the microcuttings.

Acclimatization Technique of Micropropagated Eucalyptus Seedlings

In general, in a population of micropropagated eucalyptus plants, it is likely that a small subpopulation will present anatomical, morphological and physiological abnormalities due to

14/27

imbalances of the conditions inside the bioreactor and other flasks in the micropropagation. All these changes are associated with unsuitable conditions for the process of rooting microcuttings and subsequent acclimatization of seedlings, and thus reduce survival rates and the quality of seedlings.

The application of acclimatization techniques aims to provide greater graduation in the transition between the in vitro (bioreactor) and the external (nursery) environment. Among these techniques, we highlight the use of *mist and fog* systems, which help to maintain the plant turgor and decrease evaporative demand. Shading helps to reduce high levels of brightness from the external environment and also helps to reduce the temperature and stress of the plants in acclimation.

Alternatively, other products and protected environments are used in the planting of microcuttings produced in bioreactors. Products used include substrates stabilized by biodegradable polymers for planting in wood fiber containers, and coconut fiber and *Sphagnum* peat. These containers function as pressed pellets and are expandable when hydrated.

Cultivation system with Fog and Cloche

This system generates a mist of extremely small water droplets, with diameters smaller than 15 micrometers, which are nebulized within the cloche environment using specific nozzles or an ultrasonic nebulizer, generating an ultrathin ($< 5 \mu\text{m}$) dry fog. These droplets are so small that they remain suspended in the air until evaporated, contributing to the increase in humidity and temperature reduction and, at the same time, avoiding leaf wetness. These water droplets in suspension are

15/27

able to maintain a very thin film of water vapor on both leaf surfaces, which keeps the seedlings turgid and temperature controlled.

The fog system is used in conjunction with the cloche structure, preferably a structure designed specifically for rooting and acclimatization of eucalyptus. The cloche consists of the assembly of a mini-greenhouse or over-tunnels within a normal greenhouse, kept suspended on rounded tables. During the growth and development of seedlings in the cloche, a sub-surface irrigation system (*floating*) is utilized, which provides temporary immersions of the base of the biodegradable plugs in water or nutrient solution which is used to supply nutrients to the plants without wetting the aerial part of the seedlings.

Microcuttings Transplant Technique in Biodegradable Plugs

The planting system of the microcuttings produced in the bioreactor in biodegradable containers consists of selecting standard microcuttings of satisfactory quality and inserting the base of the microcuttings into bags or previously hydrated pressed pellets (plugs), as described above.

- Jiffy Rehydration and Expansion Stage:

- After placing the pellets in the trays, they must be positioned with their bottom (base) in contact with a shallow layer of pure water at room temperature so that the pellets in the trays are not covered (or float) in the water, until full expansion, before planting the microcuttings.

- Rehydration of the pellets is accomplished only by capillarity and not by their submersion in water. It is important

16/27

to note that the base of the pellets should be kept in contact with the layer of water until they are fully expanded. If the water level is reduced (due to absorption by the pellets), it must be replaced. There must be no concern with regard to excess water. This operation takes only a few minutes.

— If one wishes to speed up the expansion process, one can make use of water heated to about 45°C. In this case, it is essential to perform the pellet expansion a few minutes early, so that their temperature approaches room temperature before being taken to receive the microcuttings during planting.

By way of non-limiting example, some information is provided about the techniques available to perform the planting of the micropiles produced in the bioreactor.

- Technical Specifications of Plugs and Trays (PLA Net = biodegradable corn starch resin)

Product	Objective
Jiffy-7 Care Free Horticulture Peat Plug, 30 x 100 mm, 6 mm indent, PLA net	Planting of microcuttings to produce seedlings for field planting
Jiffy-7 Care Free Horticulture Peat Plug, 30 x 80 mm, 6 mm indent, PLA net	Planting of microcuttings to produce seedlings for field planting
Jiffy-7 Forestry Peat Pellet, 18 x 25 mm, 9 mm indent, PLA net	Direct planting of the microcutting in mini-plug to produce seedlings for planting in clonal garden
Jiffy-7 Forestry Peat Pellet, 18 x 32 mm, 9 mm indent, PLA net	Direct planting of the microcutting in mini-plug to produce seedlings for planting in clonal garden
Jiffy-7 Horticulture Peat Pellet, 36 x 75 mm, TP 40 mm, PLA net	Transplanting of rooted seedling in the 18x25 mini-plug to the 36x75 plug and field planting
Jiffy-7 Horticulture Peat Pellet, 36 x 75 mm, TP 25 mm, PLA net	Transplanting of rooted seedling in the 18x25 mini-plug to the 36x75 plug and field planting

New Mini-18 mm thermo form tray para J7 pellet 18x32; tray size 33 x 45 x 4 cm	Trays for supporting the mini-plugs and seedling growth.
--	--

• Spacing Management of Seedling Trays:

Type of Tubete	Production Phase	Duration (days)	Density (cm ² / shoot)	Capacity (qty / tray)	Capacity (% / tray)
Jiffy 30x100mm	Rooting	10	20	117	100
	Acclimatization	10	39	59	50
	Growth	15	96	24	20
	Harding	15	96	24	20
Jiffy 36x100mm	Rooting	10	23	64	100
	Acclimatization	10	45	32	50
	Growth	15	90	16	20
	Hardening	15	90	16	20

• Irrigation management:

— The application of the depth of irrigation water should be adjusted to achieve the field capacity of each substrate, especially at the stage of rooting (CV) and Acclimation (CA), where the Ellepot and Jiffy must not be saturated with water.

— In the greenhouse, irrigation management should produce an irrigation interval of short duration and intervals between irrigations, for example, 6 seconds duration every 10-15 minutes between irrigations, to increase the level of relative humidity without irrigation of the substrate occurring.

18/27

— In acclimatization, irrigation management should allow complete wetting of the substrate of the Ellepot and Jiffy, without causing excess and saturation of the same. The shading, for example, of the shading screen type, must remain extended only during the hottest hours of the day, for example, from 11am to 2pm.

— To the contrary, in the Stages of Growth (PC) and Rustification (PR), the Ellepot and Jiffy should be almost saturated, due to the need for the greater depth of water to compensate for evaporation losses from the container, root uptake and leaf transpiration.

— Additionally, in the growth and rustification terrace, irrigation of the Ellepot and Jiffy is recommended with an irrigation rod or shower head for uniform wetting of the entire substrate.

- Monitoring of Substrate Humidity:

— During the process of rooting and seedling growth in the Ellepot and Jiffy container, it is necessary to monitor the moisture content of the substrate in order to recommend the irrigation shift (duration and interval) so that substrate moisture remains within the ideal range of field capacity.

— These instant, real-time measurements of substrate moisture must be performed using a portable moisture meter + conductivity + temperature, for example, the Delta-T brand, model WET Sensor. This equipment must be calibrated in the laboratory for the substrate being used in the test.

19/27

— The humidity sensor must be inserted in at least two positions (depths) within the Ellepot and Jiffy, because only the tip of the sensor is able to accurately record the values in the rhizosphere region. In the CV, this position should be shallow (2-3 cm), in the CA this position should be median (3-6 cm) and in the PC position it should be at the bottom (7-9 cm).

— Between one measurement and the other it is necessary to wait for a period of time (10-15 seconds) for sensor stabilization in the moist substrate. In the same Ellepot or Jiffy, the 1st measurement must be processed at a point of lower humidity, and the 2nd measurement at a point of higher humidity.

— We recommend the following ranges of moisture for the substrate used in the test, measured with the wet sensor, as shown below:

Substrate Humidity	Humidity Mecprec (%, v/v)	Humidity Ellepot and Jiffy (%, v/v)	Observation
Saturated	> 40 %	< 50 %	High excess water
Semi-saturated	21 to 40 %	40 to 50 %	Moderate excess water
Adequate	16 to 20 %	25 to 39 %	Ideal moisture condition
Semi-dry	10 to 15 %	15 to 24 %	Moderate water deficiency
Dry	< 10 %	< 15 %	High water deficiency

EXAMPLES

Example 1 - Obtaining eucalyptus clonal seedlings

The process of the invention, applied to obtain eucalyptus clonal seedlings in a bioreactor by temporary immersion technique, comprises the following steps:

Step 1 - Plant material remains at rest during the interval between immersion of the plant in culture media and gas exchange of the atmosphere of the internal compartment of the bioreactor. The medium is stored in the outer container (lower) and the explants in the inner compartment (above). The active photosynthetic radiation bioreactor is made of tubular fixtures with LED lamps in blue, red and white colors.

Step 2 - The solenoid valve is activated by a timer in a range of pre-set time and duration. This allows entry of compressed air into the outer container, increasing pressure in the outer compartment (lower), causing the liquid culture medium to be transferred to the inner chamber (upper) of the plants, via the connection channels between the containers, and comes into contact with the base of the cultures. The management of temporary immersion varies with the type of eucalyptus clone and also with the stage of the culture. In the multiplication phase of shoots, 2-3 hours between temporary immersions and immersions lasting between 1-2 minutes are used. At the stage of shoot elongation, 4-5 hours between temporary immersions and immersions lasting between 20-30 seconds are used.

Step 3 - After the immersion period, the solenoid valve is turned off and the medium returns into the outer housing through the drains by gravity. At this stage, the exchange with the injection of compressed air into the inner container where the plant

material is allocated occurs. This gas exchange (air and carbon dioxide) is actuated by a solenoid valve controlled by a timer.

