



**REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL**  
MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO EXTERIOR E SERVIÇOS  
**INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL**

## CARTA PATENTE Nº PI 0403642-5

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

**(21) Número do Depósito:** PI 0403642-5

**(22) Data do Depósito:** 29/01/2004

**(43) Data da Publicação do Pedido:** 01/11/2005

**(51) Classificação Internacional:** A01H 4/00

**(54) Título:** PROCESSO DE MICROPROPAGAÇÃO VEGETAL COM UTILIZAÇÃO DE BRASSINOESTEROÍDES

**(73) Titular:** UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - UFPR, Brasileira. CGC/CPF: 75095679000149. Endereço: Rua XV de Novembro, 1299, Centro, Curitiba, PR, BRASIL(BR), Brasileira

**(72) Inventor:** ADAUCTO BELLARMINO DE PEREIRA NETTO; JAVIER ALBERTO RAMIREZ; LYDIA RACHEL GALAGOVSKY; MARIZA MARA CORREIA DE CARVALHO OLIVEIRA; SILVIA SCHAEFER; SANDRA APARECIDA MEDEIRO

**Prazo de Validade:** 10 (dez) anos contados a partir de 13/03/2018, observadas as condições legais

**Expedida em:** 13/03/2018

Assinado digitalmente por:  
**Júlio César Castelo Branco Reis Moreira**  
Diretor de Patente



## PROCESSO DE MICROPROPAGAÇÃO VEGETAL COM UTILIZAÇÃO DE BRASSINOESTERÓIDES

### Introdução

5 Brassinoesteróides são esteróides vegetais essenciais para o crescimento e o desenvolvimento dos organismos que os produzem, que apresentam um grupamento oxigênio no carbono 3 e grupamentos oxigênio adicionais em um ou mais dos átomos de carbono C-2, C-6, C-22 e C-23 (Bishop & Yokota 2001).

10 A ampla ocorrência de brassinoesteróides em plantas, juntamente com as acentuadas respostas fisiológicas de plantas a aplicações exógenas de brassinoesteróides, e a análise genética e molecular de mutantes genéticos deficientes na biossíntese e/ou no mecanismo de transdução de sinal de brassinoesteróides resultaram no reconhecimento de que os brassinoesteróides se constituem em uma nova classe de reguladores do crescimento vegetal (Clouse & Sasse, 1998; Mussig & Altmann, 1999; Yokota, 1997).

### Campo de aplicação da invenção

20 A proliferação de brotações laterais tem-se mostrado como uma ferramenta poderosa para o aumento da taxa de propagação clonal *in vitro* (Shekhawat *et al.*, 1993), e conseqüentemente para a redução dos custos de produção associados à utilização da técnica de propagação clonal *in vitro*, para diversas espécies vegetais. O processo de micropropagação inventado aumenta significativamente a taxa de propagação *in vitro* de espécies vegetais de elevado valor econômico e pode ser aplicada com sucesso em plantas lenhosas, com isso possibilitando acelerar programas de melhoramento genético de espécies destinadas à produção de papel e celulose, por exemplo, além de permitir a propagação rápida e em grande escala de material vegetal com características genéticas superiores, viabilizando sua utilização comercial em período mais curto de tempo.

30 A utilização de brassinoesteróides para o aprimoramento da técnica de propagação clonal *in vitro* descrita possibilita a disponibilização em nível comercial, em período de tempo mais curto, de genótipos-elite de plantas oriundas de programas de seleção e de melhoramento genético, além de

06

07

5 permitir a propagação rápida e em grande escala de espécies de plantas ameaçadas de extinção ou que apresentam dificuldade de reprodução por outros métodos naturais ou artificiais. O aprimoramento da técnica de propagação clonal *in vitro* apresenta um grande avanço tecnológico com aplicações principalmente na: 1. Agricultura, a exemplo da fruticultura (onde os pomares clonais tipicamente apresentam maior produtividade quando comparados aos pomares não clonais) e da floricultura (onde novas variedades continuamente são criadas, requerendo portanto a utilização de técnicas de propagação eficientes); 2. Engenharia florestal, onde florestais clonais, altamente produtivas, são utilizadas para finalidades diversas, como por exemplo, a produção de celulose e papel, e produção de energia nas indústrias siderúrgicas; 3. Esforços de conservação ambiental, onde espécies nativas ameaçadas de extinção, que frequentemente apresentam dificuldade de propagação por vias naturais e vias artificiais alternativas a propagação clonal *in vitro*, podem ser eficientemente propagadas e utilizadas em programas de repovoamento.

