



MD 31 Y 2009.06.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **31**⁽¹³⁾ **Y**
(51) Int. Cl.: *A01H 4/00* (2006.01)
C12N 1/38 (2006.01)
A01N 45/00 (2006.01)
A61K 36/28 (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE
DE SCURTĂ DURATĂ**

In termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție de scurtă durată, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului	
(21) Nr. depozit: s 2009 0037 (22) Data depozit: 2009.02.23	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2009.06.30 (67)* Nr. a 2009 0019 și data transformării cererii 2009.03.26
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE GENETICĂ ȘI FIZIOLOGIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD (72) Inventatori: SÎROMEATNICOV Iulia, MD; JACOTĂ Anatol, MD; ȘVEȚ Stepan, MD; CHINTEA Pavel, MD; COTENCO Eugenia, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE GENETICĂ ȘI FIZIOLOGIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	

(54) **Procedeu de micropropagare a *Echinacea purpurea* L. Moench *in vitro***

(57) **Rezumat:**

1
Invenția se referă la biotehnologie, în particular la un procedeu de micropropagare a plantelor de *Echinacea purpurea* L. Moench *in vitro*.

Procedeul, conform invenției, include germinarea aseptică a semințelor, obținerea explantelor, segmentarea și cultivarea lor pe mediul nutritiv Murashige-Skoog, ce conține suplimentar glicozide steroidice obținute din rădăcini de pătlăgele vinete *Solanum melongena* L. prin extracție cu apă la fierbere, prelucrarea extractului obținut cu butanol-1

2
5 și concentrare, în concentrație de $(3,0...3,5) \cdot 10^{-3}\%$, totodată cultivarea se efectuează la o temperatură de 22...26°C, umiditatea relativă a aerului de 70%, cu o fotoperioadă de 16 și 8 ore noapte/zi și intensitatea iluminării de 3000 lx.

10 Rezultatul invenției constă în sporirea embriogenezei somatice și regenerării plantelor.

Revendicări: 1

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie, în particular la un procedeu de micropropagare a plantelor de *Echinacea purpurea* L. Moench *in vitro*.

Echinacea purpurea L. Moench este o plantă decorativă și medicinală prețioasă, multianuală. Acumulează și sintetizează substanțele biologice active, este mult apreciată pentru calitățile sale terapeutice, posedă proprietăți imunostimulente și antivirale. În componența rădăcinilor se conține substanța anginoli. Preparatul din flori posedă proprietăți hemostatice și de vindecare a rănilor. Toate părțile componente ale plantei conțin glicozida steroică echinacozidă și ulei volatil eteric până la 1%.

Este cunoscut procedeu de micropropagare a plantelor de *Rhodiola rosea* L., ce constă în obținerea și activarea meristemoizilor de la care pornesc lăstarii. Pentru activarea și creșterea intensivă a plantulelor, explante primare prelevate din plantule obținute prin germinarea semințelor au fost cultivate pe mediul nutritiv de bază ce conține săruri minerale după Murashige-Skoog (MS) (Murashige T., Skoog F. Revised medium for rapid growth and bio-assays with tabaco tissue cultures. Physiology Plantarum, 1962, v. 15, N. 95, p. 473, suplimentat cu cărbune activat în cantitate de 1200 mg/l, valoarea pH-ului fiind ajustată la 6,5 până la autoclavare [1].

Dezavantajele acestui procedeu sunt: coeficientul de micropropagare scăzut, faptul că nu toate explantele asigură inițierea creșterii meristemoizilor de la baza cărora pornesc lăstarii.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în sporirea coeficientului de multiplicare a plantelor de *Echinacea purpurea* L. Moench pe calea modificării conținutului mediului nutritiv utilizat pentru micropropagare.

Esența invenției constă în aceea că procedeu include germinarea aseptică a semințelor, obținerea explantelor, segmentarea și cultivarea lor pe mediul nutritiv Murashige-Skoog, ce conține suplimentar glicozide steroice obținute din rădăcini de pătlăgele vinete *Solanum melongena* L. prin extracție cu apă la fierbere, prelucrarea extractului obținut cu butanol-1 și concentrare, în concentrație de $(3,0...3,5) \cdot 10^{-3}\%$, totodată cultivarea se efectuează la o temperatură de 22...26°C, umiditatea relativă a aerului de 70%, cu o fotoperioadă de 16 și 8 ore noapte/zi și intensitatea iluminării de 3000 lx.