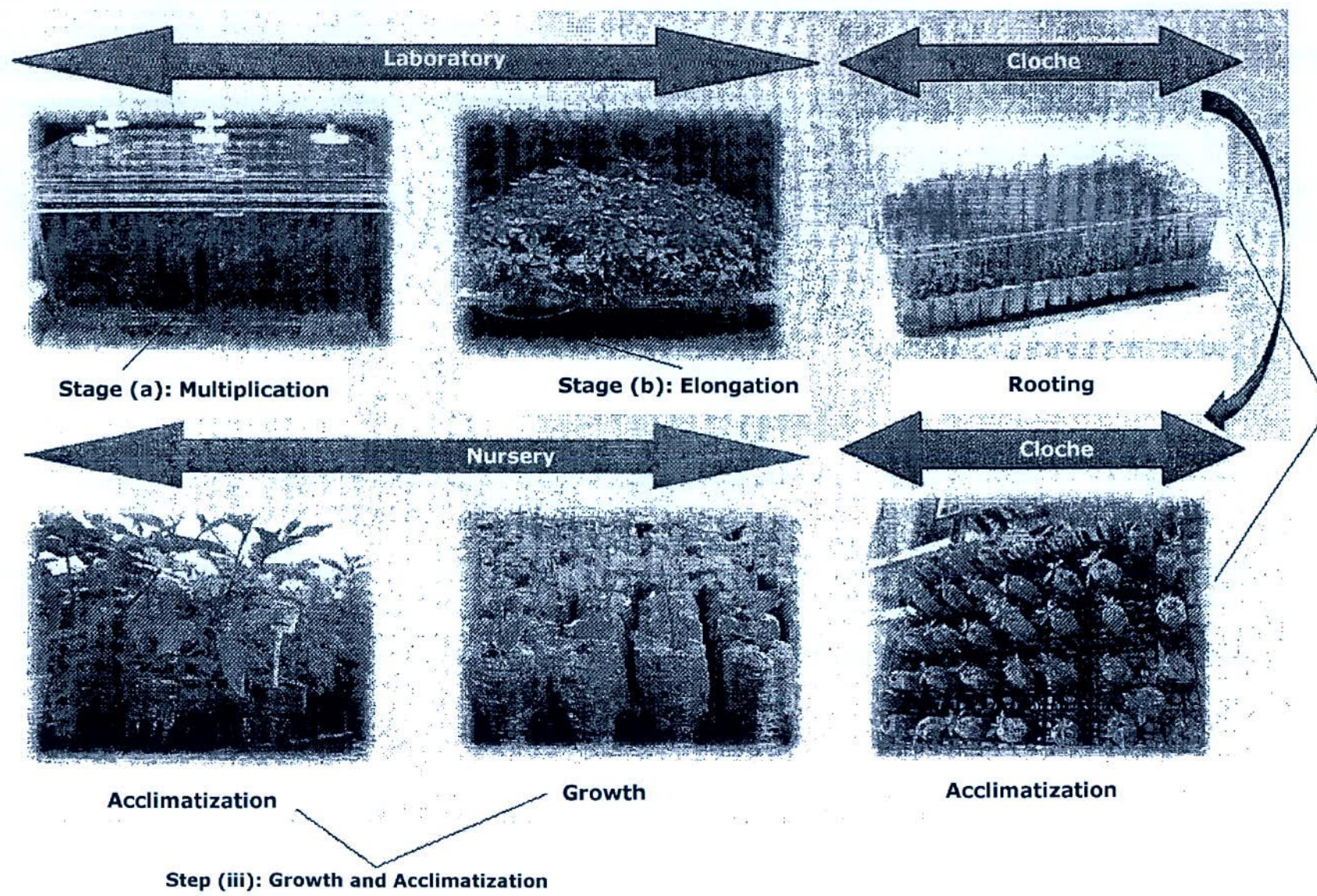
Step 4 - The gas exchange occurs with the injection of specific concentrations of CO₂ in the inner container at a flow rate of 1.3 liters per minute, with a flow of 500 micromole CO₂ per second, in the concentration of 800-1000 micromole CO₂ per mole of air, where the plant material is grown, to increase the photosynthetic and productive capacity of the crops. This gas exchange is also driven by a timer-controlled solenoid valve.

PAR Radiation - throughout the production cycle we use photosynthetically active radiation (PAR), which corresponds to the range from 400 to 700 nm for the growth and development of the crop. In this case, electric lamps with light emitting diodes (LED) are used instead of the traditional fluorescent lamps employed in biofactories. The plants mainly absorb spectra in the red range (600-700 nm) and in the blue (400-500 nm), therefore, the management of illumination is controlled to provide a ratio of 3/1 (red/blue) to 2/1 (red/blue), respectively for multiplication and elongation. The intensity of PAR also varies according to the physiological stage of the culture. Typically, in the multiplication phase 20-30 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ is used, and in the elongation phase 40-60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ is used.

All publications and patent applications mentioned in this specification are indicative of the level of those skilled in the art to which the present utility model refers. All publications and patent applications are incorporated herein by reference to the same extent as if each individual publication or patent

application were each specifically and individually indicated to be incorporated for ease of reference.

While certain embodiments have been described, they are only shown in an exemplary way, with no intention to limit the scope of the present utility model. The accompanying claims and their equivalents in this description are considered to cover such forms or modifications as they may be within the scope and spirit of the present utility model.



Step (ii): rooting and acclimatization

FIGURE 1

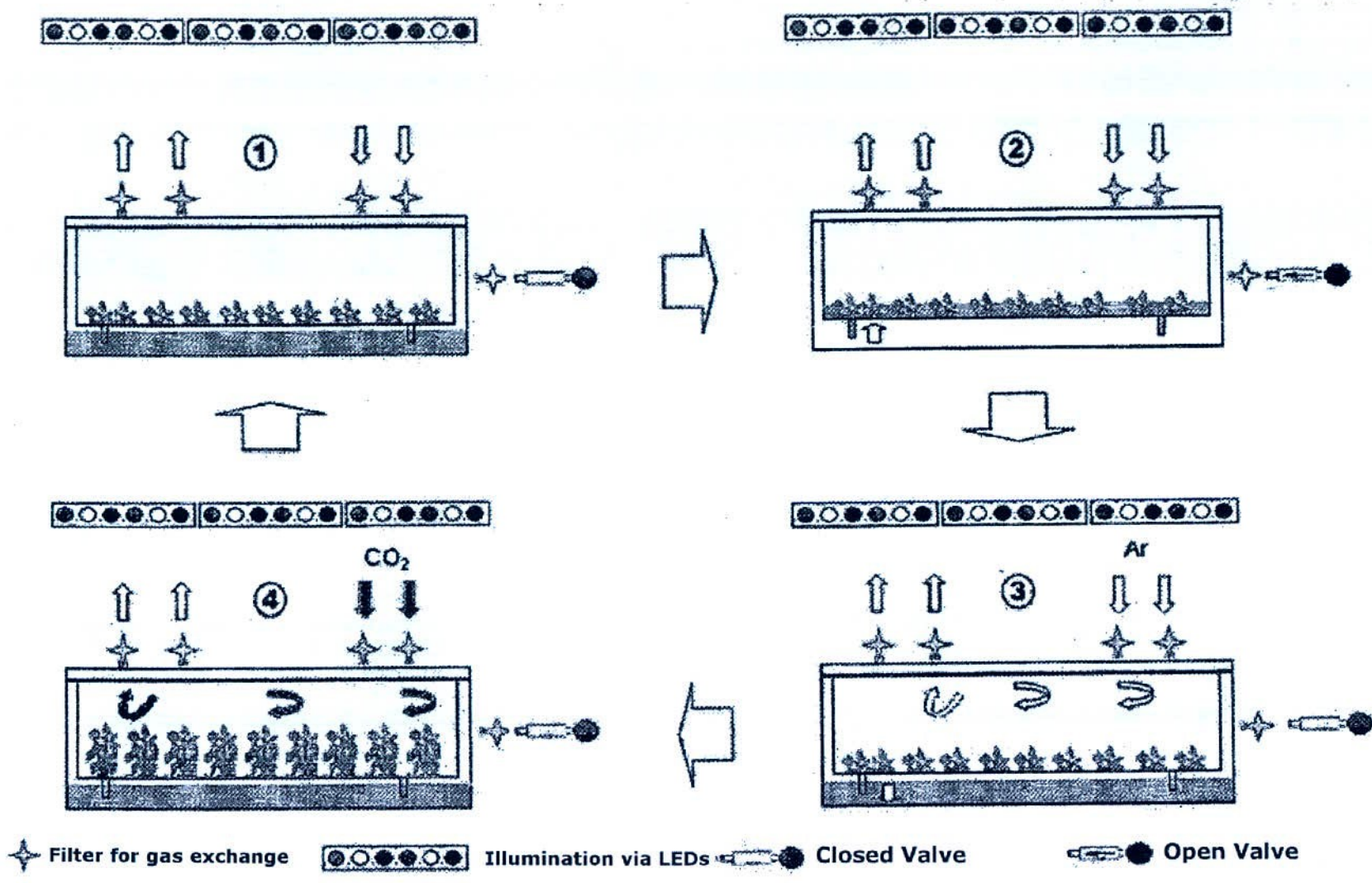


FIGURE 2

57

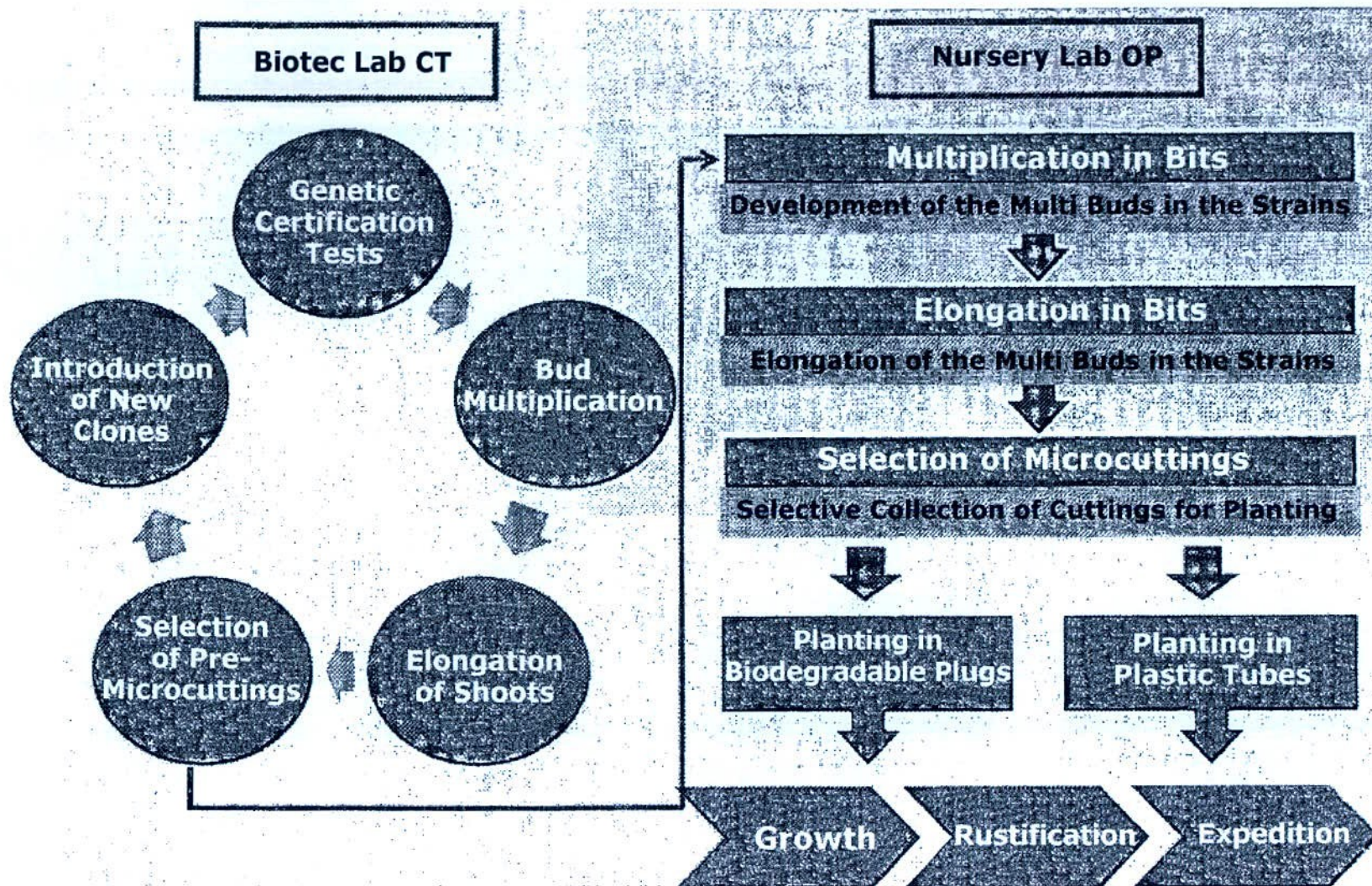


FIGURE 3

ABSTRACT OF THE PATENT INVENTION**"PROCESS FOR *IN VITRO* MICROPROPAGATION OF PLANT MATERIAL AND
PROCESS FOR PRODUCTION, IN LARGE-SCALE AND HIGH VOLUME, OF CLONAL
SEEDLINGS OF PLANTS READY FOR FIELD DEVELOPMENT"**

The present invention relates to a process for *in vitro* micropropagation of plant material comprising the steps of multiplication and elongation of shoots developed from plant propagules. The invention further comprises a process for the production of clonal seedlings plants on a large-scale ready for field development as replacements of traditional clonal gardens by '*in vitro*' biofactories.