10

15

20

O aumento significativo na eficiência da técnica de propagação clonal *in vitro*, advindo da utilização de brassinoesteróides, apresenta caráter inovativo ao tornar técnicas anteriormente disponíveis mas de aplicação prática muito limitada, como por exemplo para a micropropagação comercial, viáveis para a utilização prática, por exemplo, para a produção comercial de mudas de macieira, além de outras espécies de interesse econômico.

#### Estado da técnica

25

30

A proliferação de brotações laterais pode ser induzida em vegetais crescendo *in vitro* através do emprego de diferentes formas de citocininas no meio de cultura, todavia, a presença de citocininas no meio de cultura não tem se mostrado capaz de inibir a dominância apical em várias espécies, especialmente de plantas arbóreas (Huang *et al.*, 1994), dificultando o emprego da técnica de micropropagação *in vitro* para fins comerciais, ou seja, a propagação rápida e em massa de genótipos-elite gerados por programas de seleção e/ou melhoramento genético.

Conhecidos os brassinoesteróides por estimular o alongamento caulinar em

ampla variedade de espécies vegetais (Zurek et al., 1994; Oh & Clouse 1998), investigou-se a possibilidade destas moléculas estimularem a proliferação de brotações laterais em plantas crescendo *in vitro*, com o objetivo de aprimorar a técnica de micropropagação vegetal.

08

5 Objeto da invenção

Taxa de multiplicação *in vitro*, no caso do porta-enxerto de macieira marubakaido (*Malus prunifolia* {Willd.} Borkh, cultivar marubakaido), essencialmente representa o número de novos ramos formados a partir de um explante inicial, explante este tipicamente constituído por um segmento nodal.

10 Essa taxa apresenta-se da ordem de 4 a 5 novos ramos por explante inicial do porta-enxerto marubakaido, um número reduzido, o que torna difícil a utilização comercial da técnica de micropropagação para este porta-enxerto.

Todavia, o tratamento de partes aéreas deste porta-enxerto cultivadas *in vitro* resultou em aumento estatisticamente significativo. Com uma solução de

15 etanol contendo 500 nanogramas do derivado fluoretado da 28-homocastasterona (5F-HCTS) na forma de microgota (5 microlitros), aplicada sobre a nervura principal da folha mais próxima do ápice caulinar (medindo no mínimo 2 milímetros de lagura) e deixada secar sobre o local de aplicação, em contato com a atmosfera presente no ambiente asséptico onde a aplicação é

20 feita, verificou-se aumento, ao nível de 5% de probabilidade, de 112% na taxa de multiplicação *in vitro* para o porta-enxerto de macieira (Figura 1). Constatou-se, com isso, aumento na taxa de multiplicação devido principalmente a um aumento de 238% no número de ramos laterais primários (Figura 2).

25 A Figura 2 apresenta diagrama da nomenclatura utilizada para denominar os ramos formados a partir do explante original (segmento nodal) em função de sua posição com relação ao explante original: A - Explante original; B - Ramo principal; C - Ramo lateral primário. As barras verticais na Figura 1 indicam o erro-padrão.

30 Para um híbrido entre *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla*, o tratamento de partes aéreas cultivadas *in vitro* com uma solução de acetona estéril contendo 10 microgramas por mililitro da forma nativa da 28-Homocastasterona (28-HCTS),

aplicada na forma de imersão, seguida de imediata secagem em papel absorvente e retorno ao frasco de cultivo, resultou em aumento, estatisticamente significativo ao nível de 5% de probabilidade, de 72% na taxa de multiplicação, sendo este aumento na taxa de multiplicação devido principalmente a um aumento de 88% no número de ramos principais (ramos que tem origem diretamente a partir do explante original, Figura 2).

