



República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(21) PI 1101326-5 A2**



\* B R P I 1 1 0 1 3 2 6 A 2 \*

(22) Data de Depósito: 14/03/2011  
(43) Data da Publicação: 04/02/2014  
(RPI 2248)

(51) *Int.Cl.:*  
A01H 4/00

**(54) Título:** PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE NOVA CULTIVAR - MICROPROPAGAÇÃO IN VITRO DE PEPEROMIA PELLUCIDA L. (H.B.K.)

**(73) Titular(es):** Instituto Nacional de Tecnologia - Nordeste/MCT, Universidade Federal de Pernambuco, Universidade Federal do Pará

**(72) Inventor(es):** Deivid Almeida da Costa, Pedro José Rolim Neto, Rosali Maria Ferreira da Silva, Thays Cristiane Barbosa de Lucena Gomes

**(57) Resumo:** PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE NOVA CULTIVAR - MICROPROPAGAÇÃO IN VITRO DE Peperomiapeilucida L. (H.B.K.) A presente patente refere-se ao processo para obtenção de nova cultivar, no que diz respeito à micropropagação in vitro de Peperomia peilucida L. (H.B.K.). Este processo consistiu da propagação vegetativa in vitro por meio de pequenos (ou micro) propágulos os quais foram cultivados em frascos, onde os meios nutritivos e as condições ambientais do cultivo favoreceram a formação e o desenvolvimento de tecidos, órgãos e plantas in vitro. Apresentou diversas vantagens, como a multiplicação de grandes quantidades de plantas em espaço físico e tempo reduzidos, e a possibilidade de realizar limpeza clonal, gerando indivíduos livres de patógenos. A micropropagação de P. peilucida foi possível utilizando-se gemas axilares jovens e o meio de cultura MS básico.

**“PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE NOVA CULTIVAR -  
MICROPROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.)”**

A presente patente refere-se ao processo para obtenção de nova cultivar, no que diz respeito à micropropagação *in vitro* de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.), uma  
5 metodologia eficiente para micropropagar *in vitro* plantas de *P. pellucida* de forma a se obter clones em um espaço físico e temporal menor que no campo.

A micropropagação consiste da propagação vegetativa *in vitro* por meio de pequenos (ou micro) propágulos os quais geralmente são cultivados em frascos ou em biorreatores, onde os meios nutritivos e as condições ambientais do cultivo favorecem a  
10 formação e o desenvolvimento de tecidos, órgãos e plantas *in vitro*. Essa técnica apresenta diversas vantagens, como a multiplicação de grandes quantidades de plantas em espaço físico e tempo reduzidos, e a possibilidade de realizar limpeza clonal, gerando indivíduos livres de patógenos.

O desenvolvimento *in vitro* de células e tecidos depende de diversos fatores,  
15 como o genótipo, tipo de explante, estágio de desenvolvimento e idade, estado fisiológico da planta matriz e condições físicas que incluem composição do meio de cultura, luz e temperatura, entre outros.

O uso da micropropagação como ferramenta para multiplicação de plantas pode ser inviável ou ineficiente, se etapas importantes não forem alcançadas com sucesso.  
20 Dentre estas etapas, temos a desinfestação/descontaminação microbiológica dos explantes para introdução *in vitro*; regeneração, multiplicação e enraizamento *in vitro* dos explantes e aclimatização das plântulas.

Na etapa de desinfestação, é importante selecionar agentes químicos e/ou físicos que permitam a remoção dos micro-organismos, mas que ao mesmo tempo não  
25 danifique demasiadamente o tecido vegetal a fim de comprometer a sua regeneração e formação dos clones. Na fase de regeneração, o tipo de tecido ou órgão da planta doadora, é uma escolha fundamental, já que os diferentes tipos de células da planta geralmente respondem de forma exclusiva em resposta ao meio de cultura e as condições do microambiente *in vitro*. Na fase de multiplicação e enraizamento, as  
30 condições químicas e físicas do meio de cultura e do microambiente são definitivas para o sucesso nessas etapas. E a aclimatização das plantas é de grande importância,

pois essa fase de adaptação as condições *ex vitro* pode ser um fator limitante quando se deseja levar ao campo as planta clonadas *in vitro*.

Para realizar a micropropagação *in vitro* da *P. pellucida*, foi desenvolvida uma metodologia onde se selecionou os tecidos vegetais que permitiam uma descontaminação e regeneração mais eficiente. Utilizando-se de hipoclorito de sódio, detergente e água durante períodos de tempo definidos, conseguiu-se a descontaminação do material vegetal. A regeneração, multiplicação e enraizamento *in vitro* foi obtida a partir de um meio de cultura e condições de cultivo definidos, que permitiram a obtenção de clones. A metodologia de aclimatização permitiu a adaptação das plantas as condições *ex vitro*.