CLAIMS

1. Process for in vitro micropropagation of plant material comprising the steps of multiplication and elongation of shoots developed from plant seedlings by the temporary immersion method, comprising:

(a) In the step of multiplication of the shoots, the material to be propagated is spread on a suitable support in a first container (vegetative propagation container) and is subjected to management of temporary immersion in a liquid nutrient medium, from a second container (storage container of liquid medium), said management comprising alternated periods of immersion and rest;

(b) In the step of shoots elongation, the propagation material is subjected to management of temporary immersion, preferably employing the same nutrient medium of step (a), said management comprising of alternated periods of immersion and rest, wherein said method in said step (b) (elongation), said immersion periods are significantly shorter and said rest periods are longer compared with the periods of immersion and rest, respectively, in step (a) (of multiplication).

2. Process according to claim 1, wherein said plant material is an arboreal plant.

3. Process according to claim 2, wherein said arboreal plant is a species of eucalyptus.

4. Process according to claim 1, wherein in step (a), said period of immersion is at least 1 minute and said period of rest is at least 2 hours.

5. Process according to claim 4, wherein said immersion period is a maximum of 3 minutes and said rest period is at most 4 hours.

6. Process according to any one of claims 4 or 5, wherein said immersion period is from 1 to 2 minutes and said rest period is from 2 to 3 hours.

7. Process according to claim 1, wherein in step (b), said immersion period is at least 20 seconds and said rest period is at least 4 hours.

8. Process according to claim 7, wherein said immersion period is a maximum of 60 seconds and said rest period is at most 6 hours

9. Process according to any one of claims 7 or 8, wherein said immersion period is 20 to 30 seconds and said rest period is 4 to 5 hours.

10. Process according to claim 1, wherein the in vitro micropropagation of the plant material is performed in a bioreactor of the BIT type.

11. Process for the production, on a large scale and high volume, of clonal plant seedlings ready for field development, said method comprises the steps of: (i) performing vegetative propagation of plant material by the process as defined in claims 1 to 10; (ii) allows the rooting and acclimatization of the elongated shoots obtained in step (i) in containers suitable for conditions to maintain plant turgor and reduce evaporative demand; and (iii) enable the growth and acclimatization of the microcuttings obtained in step (ii) until the size of the clonal seedlings is appropriate for transfer to the field.

12. Process according to claim 11, wherein **the** step (ii) is carried out in a humid environment, in which the water vapor droplets are so small as to remain suspended in the air until evaporated, while at the same time avoiding leaf wetness.

(12) PEDIDO INTERNACIONAL PUBLICADO SOB O TRATADO DE COOPERAÇÃO EM MATÉRIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organização Mundial da Propriedade Intelectual
Secretaria Internacional



(10) Número de Publicação Internacional
WO 2015/061871 A1

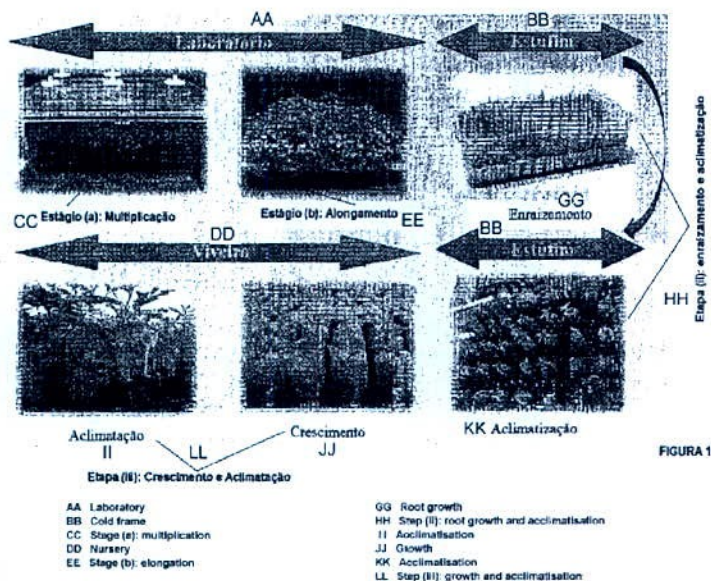
(43) Data de Publicação Internacional
7 de Maio de 2015 (07.05.2015) **WIPO | PCT**

- (51) Classificação Internacional de Patentes :
A01H 4/00 (2006.01) A01G 7/06 (2006.01)
C12M 3/00 (2006.01)
- (21) Número do Pedido Internacional :
PCT/BR2014/000391
- (22) Data do Depósito Internacional :
30 de Outubro de 2014 (30.10.2014)
- (25) Língua de Depósito Internacional :
Português
- (26) Língua de Publicação :
Português
- (30) Dados Relativos à Prioridade :
61/897,680
30 de Outubro de 2013 (30.10.2013) US
- (71) Requerente : FIBRIA CELULOSE S.A [BR/BR];
Alameda Santos, 1.357 - 6º andar, Cerqueira César, CEP:
1419-001 São Paulo - SP (BR).
- (72) Inventores : PENCHEL, Ricardo Miguel; Alberto Aguiar
Weisssohn 337, Casa 4, Centro, Guararema, CEP: 08900-
000 São Paulo - SP (BR). REIS, Jocemar Palauro dos;
Rua Rio Santa Maria, 63, Bairro de Fátima, CEP: 29192-
204 Aracruz - ES (BR). OLIVEIRA, Mila Liparize de;
Avenida Nove de Julho, 579 - Apto 36, Vila Adyana, CEP:
12243-000 São José dos Campos - SP (BR).
- (74) Mandatário : WEGMANN, Ana Cristina Almeida
Müller; Avenida Almirante Barroso, 52 - 33º, Andar,
Centro, CEP: 20031-000 Rio de Janeiro - RJ (BR).
- (81) Estados Designados (sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção nacional existentes) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Estados Designados (sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção regional existentes) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiático (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), Europeu (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(Continua na página seguinte)

(54) Title : METHOD FOR THE *IN VITRO* MICROPROPAGATION OF PLANT MATERIAL AND METHOD FOR LARGE-SCALE AND LARGE-VOLUME PRODUCTION OF CLONED PLANT SEEDLINGS READY FOR FIELD GROWTH

(54) Título : PROCESSO PARA MICROPROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE MATERIAL DE PLANTA E PROCESSO PARA A PRODUÇÃO, EM LARGA ESCALA E ALTO VOLUME, DE MUDAS CLONAIS DE PLANTAS PRONTAS PARA O DESENVOLVIMENTO EM CAMPO



(57) Abstract : The present invention relates to a method for the *in vitro* micropropagation of plant material, comprising steps of multiplication and elongation of shoots obtained from plant propagules. The invention further includes a method for the large-scale production of cloned plant seedlings ready for field growth, to replace the conventional *in vitro* clone gardens in biofactories.

(57) Resumo :

(Continua na página seguinte)

WO 2015/061871 A1**Publicado:**

— com relatório de pesquisa internacional (Art. 21(3))

A presente invenção se refere a um processo para micropropagação *in vitro* de material de planta compreendendo as etapas de multiplicação e alongamento dos brotos desenvolvidos a partir de propágulos de planta. A invenção compreende, ainda, um processo para a produção de mudas clonais de plantas em larga escala prontas para o desenvolvimento em campo, como substituição dos jardins clonais tradicionais por biofábricas 'in vitro'.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção
"PROCESSO PARA MICROPROPAGAÇÃO IN VITRO DE MATERIAL DE
PLANTA E PROCESSO PARA A PRODUÇÃO, EM LARGA ESCALA E ALTO
VOLUME, DE MUDAS CLONAIIS DE PLANTAS PRONTAS PARA O
DESENVOLVIMENTO EM CAMPO"

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção se refere a um processo de produção de mudas clonais de espécies arbóreas, especialmente eucalipto, em larga escala e alto volume, segundo o qual a etapa de propagação vegetativa, realizada in vitro, ocorre em condições tais que é maximizada a obtenção de microestacas sadias e vigorosas da espécie arbórea enquanto é minimizada a taxa de hiper-hidricidade na fase de micropropagação em regime de imersão temporária.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

A micropropagação consiste em uma técnica de cultura de tecidos vegetais que é utilizada como base para formação de mudas, sendo um método prático, rápido e seguro de propagação massal de plantas em espaço reduzido. Convencionalmente, a micropropagação é realizada via sistema semissólido, normalmente em meio gelificante com ágar. Contudo, esta ainda é uma prática onerosa, abrindo espaço para o uso de equipamentos e novas tecnologias, que auxiliam na produção de plantas em larga escala operacional, com redução dos altos custos de mão de obra, em equipamentos chamados biorreatores.

Os biorreatores são equipamentos para o cultivo de propágulos em regime de imersão temporária ou permanente para obtenção de plantas. O biorreator consiste em um conjunto de recipientes contendo compartimentos e acessórios para manejo ótimo dos principais fatores de crescimento visando maximizar as reações biológicas. Por meio destes equipamentos é possível obter maiores taxas de multiplicação da cultura pelo uso de meio nutriente líquido, injeção e trocas de gases, por exemplo, de ar enriquecido com gás carbônico, dentro do recipiente, assim como de melhor controle fisiológico das condições de cultivo e automatização do processo. Vários são os modelos de biorreatores, podendo variar em função dos recipientes de cultivo e do meio de cultura, do tipo de imersão (temporária ou permanente) e de sua funcionalidade. Os sistemas de imersão temporária que são mais conhecidos no Brasil são RITA® (recipiente de imersão temporária automatizada - por exemplo, o empregado no CIRAD-França) e BIT® (biorreator de imersão temporária - por exemplo, aquele criado na Embrapa-Cenargen).