Preparatul Somelangozidă a fost obținut din rădăcini de pătlăgele vinete prin extracție cu apă la fierbere, prelucrarea extractului obținut cu butanol-1 și concentrare (SU 1473317 A 1988.12.15).

Rezultatul invenției constă în sporirea embriogenezei somatice și regenerării plantelor.

Exemplu de realizare a invenției

Plantulele de *Echinacea purpurea* L. Moench au fost obținute prin germinarea aseptică a semințelor. Pentru a asigura sterilitatea, semințele s-au tratat cu agent de înălbire pe bază de clor de 15%, timp de 20 min, spălându-se de 4...5 ori cu apă distilată sterilă. În continuare s-au inoculat pe mediul nutritiv de bază MS. Plantulele obținute ajungând la mărimea de 7...10 cm, s-au segmentat și cultivat în condiții aseptice la hota cu flux de aer laminar steril.

În calitate de material inițial pentru inițierea micropropagării de plantule au servit segmente de hipocotil și frunze prelevate din plantulele germinate aseptice din semințe. În vasele de sticlă de 50...100 ml s-au repartizat câte 15...20 ml de mediu nutritiv. S-au sterilizat prin autoclavare, în faza de vapori 10 min aerisire și 15 min sterilizare în condițiile de presiune ($p=1$ atm) și temperatură ($t=121^\circ\text{C}$, pH-ul fiind ajustat la 5,8...5,9).

Toate operațiile au fost efectuate în condiții strict aseptice la hota cu flux de aer laminar steril. În camera de creștere s-a menținut un regim controlat de creștere constant, caracterizat prin temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$, umiditatea relativă a aerului de 70%, durata perioadei de iluminare 16 ore/zi și 8 ore/noapte, intensitatea luminii 3000 lx.

O parte de explante (variante control) s-au inoculat pe mediul de cultură de bază Murashige-Skoog, ce conținea macroelemente (săruri minerale, mg/l): NH_4NO_3 - 1650, KNO_3 - 1900, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 370, KH_2PO_4 - 170, $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 440; microelemente, mg/l: H_3BO_3 - 6,2, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 22,3, $\text{COCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,025, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,025, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 8,6, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 0,25, KJ - 0,83, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 27,8, Na_2EDTA - 37,3, Inozitol - 100, solidificat cu agar-agar 0,7%, zaharoză 3%.

Altă parte de explante (cea mai apropiată soluție), s-a utilizat pe mediul de bază Murashige-Skoog, suplimentat cu cărbune activat în cantitate de 1200 mg/l, valoarea pH-ului fiind ajustată la 6,5.

A treia parte de explante au fost utilizate pe mediul de cultură de bază Murashige-Skoog, suplimentat cu Somelangozidă în concentrație de $3,0...3,5 \cdot 10^{-3}$.

Proliferarea explantelor în varianta martor s-a remarcat foarte slab, creșterea și dezvoltarea calusului fără zone meristematice, ca rezultat explantele inoculate pe acest mediu s-au necrotizat.

În al doilea caz la utilizarea mediului Murashige-Skoog cărbune activat - cea mai apropiată soluție, proliferarea explantelor s-a realizat după 10 zile de la inoculare, inducerea, creșterea și dezvoltarea calusului s-au observat după 18 zile. Apariția plantulelor - după 25 zile. Creșterea și dezvoltarea plantulelor s-au observat după o lună de zile. În acest caz micropropagarea plantulelor a constituit $3 \cdot 10^4$ plante anual.

MD 31 Y 2009.06.30

4

Pe al treilea mediu, conform invenției, proliferarea explantelor a evoluat la 5 zile de la cultivare, la 8 zile formarea și dezvoltarea calusului embrionar cu zone meristematice de culoare roz. Apariția plantulelor regenerate s-a observat la 14 zile. Creșterea și dezvoltarea plantulelor s-a observat la 20 zile de la momentul cultivării explantelor pe mediul de cultură Murashige - Skoog, suplimentat cu substanțe furostanolice Somelangozidă în concentrație de $3,0 \cdot 10^{-3}$. În această variantă raportul optimal al ingredientilor prezenți în mediul nutritiv de cultură artificial sporește considerabil coeficientul de micropropagare a plantulelor de *Echinacea* – cu $4 \cdot 10^5$ plante anual. Valoarea medie a masei celulare a calusului s-a caracterizat cu valori de 64,23...75,1%. Capacitatea embriogenezei somatice a constituit 77,5...83,6%, iar capacitatea de regenerare a evoluat între 74,2...76,4%. În general calusul embrionar a fost multiplicat în scopul variabilității genetice de micropropagare a plantulelor obținute *in vitro*.