Estes resultados demonstram que o uso de brassinoesteróides aumenta a taxa de multiplicação vegetal *in vitro* significativamente e, a sua utilização conforme a invenção ora descrita, permitir reduzir os custos do processo de clonagem *in vitro*.

09

10

## REIVINDICAÇÕES

**1. PROCESSO DE MICROPROPAGAÇÃO VEGETAL COM UTILIZAÇÃO DE BRASSINOESTERÓIDES**, caracterizado por estimular a proliferação de brotações laterais induzida em macieira e eucalipto crescendo *in vitro*, através do emprego de brassinosteróides aplicados externamente em partes aéreas, botanicamente caracterizadas pelo conjunto formado pelo caule e folhas, cultivados *in vitro*.

**2. PROCESSO DE MICROPROPAGAÇÃO VEGETAL COM UTILIZAÇÃO DE BRASSINOESTERÓIDES**, caracterizado pelo uso de brassinosteróides que apresentam grupamento oxigênio no carbono 3 e grupamentos oxigênio adicionais em um ou mais dos átomos de carbono C-2, C-6, C-22 e C-23.

**3. PROCESSO DE MICROPROPAGAÇÃO VEGETAL COM UTILIZAÇÃO DE BRASSINOESTERÓIDES**, conforme as reivindicações 1 e 2, anteriores, caracterizado pelo cultivo *in vitro* de segmentos nodais de um clone de porta enxerto de maceira marubakaido em 40 mL de meio de cultura básico de Murashige e Skoog, suplementado com 555  $\mu\text{M}$  de mio-inositol, 4,06  $\mu\text{M}$  de ácido nicotínico, 2,43  $\mu\text{M}$  de piridoxina-HCl, 26,64  $\mu\text{M}$  de glicina, 6,25  $\mu\text{M}$  de tiamina-HCl, 2,2  $\mu\text{M}$  de  $\text{N}^6$ -benziladenina, 3% (m/v) de sacarose e 0,6% (m/v) de ágar; pH ajustado para 5,7 antes da autoclavagem; as culturas serem distribuídas em uma sala de cultura de maneira completamente casualizada e a estas ser fornecido fotoperíodo de 16 horas por meio de lâmpadas fluorescentes do tipo branca-fria com densidade de fluxo de radiação fotossinteticamente ativa de 40  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  no nível das culturas, mantida a umidade relativa do ar em 70 $\pm$ 5% e a temperatura do ar em 27 $\pm$ 1.0°C, nas proximidades dos frascos de cultivo.

**4. PROCESSO DE MICROPROPAGAÇÃO VEGETAL COM UTILIZAÇÃO DE BRASSINOESTERÓIDES**, conforme as reivindicações 1 e 2, acima, caracterizado por ser aplicada, no 15° (décimo quinto) dia de cultivo, uma

microgota (5 microlitros) de solução de etanol (95%, v/v) contendo 500 nanogramas de brassinoesteróide sobre a nervura principal da folha mais próxima do ápice caulinar, medindo no mínimo 2 milímetros de largura, de partes aéreas (caule + folhas) geradas a partir do segmento nodal cultivado *in vitro*, e a solução ser deixada secar sobre o local de aplicação, em contato com a atmosfera presente no ambiente asséptico onde sua aplicação é feita.

**5. PROCESSO DE MICROPROPAGAÇÃO VEGETAL COM UTILIZAÇÃO DE BRASSINOESTERÓIDES**, conforme as reivindicações 3 ou 4, acima, caracterizado por o brassinoesteróide ser o derivado fluoretado da 28-homoetilcastasterona (5F-HCTS).

**6. PROCESSO DE MICROPROPAGAÇÃO VEGETAL COM UTILIZAÇÃO DE BRASSINOESTERÓIDES**, conforme as reivindicações 3 ou 4, acima, caracterizado pelo brassinoesteróide 28-homocastasterona.