Devido ao potencial da técnica de micropropagação, há crescente interesse nessa tecnologia como demonstra o estado da técnica. Por exemplo, no documento WO 2012/061950 é descrito um método e biorreator para micropropagação de uma espécie vegetal antártica, em que o método é caracterizado pela utilização de condições e meio nutriente apropriados para o desenvolvimento da dita espécie vegetal e, adicionalmente, é empregado um protocolo de fornecimento

de radiação UV e controle de temperatura para a produção de metabólitos valiosos para emprego medicinal e cosmético.

No documento WO 2012/156440 é descrito um sistema de imersão temporária e método de micropropagação de espécies
5 vegetais caracterizados pelo provimento de condições adequadas ao desenvolvimento do propágulo, tal como iluminação, temperatura e regime de imersão com intervalos variando de 1 até 10 vezes ao dia e com tempo de imersão de 1 a 2 minutos, ou de 3 a 4 minutos, dependendo da espécie
10 vegetal em desenvolvimento.

Watt (ver Watt, M.P. "The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation". African Journal of Biotechnology, Vo. 11(76), pp. 14025-14035, 20/09/2012) fez uma retrospectiva
15 das técnicas de micropropagação de plantas, particularmente com relação às propostas para reduzir a hiper-hidricidade, mencionando como principais fatores, o encurtamento do tempo de imersão e o aumento do período de descanso (tempo entre duas imersões sucessivas).

20 González (ver González, R. e colaboradores. "Multiplicación in vitro de Eucalyptus globulus mediante sistema de inmersión temporal". Bosque 32(2): 147-154, 2011) relata os fatores que afetam o estágio de multiplicação in vitro de Eucalyptus globulus por imersão
25 temporária e conclui que a taxa de multiplicação de microestacas dessa espécie arbórea aumenta significativamente quando se emprega um tempo de imersão de 1-2 minutos e uma frequência de imersão (período de descanso) de 12 horas. Esses autores também concluíram que

a hiper-hidricidade aumenta com a concentração de macronutrientes e sacarose.

Oliveira (ver Oliveira M.L. de, "Micropropagação de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* em biorreatores de imersão temporária". Dissertação de Tese de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa. 2011) relata o estudo de micropropagação *in vitro* de duas espécies de eucalipto, concluindo que há ocorrência de elevado percentual de hiper-hidricidade no desenvolvimento dos propágulos quando é empregada a técnica de imersão temporária. A autora também conclui que "há necessidade de ajuste no manejo da cultura nas fases de multiplicação e alongamento para a obtenção de brotos com maior vigor, aptos a enraizar em condições *ex vitro* para tornar tal técnica viável em larga escala".

O estado da técnica acima mencionado mostra que apesar de ter havido grande avanço na técnica de micropropagação *in vitro* de plantas, ainda resta resolver o problema da hiper-hidricidade e, ao mesmo tempo, empregar condições adequadas à obtenção de mudas clonais de plantas, em particular de espécies arbóreas e mais particularmente da espécie eucalipto, para possibilitar a produção de ditas mudas clonais em larga escala e grande volume e alcançar a produção comercial de mudas sadias e viçosas.

25

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se à obtenção de mudas clonais de plantas, em particular de espécies arbóreas, e particularmente espécies de eucalipto, empregando a técnica

de micropropagação *in vitro* de material vegetal, incluindo as etapas de multiplicação, alongamento, enraizamento, aclimatização, crescimento e aclimatação das mudas prontas para comercialização.

5 Em uma primeira concretização, a presente invenção diz respeito a um processo para micropropagação *in vitro* de material de planta, especialmente de planta arbórea, particularmente de uma espécie de eucalipto, compreendendo as etapas de multiplicação e alongamento dos brotos
10 desenvolvidos a partir de propágulos de planta pelo método de imersão temporária, sendo que: (a) na etapa de multiplicação dos brotos, o material a ser propagado é colocado sobre suporte adequado em um primeiro recipiente (recipiente de propagação vegetativa) e é submetido a
15 manejo de imersão temporária em meio nutriente líquido, proveniente de um segundo recipiente (recipiente de armazenamento do meio líquido), dito manejo compreendendo períodos alternados de imersão e de descanso, o período de imersão sendo preferivelmente por pelo menos 1 minuto,
20 preferivelmente por no máximo 3 minutos, mais preferivelmente por 1 a 2 minutos, e o período de descanso sendo preferivelmente por pelo menos 2 horas, preferivelmente por no máximo 4 horas, mais preferivelmente por 2 a 3 horas; (b) na etapa de alongamento dos brotos, o
25 material em propagação é submetido a manejo de imersão temporária, preferivelmente empregando o mesmo meio nutriente da etapa (a), dito manejo compreendendo períodos alternados de imersão e de descanso, o período de imersão sendo preferivelmente por pelo menos 20 segundos,

preferivelmente por no máximo 60 segundos, mais preferivelmente por 20 a 30 segundos, e o período de descanso sendo preferivelmente por pelo menos 4 horas, preferivelmente por no máximo 6 horas, mais preferivelmente por 4 a 5 horas; dito processo sendo caracterizado pelo fato de que, na dita etapa de alongamento, os ditos períodos de imersão são significativamente mais curtos e os ditos períodos de descanso são mais longos em comparação com os períodos de imersão e de descanso, respectivamente, na etapa de multiplicação.

Em uma segunda concretização, a invenção diz respeito a um processo para a produção de mudas clonais de plantas prontas para o desenvolvimento em campo compreendendo as etapas de: (i) submeter propágulos de planta a condições de propagação vegetativa *in vitro* por imersão temporária compreendendo os estágios de: (a) multiplicação dos brotos em que o material a ser propagado é colocado sobre suporte adequado em um primeiro recipiente (recipiente de micropropagação) e submeter o dito material a manejo de imersão temporária em meio nutriente líquido, proveniente de um segundo recipiente (recipiente de armazenamento do meio líquido), dito manejo compreendendo períodos alternados de imersão e de descanso, o período de imersão sendo preferivelmente por pelo menos 1 minuto, preferivelmente por no máximo 3 minutos, mais preferivelmente por 1 a 2 minutos, e o período de descanso sendo preferivelmente por pelo menos 2 horas, preferivelmente por no máximo 4 horas, mais preferivelmente por 2 a 3 horas; (b) alongamento dos brotos em que o

material em propagação é submetido a manejo de imersão temporária, preferivelmente empregando o mesmo meio nutriente do estágio (a), dito manejo compreendendo períodos alternados de imersão e de descanso, o período de
5 imersão sendo preferivelmente por pelo menos 20 segundos, preferivelmente por no máximo 60 segundos, mais preferivelmente por 20 a 30 segundos, e o período de descanso sendo preferivelmente por pelo menos 4 horas, preferivelmente por no máximo 6 horas, mais preferivelmente
10 por 4 a 5 horas; (ii) enraizamento e aclimatização das multibrotações obtidas na etapa (i) em recipientes e condições apropriadas para manter o turgor vegetal e diminuir a demanda evaporativa; e (iii) crescimento e aclimação das microestacas obtidas na etapa (ii).

15

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 ilustra o processo da presente invenção mostrando o material micropropagado/microestacas em cada etapa.

20 A Figura 2 mostra a etapa de micropropagação *in vitro* em regime de imersão temporária em meio nutriente líquido.

A Figura 3 mostra as etapas de desenvolvimento de mudas clonais em larga escala e alto volume, desde a seleção do clone adequado até a introdução no mercado.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

25

O sistema de produção de microestacas clonais de espécies arbóreas, por exemplo, eucalipto, em alta escala e alta produtividade em biorreatores de imersão temporária

tem como principal objetivo a substituição gradativa dos tradicionais jardins clonais dos viveiros florestais operacionais por biofábricas de plantas, visando à produção industrial de microestacas, para subsequente enraizamento e
5 aclimatização em casas de vegetação específicas (estufins).

Em biorreatores é possível a obtenção de maiores taxas de multiplicação e crescimento da cultura pelo uso contínuo de meio nutriente líquido, suplementado com injeção de ar e enriquecimento com gás carbônico e radiação
10 fotossinteticamente ativa com lâmpadas de diodos-LEDs dentro do recipiente das plantas. Desta forma, o manejo de produção de brotos e fitomassa é otimizado ao máximo via manipulação automatizada dos principais fatores de crescimento, permitindo melhor controle fisiológico das
15 condições de cultivo.

O que tem sido buscado nesta técnica é a minimização da hiper-hidricidade, que causa distúrbios e degenerações às mudas clonais obtidas pelo método de imersão temporária e, ao mesmo tempo, mantendo as vantagens desta técnica em
20 termos de custos de produção e de saúde/vigor das mudas produzidas. Esse desafio foi enfrentado pelos inventores desta invenção que criaram um método no qual os períodos alternados de imersão e de descanso do material em propagação vegetativa são diferenciados nos estágios de
25 multiplicação e de alongamento dos brotos. Esse procedimento tornou possível minimizar a hiper-hidricidade e maximizar a produção de mudas clonais de plantas, particularmente de espécies arbóreas, e mais preferencialmente de espécies de eucalipto. Na Figura 1,

esses dois estágios são representados como atividades realizadas no laboratório, sendo que a micropropagação, ou seja, a etapa incluindo os estágios de multiplicação e alongamento, em geral, leva um tempo de cerca 45 dias.

5 O processo da presente invenção foi customizado para atender as demandas fisiológicas para a propagação vegetativa de espécies arbóreas, especialmente o eucalipto, permitindo o desenvolvimento intensivo e de precisão de plantas, diferenciado para resultar em melhor padrão de
10 qualidade, uniformidade e vigor de brotos produzidos, proporcionando maior enraizamento de microestacas e subsequente melhor aclimatização e precocidade de produção de mudas clonais para uso industrial em larga-escala.

O processo da presente invenção possibilita obter
15 produtividade no mínimo 30 vezes superior ao sistema tradicional de produção de mudas dos viveiros comerciais, além de proporcionar redução em 33% no tempo do ciclo de produção de uma muda clonal. Adicionalmente, a implantação operacional do processo da invenção em viveiros permite
20 redução de mão de obra e redução no custo de construção civil dos jardins clonais.

O processo da invenção permite resolver, entre outros, os seguintes problemas:

— Produção de mudas clonais em larga escala e alto volume,
25 com uniformidade e qualidade, para máxima eficiência e produtividade da propagação vegetativa de plantas arbóreas, por exemplo, eucalipto, com ciclos de produção e custos operacionais mais reduzidos.