15

(57) Revendicări:

Procedeu de micropropagare a *Echinacea purpurea* L. Moench *in vitro* care include germinarea aseptică a semințelor, obținerea explantelor, segmentarea și cultivarea lor pe mediul nutritiv Murashige-Skoog, ce conține suplimentar glicozide steroidice obținute din rădăcini de pătlăgele vinete *Solanum melongena* L. prin extracție cu apă la fierbere, prelucrarea extractului obținut cu butanol-1 și concentrare, în concentrație de $(3,0...3,5) \cdot 10^{-3}\%$, totodată cultivarea se efectuează la o temperatură de 22...26°C, umiditatea relativă a aerului de 70%, cu o fotoperioadă de 16 și 8 ore noapte/zi și intensitatea iluminării de 3000 lx.

25

(56) Referințe bibliografice:

1. MD 3375 G2 2007.08.31

Șef Secție:

COLESNIC Ineasa

Examinator:

GORDIENCO Maria

Redactor:

CANȚER Svetlana

RAPORT DE DOCUMENTARE

pentru cerere de brevet de invenție de scurtă durată conform art.52(2) a Legii nr. 50/2008

(21) Nr. depozit: s 2009 0037	(85) Data fazei naționale PCT:	
(22) Data depozit: 2009.02.23	(86) Cerere internațională PCT:	
Prioritatea invocată: (31) nr.: 32) data: 33) țara: (51) IPC: Int. Cl.: A01H 4/00 (2006.01) C12N 1/38 (2006.01) A01N 45/00 (2006.01) A61K 36/28 (2006.01) Alți indici de clasificare: Titlul: Procedeu de micropropagare a <i>Echinacea purpurea</i> L. Moench <i>in vitro</i> (71) Solicitantul: INSTITUTUL DE GENETICĂ ȘI FIZIOLOGIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD		
I. Condiția de unitate a invenției ☐ satisface ☐ nu satisface. Notă:		
II. Minimul de documente consultate: MD, EA		
III. Domeniul de documentare: Indicii IPC (ultima redacție): Int. Cl.: A01H 4/00 (2006.01) C12N 1/38 (2006.01) A01N 45/00 (2006.01) a) A61K 36/28 (2006.01) Termeni caracteristici, cuvinte-cheie, sinonime: a) limba română: micropropagare, mediu nutritiv Murashige Scooge, explantare b) limba engleză: micropropagation, nutrient medium Murashige Scooge, explantation c) limba rusă :микроразмножение, питательная среда Murashige Scooge , эксплантация		
IV. Documente considerate a fi relevante		
Categoria	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente	Relevant față de revendicarea nr.
A	1.Ишмуратова М.М. Растительные ресурсы. Клональное микроразмножение <i>Rhodiola rosea</i> L. и <i>R. iremelica</i> Boriss. <i>in vitro</i> . Т.34, 1998, вып. 1., p. 12-23	1
A		1
A	RU 2324338 C1 2008.05.20	1
A	RU 2222933 C2 2004.02.10	1
A	RU 2286053 C2 2006.10.27	1
A	RU 2279212 C2 2006.07.10	1
A	SU 169585 A1 1991.12.07	1
A	RU 2180165 C2 2002.10.03	1
A	EP 0244211 A 1987.11.04	1
A	RU 2324338 C1 2002.05.20	1
A	RU 2080780 C1 1997.06.10	1
A	RU2039427 C1 1995.07.20	1
A	US 4338745 A 1982.07.13	1
A	RU 2273987 C2 2004.02.24	1
A	RU 2123256 C1 1998.12.20	1
A	SU 1473317 A1 (1987.08.14)	1
A	MD 3375 G2 2007.08.31	1
A	MD 5963 F1 2009.03.16	1
A	MD1262 G2 1999.07.31	1

Categorii de documente citate		
A - document care definește stadiul anterior în general	O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expunere etc.	
X - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă	P - document publicat înainte de data de depozit dar după data priorității invocate	
Y - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe alte documente de aceeași natură	T - document publicat după data de depozit sau a priorității invocate, citat pentru a pune în evidență principiul sau teoria care fundamentează invenția	
E - document anterior dar publicat la data de depozit național reglementar sau după această dată	D – Document menționat în descrierea cererii de brevet	
Data finalizării documentării 2009.04.06		
Examinatorul , GORDIENCO Maria		