**7. PROCESSO DE MICROPROPAGAÇÃO VEGETAL COM UTILIZAÇÃO DE BRASSINOESTERÓIDES**, conforme a reivindicação 1, acima, caracterizado pelo cultivo *in vitro*, por 15 dias, de segmentos nodais de um clone do híbrido entre *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla* em 40 mL de meio de cultura básico de Murashige e Skoog, suplementado com 555 µM de mio-inositol, 4,06 µM de ácido nicotínico, 2,43 µM de piridoxina-HCl, 26,64 µM de glicina, 6,25 µM de tiamina-HCl, 1 µM de N<sup>6</sup>-benziladenina, 6 µM de ácido naftaleno acético, 3% (m/v) de sacarose e 0,6% (m/v) de ágar; e o pH ser ajustado para 5,7 antes da autoclavagem; as culturas serem distribuídas em uma sala de cultura de maneira completamente casualizada e um fotoperíodo de 16 horas ser fornecido por lâmpadas fluorescentes do tipo branca-fria com densidade de fluxo de radiação fotossinteticamente ativa de 40 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> no nível das culturas, sendo a umidade relativa do ar mantida em 70±5% e a temperatura do ar em 28°±2,0°C, nas proximidades dos frascos de cultivo.

**8. PROCESSO DE MICROPROPAGAÇÃO VEGETAL COM UTILIZAÇÃO DE BRASSINOESTERÓIDES**, conforme a reivindicação 7, acima, caracterizado por partes aéreas geradas a partir dos segmentos nodais cultivados *in vitro* serem mergulhadas em solução de acetona estéril contendo 10 microgramas por mililitro da forma nativa da 28-homoetilcastasterona (28-HCTS), imediatamente retiradas da solução e deixadas sobre papel absorvente até sua secagem completa, e em seguida, as partes aéreas tratadas retornarem para o frasco de cultivo.

12

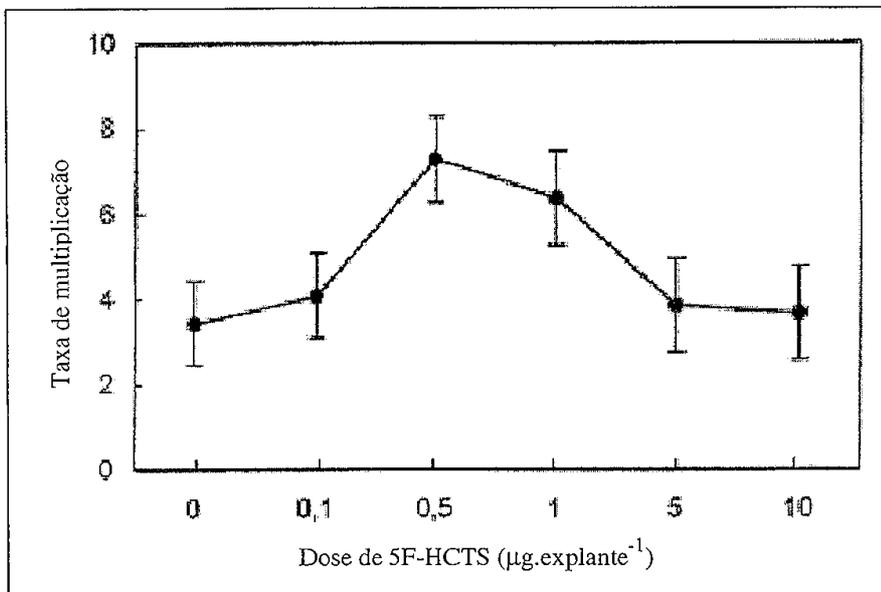


Figura 1

13

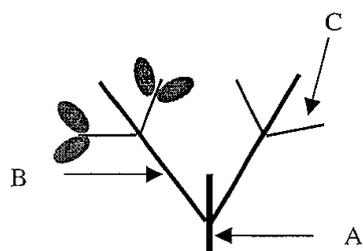


Figura 2