- Redução de distúrbios e anomalias fisiológicas relacionadas à hiper-hidricidade dos explantes, fenômeno comumente conhecido como vitrificação das plantas. O manejo de trocas gasosas é um dos diferenciais do processo da invenção, que preferencialmente é realizado em biorreator do tipo BIT, mas que pode ser realizado em outro tipo de biorreator, tal como o RITA, e que praticamente elimina estes problemas biológicos.
- Redução do custo de produção de mudas clonais de eucalipto associado à redução da mão de obra envolvida em jardins clonais no processo operacional.
- Uniformização do padrão de qualidade fisiológica das plantas matrizes e de microestacas na propagação vegetativa, realizada em biorreator de imersão temporária, contrasta com a falta de uniformidade das plantas e miniestacas obtidas em plantas cultivadas nos jardins clonais, onde as condições ambientais não são uniformes.
- Dificuldades de propagação vegetativa de espécies e clones de espécies arbóreas, incluindo eucalipto, recalcitrantes são contornados com a propagação vegetativa *in vitro* em biorreatores, permitindo a utilização de clones novos e mais produtivos que não seriam produzidos pelas vias convencionais.
- Limpeza clonal, por meio da obtenção de plantas matrizes e culturas livres de microrganismos fitopatogênicos e, também, culturas de alta fidelidade genética de único clone sem misturas de outros clones.

— Aceleração dos programas de melhoramento pela multiplicação de clones superiores, visando produzir mudas em menor tempo e maior quantidade em espaço reduzido, além do rejuvenescimento de clones e matrizes selecionados.

É importante observar que a utilização dos brotos (ou produtos da micropropagação) obtidos de acordo com o processo da invenção, para plantio direto em recipientes específicos (que podem ser tubetes, plugs, bandejas de isopor ou outro tipo), substitui o fornecimento, ao mercado, de brotos dos conhecidos jardins clonais (ou mini-jardins clonais ou micro-jardins clonais). Este é um grande diferencial da técnica de micropropagação empregada no processo da presente invenção e que faz com a produção de eucaliptos apresente um rendimento em termos de quantidade e qualidade incomparável com a técnica utilizada nos jardins clonais.

Descrição dos Meios Nutritivos para Cultura em Biorreator de Acordo com a Invenção

Durante todo o processo de crescimento e desenvolvimento das plantas no biorreator, podem ser utilizados dois meios básicos de cultura, conforme quadro a seguir. Estes meios são modificados quimicamente de acordo com a presente invenção para atender clones específicos, conforme a necessidade e fase fisiológica da cultura. Os meios são suplementados com fitorreguladores do crescimento, visando promover a multiplicação de gemas,

alongamento dos brotos e pré-indução do enraizamento ex vitro das microestacas.

Os tipos de concentrações dos fitoreguladores, assim como seu manejo de utilização no processo do biorreator são os aqueles comumente empregados na técnica, com a devida adaptação para o cultivo da espécie que se deseja propagar, incluindo preferencialmente a espécie arbórea e mais preferencialmente o eucalipto.

Quadro 1: Meio nutriente líquido do tipo JADS (ver Correia, D. 1993. "Crescimento e desenvolvimento de gemas na multiplicação de Eucalyptus in vitro em meio de cultura líquido e sólido". Dissertação de Mestrado em Ciências Florestais, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba)

JADS			
Tipo	Reagente	Formulação	Concentração (mg/L)
Inorgânicos	Nitrato de amônio	NH_4NO_3	1650
	Nitrato de potássio	KNO_3	809
	Fosfato de potássio monobásico	KH_2PO_4	408
	Sulfato de magnésio heptahidratado	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	739,6
	Nitrato de cálcio tetra hidratado	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1181
	Sulfato ferroso heptahidratado	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	55,6
	EDTA dissódico	Na_2EDTA	74,6
	Sulfato de manganês hidratado	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	17
	Sulfato de zinco heptahidratado	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4,32
	Molibdato dihidratado	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,15
	Sulfato cúprico pentahidratado	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,25
	Cloreto de cobalto hexahidratado	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,25
	Ácido bórico	H_3BO_3	3,1
Orgânicos	Ácido nicotínico		0,5
	Piridoxina		0,5
	Tiamina		5
	Meso Inositol		100
	Glutamina		146
	Arginina		7
	Cisteína		5
	Pantotenato de Cálcio		2,4

Quadro 2: Meio nutriente líquido do tipo MS (ver Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised médium for rapid growth and bioassay with tabacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15:473-497

MS			
Tipo	Reagente	Formulação	Concentração (mg/L)
Inorgânicos	Nitrato de amônio	NH ₄ NO ₃	1650
	Nitrato de potássio	KNO ₃	1900
	Fosfato de potássio monobásico	KH ₂ PO ₄	170
	Ácido bórico	H ₃ BO ₃	6,2
	Molibdato dihidratado	Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,25
	Cloreto de Cálcio dihidratado	CaCl ₂ . 2H ₂ O	440
	Cloreto de cobalto hexahidratado	CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,025
	Sulfato de magnésio heptahidratado	MgSO ₄ . 7H ₂ O	370
	Sulfato de manganês hidratado	MnSO ₄ . H ₂ O	16,9
	Sulfato de zinco heptahidratado	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	8,6
	Sulfato cúprico pentahidratado	CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,025
	Sulfato ferroso heptahidratado	FeSO ₄ . 7H ₂ O	27,85
	EDTA dissódico	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,3
Orgânicos	Myo Inositol		100
	Thiamina HCl		10
	Ácido Nicotínico		0,5
	Piridoxina HCl		0,5
	L-Glutamina		100

5 Plantio de Microestacas em Plugs Biodegradáveis

Como mostrado na Figura 1, os brotos alongados são transferidos do laboratório para um ambiente controlado, conhecido pela denominação de Estufim, onde serão realizados os estágios de Enraizamento e Aclimatização.

10 Para isso, os brotos são separados e os indivíduos são colocados, cada um, em recipiente contendo meio sólido, sendo esses recipientes colocados em bandejas ou prateleiras. São diversos os tipos de recipientes específicos para o enraizamento de mudas clonais podendo
15 ser citados os tipos abaixo.

Recipientes e Bandejas de Plantio:

Ellepot EP: Tubete degradável produzido pela empresa dinamarquesa Ellegaard®, compreendendo: membrana branca de celulose ou poliéster e furos, tendo forma cilíndrica; Capacidades: 85 cm³ e 110 cm³; Dimensões: 30 x 100 mm e 40 x 100 mm.

Jiffy Pellet: Tubete biodegradável produzido pela empresa norueguesa Jiffy®, compreendendo pastilha expansível com fibra de coco e turfa de sphagnum, de forma cilíndrica; Capacidades 85 cm³ e 100 cm³; Dimensões: 30 x 100 mm e 36 x 100 mm.

Pastilhas Expansíveis tipo Care-Free® Peat Pellet:

Dimensões: 30x100 e 36x100, de uma combinação de Turfa de Sphagnum desidratada e prensada, Perlita e Aditivos Minerais, revestidos por uma membrana permeável e Biodegradável de PLA, produzidos pela filial canadense da empresa norueguesa Jiffy®.

Bandeja Air-Tray®117: destinada a servir de suporte dos Jiffy-Pellets CareFree® 30x100 mm, com 390 x 590 mm (2.301 cm²), com 117 células, e com área média de 19,6 cm²/célula, para a bandeja com 100% de ocupação (tratamento T-1).

Bandeja Air-Tray®64: destinada a servir de suporte dos Jiffy-Pellets CareFree® 36x100 mm, com 380 x 380 mm (1.444 cm²), com 64 células, e com área média de 22,5 cm²/célula, para a bandeja com 100% de ocupação (tratamento T-2).

Após a devida alocação dos pellets nas bandejas, estas devem ser colocadas com sua parte inferior (base) em

contato com uma lâmina rasa de água pura, de modo a que os pellets dentro das bandejas não sejam encobertos (ou flutuem) na água. Este é o processo de expansão dos pellets, que neste caso se "reidratam" por capilaridade. É importante ressaltar que a base dos pellets deve ser mantida em contato com esta lâmina de água, até total expansão dos mesmos. Caso a lâmina de água se reduza (devido à absorção pelos pellets), ela deve ser repostada. Não deve haver preocupação com "excesso de água". Esta operação dura poucos minutos. Caso se queira acelerar o processo de expansão, pode-se lançar mão de água aquecida a aproximadamente 45°C. Neste caso, é essencial efetuar a expansão dos pellets com alguns minutos de antecedência, de modo que a sua temperatura se aproxime da temperatura ambiente, antes de serem levados para receber as microestacas.

Técnica de Aclimatização de Plântulas de Eucalipto Micropropagadas

Em geral, em uma população de plantas micropropagadas de eucalipto, é provável que uma pequena subpopulação apresente anormalidades anatômicas, morfológicas e fisiológicas, em função de desequilíbrios das condições no interior dos biorreatores e outros frascos na micropropagação. Todas estas alterações associadas a condições não adequadas para os processos de enraizamento das microestacas e subsequente aclimatização das plântulas, consequentemente, reduzem as taxas de sobrevivência e qualidade das mudas.

A aplicação de técnicas de aclimatização visa proporcionar maior graduação na transição entre o ambiente *in vitro* (biorreator) e o externo (viveiro). Dentre estas técnicas, destacam-se a utilização dos sistemas de *mist* e
5 *fog*, que contribuem para manter o turgor vegetal e diminuir a demanda evaporativa. O sombreamento auxilia na redução dos elevados níveis de luminosidade do ambiente externo e, também, contribui para reduzir a temperatura e o estresse das plantas em aclimatização.

10 Alternativamente, outros produtos e ambientes protegidos são utilizados no plantio das microestacas produzidas em biorreatores. Dentre os produtos, são utilizados substratos estabilizados por polímeros para plantio em recipientes biodegradáveis de fibra de madeira,
15 fibra de coco e turfa de *Sphagnum*. Estes recipientes funcionam como pastilhas prensadas e expansíveis quando hidratadas.

Sistema de cultivo com fog em estufim

Este sistema utiliza a geração de uma névoa de
20 gotículas de água extremamente pequenas, com diâmetro igual ou menor que 15 μm , que são nebulizadas dentro do ambiente do estufim através de bicos específicos ou nebulizador ultrassônico, que gera um *fog* ultrafino ($< 5 \mu\text{m}$) e seco. Estas gotículas são tão pequenas que permanecem em
25 suspensão no ar até evaporar, contribuindo para o aumento da umidade e redução da temperatura e, ao mesmo tempo, evitando o molhamento foliar. Estas gotículas de água em suspensão são capazes de manter um finíssimo filme de vapor

d'água em ambas as faces foliares, o que mantém as mudas túrgidas e com temperatura controlada.

O sistema de fog é utilizado em conjunto com a estrutura de estufim, preferencialmente uma estrutura desenvolvida especificamente para o enraizamento e aclimatização do eucalipto. O estufim consiste da montagem de mini-estufa ou sobre-túneis dentro de uma estufa normal, mantidos suspensos em mesas roliças. Durante o crescimento e desenvolvimento das mudas no estufim, é utilizado o sistema de irrigação de sub-superfície (*floating*), que propicia imersões temporárias da base dos *plugs* biodegradáveis em água ou solução nutritiva, visando suprir os nutrientes para plantas sem molhamento da parte aérea das mudas.