Foram utilizadas como fonte de explantes os entrenós e/ou ápices de ramos jovens, que foram retirados da planta-mãe e submetidos ao processo de desinfestação. A desinfestação foi realizada com uma lavagem dos explantes em água corrente, seguido de uma imersão por 5-20 minutos de agitação em água destilada + detergente + hipoclorito de sódio ou cálcio a 0,05-0,5% de cloro ativo. Posteriormente, os explantes foram lavados em água estéril, e em câmara de fluxo laminar, foram imersos sob agitação em solução de hipoclorito de sódio ou cálcio a 0,5-2% de cloro ativo durante 5-15 minutos. Após esse tempo, foram lavados 3 vezes com água destilada estéril, cortados em pedaços de 1 cm contendo 1 gema axilar e inoculados.

Os explantes foram inoculados em meio de cultura básico, composto por sais e vitaminas MS, acrescido de 100 mg.L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 6-8 g.L<sup>-1</sup> de ágar e 30-40 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. O pH do meio foi ajustado para 5,6 antes de ser autoclavado. Os explantes permaneceram durante 30-70 dias sob iluminação de 1.500-3.000 Lux, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 26 ± 2 °C. Após 30-70 dias de inoculação, as plântulas formadas *in vitro* foram utilizadas como fonte de explantes para multiplicação.

A multiplicação *in vitro* a partir das plantas regeneradas foi realizada utilizando-se dos entrenós e/ou ápice. Explantes de 0,5-2 cm, contendo uma gema axilar foram utilizadas no processo de multiplicação. Os explantes foram subcultivados em meio de cultura básico, composto por sais e vitaminas MS, acrescido de 100 mg.L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 6-8 g.L<sup>-1</sup> de ágar e 30-40 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. O pH do meio foi ajustado para 5,6 antes de ser autoclavado. A cada 30-50 dias, as plantas eram subcultivadas, utilizando

os explantes, meio de cultura, condições de fotoperíodo, luz e temperatura já descritos anteriormente.

As plantas formadas e enraizadas foram transferidas para a fase de aclimatização. A aclimatização consistia da retirada cuidadosa das plantas dos potes e remoção do Ágar das raízes. As plantas foram então transferidas para casa de vegetação com umidade relativa de 80-90% e temperatura média de  $28^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$  durante 40 dias.

A micropropagação de *P. pellucida* foi possível utilizando-se gemas axilares jovens e o meio de cultura MS básico.

## REINVIDICAÇÕES

**“PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE NOVA CULTIVAR -  
MICROPROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.)”**

1. **PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE NOVA CULTIVAR -  
5 MICROPROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.)**,  
caracterizada por utilizar água, hipoclorito de sódio ou cálcio e detergente para  
desinfestação de gemas axilares e apical da planta doadora.

2. **PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE NOVA CULTIVAR -  
MICROPROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.)**, de  
10 acordo com a reivindicação 1, caracterizado por inoculação do material em meio básico  
composto por sais e vitaminas MS.

3. **PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE NOVA CULTIVAR - MICROPROPAGAÇÃO  
*IN VITRO* DE *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.)**, de acordo com as reivindicações 1 e 2,  
15 caracterizado pela inoculação do material ser acrescida de mio-inositol, ágar e sacarose,  
subcultivados a cada 30-50 dias, para produção dos clones que podem ser transferidos  
para aclimatização.

**RESUMO**

Patente de invenção: **“PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE NOVA CULTIVAR - MICROPROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.)”**

A presente patente refere-se ao processo para obtenção de nova cultivar, no que diz  
5 respeito à micropropagação *in vitro* de *Peperomia pellucida* L. (H.B.K.). Este processo  
consistiu da propagação vegetativa *in vitro* por meio de pequenos (ou micro) propágulos  
os quais foram cultivados em frascos, onde os meios nutritivos e as condições  
ambientais do cultivo favoreceram a formação e o desenvolvimento de tecidos, órgãos e  
plantas *in vitro*. Apresentou diversas vantagens, como a multiplicação de grandes  
10 quantidades de plantas em espaço físico e tempo reduzidos, e a possibilidade de realizar  
limpeza clonal, gerando indivíduos livres de patógenos. A micropropagação de *P.*  
*pellucida* foi possível utilizando-se gemas axilares jovens e o meio de cultura MS  
básico.