15 Técnica de Transplântio de Microestacas em Plugs Biodegradáveis

O sistema de plantio das microestacas produzidas no biorreator em recipientes biodegradáveis consiste em selecionar as microestacas de padrão de qualidade satisfatórias e inserir a base das microestacas em sacolas ou pastilhas prensadas previamente hidratadas (*plugs*), como acima descritas.

- Estágio de Reidratação e Expansão do Jiffy:
 - Após colocação das pastilhas nas bandejas, estas deverão ser posicionadas com sua parte inferior (base) em contato com uma lâmina rasa de água pura, à temperatura ambiente, de modo que os Pellets dentro das bandejas não sejam encobertos (ou flutuem) na

água, até sua total expansão, antes do plantio das microestacas.

— A reidratação das pastilhas é feita apenas por capilaridade e não por submersão das mesmas na água.

5 É importante ressaltar que a base dos Pellets deve ser mantida em contato com a lâmina de água, até a total expansão dos mesmos. Caso a lâmina de água se reduza (devido absorção pelos Pellets), ela deve ser repostas. Não deve haver preocupação com excesso de água. Esta

10 operação dura poucos minutos.

— Caso se queira acelerar o processo de expansão, pode-se lançar mão de água aquecida a aproximadamente 45°C. Neste caso, é essencial efetuar a expansão dos pellets com alguns minutos de antecedência, de modo que sua

15 temperatura se aproxime da temperatura ambiente, antes de serem levados para receber as microestacas durante o plantio.

A título de exemplo não-limitativo, são fornecidas algumas informações sobre as técnicas disponíveis para

20 realização do plantio das microestacas produzidas no biorreator.

- Especificações Técnicas dos Plugs e Bandejas (PLA Net = resina biodegradável de amido de milho)

Produto	Objetivo
Jiffy-7 Care Free Horticulture Peat Plug, 30 x 100 mm, 6 mm indent, PLA net	Plantio direto da microestaca para produção de mudas para plantio no campo
Jiffy-7 Care Free Horticulture Peat Plug, 30 x 80 mm, 6 mm indent, PLA net	Plantio direto da microestaca para produção de mudas para plantio no campo
Jiffy-7 Forestry Peat Pellet, 18 x 25 mm, 9 mm indent, PLA net	Plantio direto da microestaca em mini-plug para produção de mudas para plantio

	em jardim clonal
Jiffy-7 Forestry Peat Pellet, 18 x 32 mm, 9 mm indent, PLA net	Plantio direto da microestaca em mini-plug para produção de mudas para plantio em jardim clonal
Jiffy-7 Horticulture Peat Pellet, 36 x 75 mm, TP 40 mm, PLA net	Transplântio da muda enraizada no mini-plug 18x25 para o plug 36x75 e plantio no campo
Jiffy-7 Horticulture Peat Pellet, 36 x 75 mm, TP 25 mm, PLA net	Transplântio da muda enraizada no mini-plug 18x25 para o plug 36x75 e plantio no campo
New Mini-18 mm thermo form tray para J7 pellet 18x32; tray size 33 x 45 x 4 cm	Bandejas para suporte dos mini-plugs e crescimento das mudas.

• Manejo de Espaçamento de Mudas nas Bandejas:

Tipo de Tubete	Fase da Produção	Duração (dias)	Densidade (cm ² / muda)	Lotação (qtde / bandeja)	Lotação (% / bandeja)
Jiffy 30x100mm	Enraizamento	10	20	117	100
	Aclimação	10	39	59	50
	Crescimento	15	96	24	20
	Rustificação	15	96	24	20
Jiffy 36x100mm	Enraizamento	10	23	64	100
	Aclimação	10	45	32	50
	Crescimento	15	90	16	20
	Rustificação	15	90	16	20

• Manejo de Irrigação:

- A aplicação de lâmina de água de irrigação deverá ser ajustada para atingir a capacidade de campo de cada substrato, principalmente, nas fases de Enraizamento (CV) e Aclimação (CA), onde o Ellepot e Jiffy não devem ficar saturados de água.

- Na casa de vegetação, o manejo da irrigação deve contemplar um turno de rega de curta duração e intervalos entre irrigações, por exemplo, 6 segundos de duração a cada 10 a 15 minutos entre irrigações, visando aumentar o teor da umidade relativa do ar sem que ocorra a irrigação do substrato.
- Na casa de aclimação, o manejo da irrigação deve permitir o completo umedecimento do substrato do Ellepot e Jiffy, sem causar excesso e saturação dos mesmos. O sombreamento, por exemplo, com tela do tipo sombrite, deve permanecer estendido apenas nas horas mais quentes do dia, por exemplo, das 11 às 14 horas.
- Nas fases de Crescimento (PC) e Rustificação (PR), ao contrário, o Ellepot e o Jiffy devem ficar quase que saturados, por haver necessidade de uma lâmina maior de água para compensar perdas por evaporação a partir do recipiente, absorção radicular e transpiração foliar.
- No pátio de crescimento e rustificação, adicionalmente, recomenda-se fazer a irrigação dos Ellepot e Jiffy com barra de irrigação ou chuveiro até o molhamento uniforme de todo o substrato.
- Monitoramento da Umidade do Substrato:
 - Durante os processos de enraizamento e crescimento das mudas no recipiente Ellepot e Jiffy, há necessidade de monitoramento do teor de umidade no substrato, visando recomendar o turno de irrigação

(duração e intervalos) para que a umidade do substrato permaneça dentro da faixa ideal de capacidade de campo.

- Estas medições instantâneas e em tempo real da umidade do substrato devem ser realizadas por meio do medidor portátil de umidade+condutividade+temperatura, por exemplo, o de marca Delta-T, modelo WET Sensor. Este equipamento deve ser previamente calibrado no laboratório para o substrato que está sendo utilizado no teste.
- O sensor de umidade deve ser inserido em pelo menos duas posições (profundidades) dentro do Ellepot e Jiffy, pois apenas a ponta do sensor é capaz de registrar os valores com precisão na região da rizosfera. Na CV, esta posição deve ser superficial (2-3 cm), na CA esta posição deve ser mediana (3-6 cm) e no PC a posição deve ser final (7-9 cm).
- Entre uma medição e outra é necessário aguardar um período de tempo (10-15 segundos) para a estabilização do sensor no substrato úmido. Em um mesmo Ellepot ou Jiffy, deve ser processada a 1ª medição em um ponto de menor umidade, e a 2ª medição em um ponto de maior umidade.
- Recomendam-se as seguintes faixas de umidade para o substrato utilizado no teste, medido com Sensor a Úmido, conforme quadro a seguir:

Umidade substrato	Umidade Mecprec (%, v/v)	Umidade Ellepot e Jiffy (%, v/v)	Observação
Saturado	> 40 %	< 50 %	Excesso elevado água.
Semi-saturado	21 a 40 %	40 a 50 %	Excesso moderado água.
Adequado	16 a 20 %	25 a 39 %	Condição ideal umidade.
Semi-seco	10 a 15 %	15 a 24 %	Deficiência moderada água.
Seco	< 10 %	< 15 %	Deficiência alta água.

EXEMPLOS

Exemplo 1 - Obtenção de mudas clonais de eucalipto

O processo da invenção, aplicado à obtenção de mudas
5 clonais de eucalipto em biorreator pela técnica de imersão
temporária, compreende as seguintes etapas:

Etapa 1 - O material vegetal permanece em repouso durante o
intervalo entre as imersões da cultura vegetal no meio e
trocas gasosas da atmosfera do compartimento interno do
10 biorreator. O meio fica armazenado no recipiente externo
(inferior) e os explantes no compartimento interno
(superior). A radiação fotossintética ativa do biorreator é
feita por meio de luminárias tubulares com lâmpadas Led nas
cores azul, vermelha e branca.

15 **Etapa 2** - A válvula solenóide é acionada por um
temporizador em intervalo de tempo e duração pré-
estabelecidos. Isso permite a entrada de ar comprimido no
recipiente externo, aumentando a pressão no compartimento
externo (inferior), fazendo com o meio de cultura líquido
20 seja transferido até o compartimento interno (superior) das
plantas, passando por canais de ligação entre os
recipientes, e que entre em contato com a base das culturas

vegetais. O manejo de imersão temporária varia conforme o tipo de clone de eucalipto e também com a fase da cultura. Na fase de multiplicação de brotos, utiliza-se 2-3 horas de intervalo entre imersões temporárias e imersões com duração
5 entre 1-2 minutos. Na fase de alongamento de brotos, utiliza-se 4-5 horas de intervalo entre imersões temporárias e imersões com duração entre 20-30 segundos.

Etapa 3 - Após o período de imersão, a válvula solenóide é desativada e o meio retorna para o compartimento externo
10 através dos drenos, pela força da gravidade. Nesta etapa, ocorre a troca com a injeção de ar comprimido no recipiente interno, onde o material vegetal fica alocado. Esta troca gasosa (ar e gás carbônico) é acionada por uma válvula solenóide controlada por temporizador.

Etapa 4 - A troca gasosa acontece com a injeção de
15 concentrações específicas de CO_2 no recipiente interno, com vazão de 1,3 litros por minuto, fluxo de 500 $\mu\text{mol CO}_2$ por segundo, na concentração de 800 a 1.000 $\mu\text{mol CO}_2$ por mol de ar, onde cresce o material vegetal, visando aumentar a
20 capacidade fotossintética e produtiva das culturas. Esta troca gasosa também é acionada por uma válvula solenóide controlada por temporizador.

Radiação RFA - Durante todo o ciclo de produção utiliza-se a radiação fotossinteticamente ativa (RFA), que
25 corresponde ao intervalo de 400 a 700 nm, para o crescimento e desenvolvimento da cultura. Neste caso, utiliza-se luminárias elétricas com diodos emissores de luz (LED), ao invés das tradicionais lâmpadas fluorescentes empregadas nas biofábricas. As plantas absorvem

principalmente os espectros na faixa do vermelho (600-700 nm) e do azul (400-500 nm), portanto, o manejo de iluminação é controlado para fornecer uma relação de 3/1 (vermelho/azul) a 2/1 (vermelho/azul), respectivamente para
5 multiplicação e alongamento. A intensidade de RFA também varia conforme o estágio fisiológico da cultura. Normalmente, na fase de multiplicação utiliza-se 20-30 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ e na fase de alongamento 40-60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$.

Todas as publicações e pedidos de patente mencionados
10 na presente descrição são indicativos do nível daqueles especialistas na técnica ao qual o presente modelo de utilidade se refere. Todas as publicações e pedidos de patente são aqui incorporados a título de referência na mesma extensão como se cada publicação individual ou cada
15 pedido de patente fosse especificamente e individualmente indicado para ser incorporado a título de referência.

Apesar de certas concretizações terem sido descritas, elas foram apresentadas como um modo exemplificativo somente, e não há intenção de limitar o escopo do presente
20 modelo de utilidade. As reivindicações que acompanham esta descrição e suas equivalentes são consideradas como cobrindo tais formas ou modificações na medida em que elas podem estar dentro do escopo e espírito do presente modelo de utilidade.

REIVINDICAÇÃO

1. Processo para micropropagação *in vitro* de material de planta compreendendo as etapas de multiplicação e alongamento dos brotos desenvolvidos a partir de propágulos de planta pelo método de imersão temporária, sendo que:

(a) na etapa de multiplicação dos brotos, o material a ser propagado é colocado sobre suporte adequado em um primeiro recipiente (recipiente de propagação vegetativa) e é submetido a manejo de imersão temporária em meio nutriente líquido, proveniente de um segundo recipiente (recipiente de armazenamento do meio líquido), dito manejo compreendendo períodos alternados de imersão e de descanso;

(b) na etapa de alongamento dos brotos, o material em propagação é submetido a manejo de imersão temporária, preferivelmente empregando o mesmo meio nutriente da etapa (a), dito manejo compreendendo períodos alternados de imersão e de descanso,

dito processo sendo **caracterizado** pelo fato de que, na dita etapa (b) (de alongamento), os ditos períodos de imersão são significativamente mais curtos e os ditos períodos de descanso são mais longos em comparação com os períodos de imersão e de descanso, respectivamente, na etapa (a) (de multiplicação).

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que dito material de planta é de planta arbórea.

3. Processo de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que dita planta arbórea é uma espécie de eucalipto.

4. Processo de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que, na etapa (a), dito período de imersão é de pelo menos 1 minuto e dito período de descanso é de pelo menos 2 horas.

5. Processo de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado** pelo fato de que dito período de imersão é de no máximo 3 minutos e dito período de descanso é de no máximo 4 horas.

6. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 ou 5, **caracterizado** pelo fato de que dito período de imersão é de 1 a 2 minutos e dito período de descanso é de 2 a 3 horas.

7. Processo de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que, na etapa (b), dito período de imersão é de pelo menos 20 segundos e dito período de descanso é de pelo menos 4 horas.

8. Processo de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pelo fato de que dito período de imersão é de no máximo 60 segundos e dito período de descanso é de no máximo 6 horas

9. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 ou 8, **caracterizado** pelo fato de que dito período de imersão é de 20 a 30 segundos e dito período de descanso é de 4 a 5 horas.

10. Processo de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a micropropagação *in vitro* do material de planta é realizado em biorreator do tipo BIT.

11. Processo para a produção, em larga escala e alto volume, de mudas clonais de plantas prontas para o desenvolvimento em campo, dito processo sendo **caracterizado** pelo fato de compreender as etapas de: (i) realizar a propagação vegetativa de material de planta por processo
5 como definido nas reivindicações 1 a 10; (ii) permitir o enraizamento e aclimatização dos brotos alongados obtidos na etapa (i) em recipientes e condições apropriadas para manter o turgor vegetal e diminuir a demanda evaporativa; e
10 (iii) possibilitar o crescimento e aclimação das microestacas obtidas na etapa (ii) até tamanho de mudas clonais adequadas à transferência para o campo.

12. Processo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a etapa (ii) é realizada em
15 ambiente úmido, no qual as gotículas de vapor de água são tão pequenas que permanecem em suspensão no ar até evaporar e simultaneamente é evitado o molhamento foliar.

89

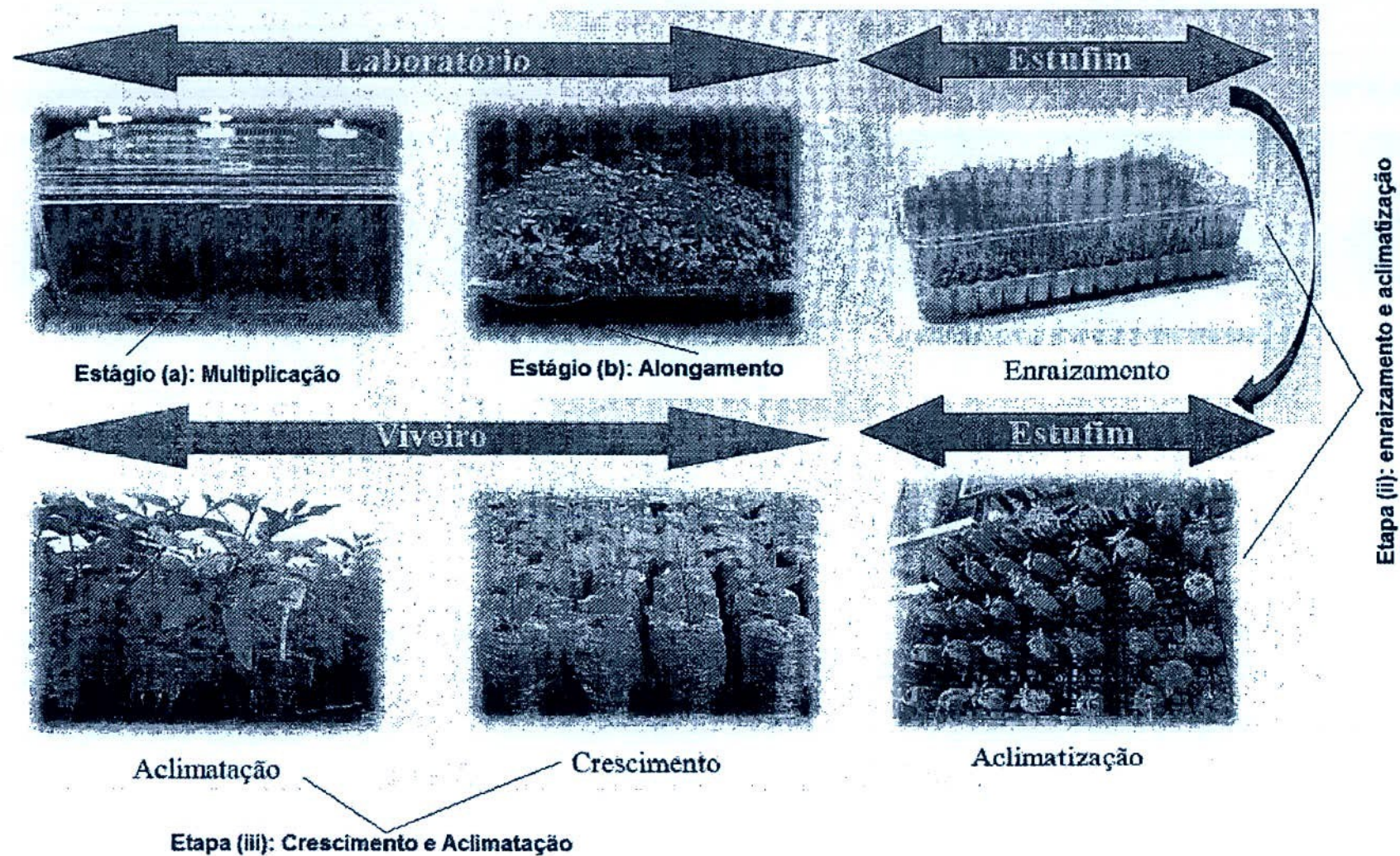


FIGURA 1

89

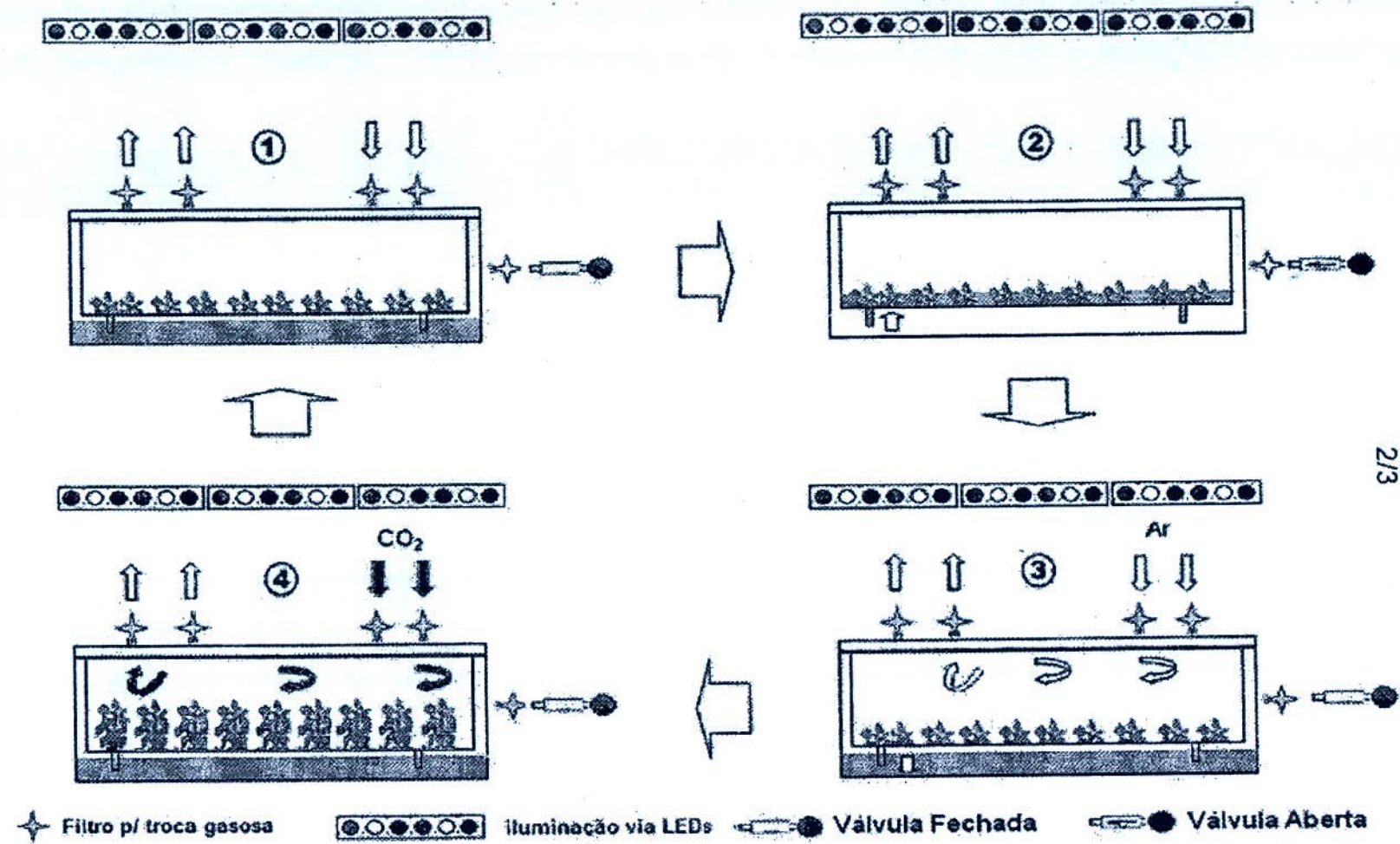


FIGURA 2

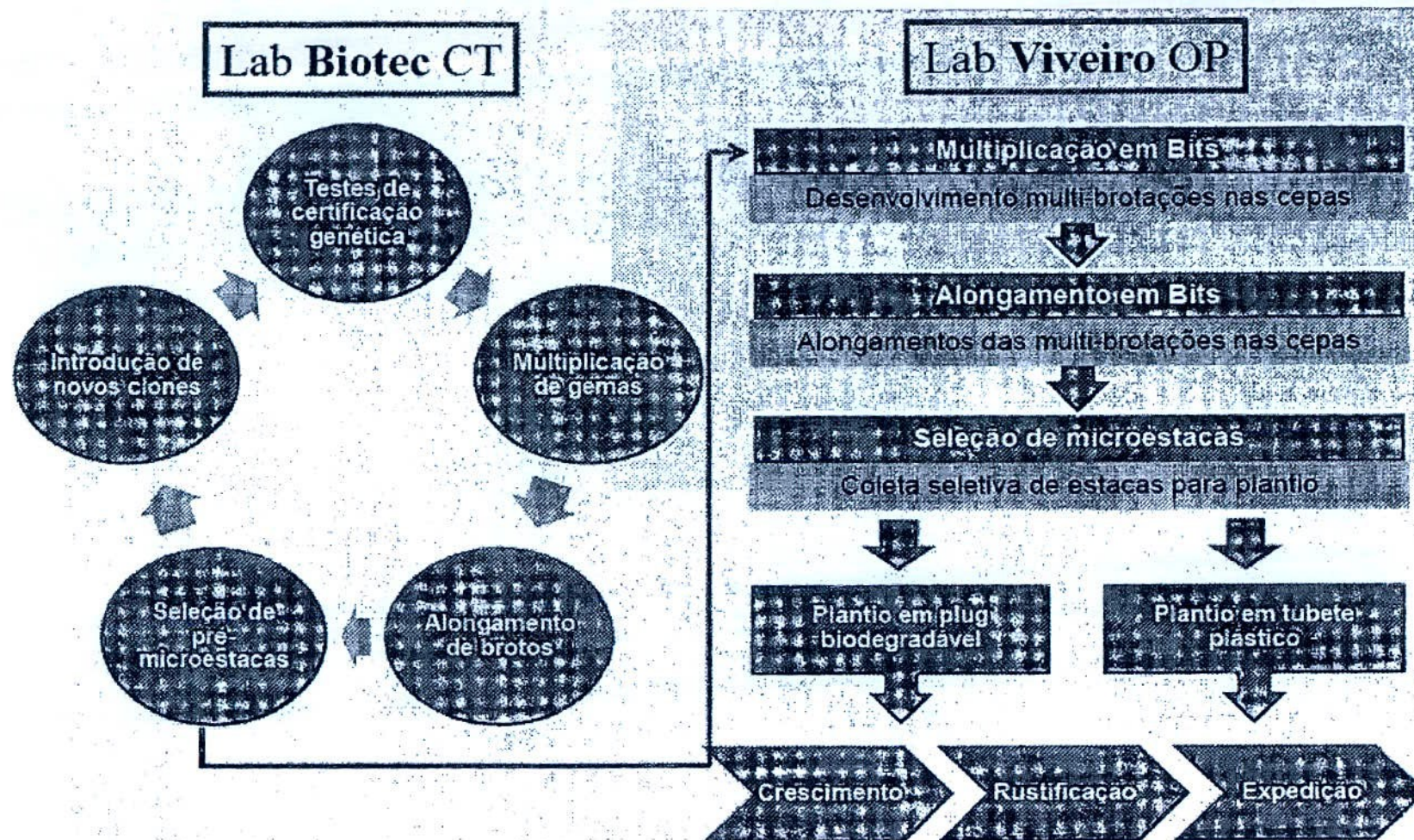


FIGURA 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/BR2014/000391

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A01H4/00 (2006.01), C12M 3/00 (2006.01), A01G 7/06 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC:A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Epodoc, Agricola

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Castro & Gonzáles. <i>Eucalyptus (Eucalyptus grandis Hill ex Maiden) micropropagation in a temporary immersion system</i> . 2002. <i>Agricultura Técnica</i> , v. 2 (1): 68-78. (abstract, figure 1, table 1)	1 a 12
X	Gonzalez et al. <i>Multiplificación in vitro de Eucalyptus globulus mediante sistema de inmersión temporal</i> . <i>Bosque</i> , 2011. v. 32 (2): 147-154. (p. 149, col. 2, chart 4 and pag. 150, col. 2 and p. 151, col. 2)	1 a 12
A	Watt. <i>The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation</i> . <i>African Journal of Biotechnology</i> , 2012. v. 11 (76): 14025-14035.	1 a 12
A	Correia. <i>Micropropagação em biorreatores de imersão temporária e enraizamento de miniestacas e microestacas de clones híbridos de Eucalyptus globulus</i> . Dissertação de Magister Scientia apresentada à Universidade Federal de Viçosa, 2011.	1 a 12

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10/12/2014

Date of mailing of the international search report

07/01/2015

Name and mailing address of the ISA/

INPIINSTITUTO NACIONAL DA
PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Rua Sao Bento nº 1, 17º andar
cep: 20090-010, Centro - Rio de Janeiro/RJ

Facsimile No.

Authorized officer

Erika Tarré Borges Antonelli

Telephone No.

RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL		Depósito internacional Nº PCT/BR2014/000391
A. CLASSIFICAÇÃO DO OBJETO A01H4/00 (2006.01), C12M 3/00 (2006.01), A01G 7/06 (2006.01)		
De acordo com a Classificação Internacional de Patentes (IPC) ou conforme a classificação nacional e IPC		
B. DOMÍNIOS ABRANGIDOS PELA PESQUISA Documentação mínima pesquisada (sistema de classificação seguido pelo símbolo da classificação) IPC:A01H		
Documentação adicional pesquisada, além da mínima, na medida em que tais documentos estão incluídos nos domínios pesquisados		
Base de dados eletrônica consultada durante a pesquisa internacional (nome da base de dados e, se necessário, termos usados na pesquisa) Epodoc, Agrícola		
C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoria*	Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado	Relevante para as reivindicações Nº
X	Castro & Gonzáles. <i>Eucalyptus (Eucalyptus grandis Hill ex Maiden) micropropagation in a temporary immersion system</i> . 2002. <i>Agricultura Técnica</i> , v. 2 (1): 68-78. (resumo, figura 1, tabela 1)	1 a 12
X	Gonzalez et al. <i>Multiplificación in vitro de Eucalyptus globulus mediante sistema de inmersión temporal</i> . <i>Bosque</i> , 2011. v. 32 (2): 147-154. (p. 149, col. 2, quadro 4 e pág. 150, col. 2 e p. 151, col. 2)	1 a 12
A	Watt. <i>The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation</i> . <i>African Journal of Biotechnology</i> , 2012. v. 11 (76): 14025-14035.	1 a 12
A	Correia. <i>Micropropagação em biorreatores de imersão temporária e enraizamento de miniestacas e microestacas de clones híbridos de Eucalyptus globulus</i> . Dissertação de Magister Scientia apresentada à Universidade Federal de Viçosa, 2011.	1 a 12
☐ Documentos adicionais estão listados na continuação do quadro C ☐ Ver o anexo de famílias das patentes		
* Categorias especiais dos documentos citados: "A" documento que define o estado geral da técnica, mas não é considerado de particular relevância. "E" pedido ou patente anterior, mas publicada após ou na data do depósito internacional "L" documento que pode lançar dúvida na(s) reivindicação(ões) de prioridade ou na qual é citado para determinar a data de outra citação ou por outra razão especial "O" documento referente a uma divulgação oral, uso, exibição ou por outros meios. "P" documento publicado antes do depósito internacional, porém posterior a data de prioridade reivindicada. "T" documento publicado depois da data de depósito internacional, ou de prioridade e que não conflita como depósito, porém citado para entender o princípio ou teoria na qual se baseia a invenção. "X" documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada nova e não pode ser considerada envolver uma atividade inventiva quando o documento é considerado isoladamente. "Y" documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada envolver atividade inventiva quando o documento é combinado com um outro documento ou mais de um, tal combinação sendo óbvia para um técnico no assunto. "&" documento membro da mesma família de patentes.		
Data da conclusão da pesquisa internacional 10/12/2014		Data do envio do relatório de pesquisa internacional: 07/01/2015
Nome e endereço postal da ISA/BR  INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL Rua São Bento nº 1, 17º andar cep: 20090-010, Centro - Rio de Janeiro/RJ +55 21 3037-3663		Funcionário autorizado Erika Tarré Borges Antonelli Nº de telefone: +55 21 3037-3493/3742

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 16 - 0044335

Bogotá D.C., Mayo 05 de 2016 - 15:17:59

RECIBIDO DE : TRIANA URIBE & MICHELSEN LTDA

NI 830.001.432

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	781877272	05/05/2016	220.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
2 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	40.000.00	80.000.00
			\$80.000.00

SON: **OCHENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 16-117531- -00000-0000

Fecha: 2016-05-05 15:27:38 Dep. 2020 DIR.NUEVASCF
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 98

- 96

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Mayo 5 de 2016 - 15:18:00

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 16 - 0044334

Bogotá D.C., Mayo 05 de 2016 - 15:17:59

RECIBIDO DE : TRIANA URIBE & MICHELSEN LTDA

NI 830.001.432

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	781877272	05/05/2016	220.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	80.000.00	80.000.00
			\$80.000.00

SON: **OCHENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 16-117531- -00000-0000

Fecha: 2016-05-05 15:27:38 Dep. 2020 DIR.NUEVASCF
Tra. 11 PATENTE IYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 96

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Mayo 5 de 2016 - 15:18:00



No. 16-117531-00000-0000

Fecha: 2016-05-05 15:27:38 Dep. 2020 DIR.NUEVASOF
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 96 - 96

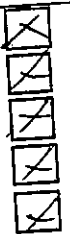
96



LISTA DE CHEQUEO
ADMISIÓN A TRÁMITE - NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCION ☒MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00



Indicación que se solicita una patente.
Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
Descripción de la invención
Dibujos de ser estos pertinentes
Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☒ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

Indicación que se solicita una PCT
Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
Dibujos de ser estos pertinentes
Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)



Indicación que se solicita Diseño industrial
Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)



Indicación que se solicita un esquema de trazado
Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
Representación gráfica de un esquema de trazado
Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐ Incompleta ☐