



MD 894 Y 2015.04.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **894** (13) **Y**
(51) Int.Cl: *A01H 4/00* (2006.01)
A01H 5/12 (2006.01)
A61K 36/41 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE
DE SCURTĂ DURATĂ

În 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 2014 0133 (22) Data depozit: 2014.10.20 (67)* Nr. și data transformării cererii: a 2014 0115; 2014.10.27	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2015.04.30, BOPI nr. 4/2015
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE GENETICĂ, FIZIOLOGIE ȘI PROTECȚIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD (72) Inventatori: CĂLUGĂRU-SPĂTARU Tatiana, MD; CAUȘ Maria, MD; DASCALIUC Alexandru, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE GENETICĂ, FIZIOLOGIE ȘI PROTECȚIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	

(54) Procedeu de obținere a biomasei calusului de *Rhodiola rosea* L. *in vitro*

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la biotehnologie, și anume la un procedeu de obținere a biomasei calusului de *Rhodiola rosea* L. *in vitro*.

Procedeul, conform invenției, include cultivarea calusului din frunze de la plantulele sterile de *Rhodiola rosea* L. pe mediul nutritiv agarizat Murashige-Skoog, cu un adaos de 5

2
mg/l 6-benzilaminopurină, 0,5 mg/l acid α -naftilacetic și 0,1% soluție apoasă sterilizată de 5% de substanțe uscate obținute din biomasa algei verzi *Spirogira* sp. prin extragere cu etanol.

Revendicări: 1

MD 894 Y 2015.04.30

(54) Process for *in vitro* production of *Rhodiola rosea* L. callus biomass

(57) Abstract:

1
The invention relates to biotechnology, namely to a process for *in vitro* production of *Rhodiola rosea* L. callus biomass.

The process, according to the invention, comprises cultivation of callus from leaves of sterile shoots of *Rhodiola rosea* L. on the agarized Murashige-Skoog nutrient medium supplemented with 1.5 mg/l of 6-

2
benzylaminopurine, 0.5 mg/l of α -naphthylacetic acid and 0.1% sterile aqueous solution of 5% of dry substances obtained from the biomass of green alga *Spirogira* sp. by extraction with ethanol.

Claims: 1

(54) Способ получения биомассы каллуса *Rhodiola rosea* L. *in vitro*

(57) Реферат:

1
Изобретение относится к биотехнологии, а именно к способу получения биомассы каллуса *Rhodiola rosea* L. *in vitro*.

Способ, согласно изобретению, включает культивирование каллуса из листьев от стерильных ростков *Rhodiola rosea* L. на агаризованной питательной среде Мурасиге-Скуга, с добавлением 1,5

2
мг/л 6-бензиламинопурина, 0,5 мг/л α -нафтилуксусной кислоты и 0,1% стерилизованного 5% водного раствора сухих веществ, полученных из биомассы зеленой водоросли *Spirogira* sp. путем экстракции этанолом.

П. формулы: 1

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie, și anume la un procedeu de obținere a biomasei calusului de *Rhodiola rosea* L. *in vitro*.

5 *Rhodiola rosea* L. reprezintă o plantă valoroasă care, datorită metaboliților secundari ce se conțin în rădăcini și rizomi, este folosită pe larg în medicină și farmaceutică. Tocmai de aceea *Rhodiola rosea* L. este colectată intensiv din masivele naturale și în ultimii ani ea a dispărut de pe mai multe creste montane, unde planta creștea spontan. Cultivarea artificială a speciei necesită condiții specifice, din aceasta cauză întâmpină mai
10 multe dificultăți. O cale de soluționare a problemei este obținerea principiilor active caracteristice pentru *Rhodiola rosea* L. din biomasa celulelor calusului obținută pe cale biotehnologică.

Este cunoscută metoda de cultivare a celulelor calusului *in vitro* [1]. Pentru proliferarea celulelor calusului a fost utilizat mediul nutritiv Murashige-Skoog (MS) (1962), suplinit cu 6-benzilaminopurină (BA) 1,5 mg/l, acid α -naftilacetic (ANA) 0,5
15 mg/l; valoarea pH-ului fiind ajustată la 5,8 înainte de autoclavare [1]. Din punct de vedere economic acest procedeu necesită îmbunătățire, deoarece cultivarea calusului pe parcursul unei perioade optimale nu asigură acumularea semnificativă a biomasei. Acest neajuns poate fi înlăturat cu ajutorul procedurii propus.

20 Problema pe care o rezolvă invenția constă în sporirea proliferării celulare și a acumulării biomasei calusului de *Rhodiola rosea* L.

Procedeu, conform invenției, include inocularea frunzelor prelevate de la plantulele sterile de *Rhodiola rosea* L. pe un mediu nutritiv, obținut prin adăugarea la mediul nutritiv agarizat Murashige-Skoog a 1,5 mg/l 6-benzilaminopurină și 0,5 mg/l acid α -
25 naftilacetic, ajustarea pH-ului până la 5,8, autoclavare și adăugarea unei soluții apoase sterilizate de 5% de substanțe uscate obținute din biomasa algei verzi *Spirogira* sp. prin extragere cu etanol în cantitate de 0,1%, după care se efectuează cultivarea calusului în decurs de 40 zile la temperatura de 26°C și umiditatea relativă a aerului de 70% cu o fotoperioadă de 16 ore lumină și 8 ore întuneric.

30 Soluția apoasă obținută din biomasa algei verzi *Spirogira* sp. (în continuare preparatul Reglalg, Autorizație AA nr. 0448 eliberată din 21.02.2003 de Centrul de Stat pentru Atestarea Produselor Chimice și Biologice de Protecție și Stimulare a Plantelor. Grupa a 4-a de toxicitate) prezintă un complex de substanțe biologice active, obținute din biomasa algei filamentoase verzi *Spirogira* sp. crescută în mediul organic timp de 10...12 zile,
35 uscată până la umiditatea de 5...7% și fărâmițată până la starea de praf, totodată înainte de extragere biomasa se tratează cu cloroform, apoi cu apă, iar extragerea finală se realizează cu alcool etilic în raport de 1:(4...6) cu diluția ulterioară cu apă. Soluția finală conține 5% de substanță uscată.

40 Avantajele procedurii propus constau în simplitatea lui, sporirea substanțială a biomasei acumulate, conținutului pigmentilor asimilatori și costul redus al preparatului.

Rezultatul constă în sporirea proliferării celulare și a acumulării biomasei calusului de *Rhodiola rosea* L. cu 38%, a concentrației clorofilei *a*, *b* și a carotenoidelor în celulele calusului cu 92%, 49% și, respectiv, 53% față de procedeu cunoscut.

Exemplu de realizare a invenției

45 Pentru inducerea calusului au fost prelevate frunze de la plantulele sterile de *Rhodiola rosea* L., obținute din semințe prealabil sterilizate. Segmente foliare cu dimensiunea de 0,3...0,5 cm au fost inoculate pe mediul MS suplimentat cu 1,5 mg/l BA și 0,5 mg/l ANA, agar 0,6% [1]. Valoarea pH-lui a fost ajustată până la 5,8, înainte de autoclavare. Pentru menținerea calusului, la fiecare 40 de zile de cultivare, fragmente de calus cu masa
50 de aproximativ 2 g erau transferate pe mediul MS proaspăt preparat [1].

O parte din explanți a fost cultivată pe mediul nutritiv MS [1] (cea mai apropiată soluție), alta – pe același mediu suplimentat după autoclavare cu soluție apoasă sterilizată de Reglalg în concentrație finală de 0,001% (invenția propusă). În așa fel, mediile de
55 cultivare se deosebeau numai prin prezența Reglalgului. Explanții celor două variante au fost cultivați la temperatura de 26°C, cu fotoperioada de 16 ore lumină (2000 lux) și 8 ore întuneric. Umiditatea relativă a aerului în camera de cultivare a fost egală cu 70%.

Pentru analiză de la fiecare variantă au fost luate câte 3 vase, au fost prelevate celulele calusului, masa proaspătă a lor fiind determinată prin cântărire. Ulterior din masa

calusului au fost extrași componenții clorofilieni, conținutul clorofilei *a*, *b* și al carotenoidelor fiind determinat prin metoda spectrofotometrică.

- 5 Conform datelor prezentate în tabel, calusurile cultivate conform celei mai apropiate soluții și conform invenției se deosebeau prin sporirea biomasei cu 38% și a conținutului clorofilei *a*, *b* și al carotenoidelor cu 92%, 49% și, respectiv, 53%. Prin urmare, suplimentarea mediului de cultivare cu un volum de soluție apoasă sterilizată de Reglalg a asigurat sporirea acumulării biomasei și a conținutului clorofilei *a*, *b* și al carotenoidelor în celulele calusului de *Rhodiola rosea* L. (vezi tabelul).

10

Tabel

Procedeu de cultivare	Biomasa calusului, g	Clorofila <i>a</i> , mg/g	Clorofila <i>b</i> , mg/g	Carotenoide, mg/g
Conform celei mai apropiate soluții	12 ± 0,16	1,27 ± 0,01	0,75 ± 0,04	1,14 ± 0,01
Conform invenției	16,6 ± 0,15	2,44 ± 0,03	1,12 ± 0,01	1,74 ± 0,03

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Călugăru-Spataru T. Optimizarea mediului de cultivare a calusului de *Rhodiola Rosea* L. și marcarea proteică a etapei de dezvoltare a lui. Materialele simpozionului științific internațional consacrat aniversării a 60-a de la fondarea Grădinii Botanice (Institut) a AȘM, Chișinău, 7-9 noiembrie 2010, p. 50-55

(57) Revendicări:

Procedeu de obținere a biomasei calusului de *Rhodiola rosea* L. *in vitro*, care include inocularea frunzelor prelevate de la plantulele sterile de *Rhodiola rosea* L. pe un mediu nutritiv, obținut prin adăugarea la mediul nutritiv agarizat Murashige-Skoog a 1,5 mg/l 6-benzilaminopurină și 0,5 mg/l acid α -naftilacetic, ajustarea pH-ului până la 5,8, autoclavare și adăugarea unei soluții apoase sterilizate de 5% de substanțe uscate obținute din biomasa algei verzi *Spirogira* sp. prin extragere cu etanol în cantitate de 0,1%, după care se efectuează cultivarea calusului în decurs de 40 zile la temperatura de 26°C și umiditatea relativă a aerului de 70% cu o fotoperioadă de 16 ore lumină și 8 ore întuneric.

Director Departament:

GUȘAN Ala

Examinator:

COLESNIC Inesa

Redactor:

LOZOVANU Maria

RAPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii

(21) Nr. depozit: s 2014 0133 (32) Data de prioritate recunoscută:
 (22) Data depozit: 2014.10.20 Raport de documentare internațională: ☐ da
 (67)* Nr. și data transformării cererii: a2014 0115, 2014.10.20, 2014.10.27
 (71) Solicitant: **INSTITUTUL DE GENETICĂ, FIZIOLOGIE ȘI PROTECȚIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD**
 (54) Titlul: **Procedeu de obținere a biomasei calusului de *Rhodiola rosea* L. *in vitro***

II. Clasificarea obiectului invenției:

(51) **Int.Cl:** *A01H 4/00* (2006.01)
A01H 5/12 (2006.01)
A61K 36/41 (2006.01)

III. Colecții și Baze de date de brevete cercetate (denumirea, termeni caracteristici, ecuații de căutare reprezentative)

MD - Intern « Documentare Invenții » (inclusiv cereri nepublicate; trunchiere automată stanga/dreapta):

A01H 4/00
A01H 5/12
A61K 36/41
Rhodiola, *Reglalg*, *Spirogira*, mediu nutritiv

EA, (Eapatis):

A01H 4/00
A01H 5/12
A61K 36/41
A01H 4/00
A01H 5/12
A61K 36/41
Rhodiola, *Spirogira*, *Родиола*, *спирогира*

IV. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate

V. Documente considerate a fi relevante

Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este	Numărul revendicării
------------	--	----------------------

	cazul, indicarea pasajelor pertinente	vizate
A	MD 3375 G2 2007.08.31	1
A, D	MD 634 G2 1996.12.31	1
A	MD 1659 G2 2001.05.31	1
A	MD 497 Z 2012.04.30	1
A, C	Călugăru-Spataru T. Optimizarea mediului de cultivare a calusului de <i>Rhodiola Rosea</i> L. și marcarea proteică a etapei de dezvoltare a lui. Materialele simpozionului științific internațional consacrat aniversării a 60-a de la fondare Grădinii Botanice (Institut) al AȘM, Chișinău, 7-9 noiembrie, p. 50-55 ISBN 978-9975-105-42-2.	1

*** categoriile speciale ale documentelor citate:**

A – document care definește stadiul anterior general	T – document publicat după data depozitului sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidență principiul sau teoria pe care se bazează invenția
X – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă când documentul este luat în considerație de unul singur	E – document anterior dar publicat la data depozit național reglementar sau după aceasta dată
Y – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe documente de aceeași categorie	D – document menționat în descrierea cererii de brevet
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expoziție sau la orice alte mijloace de divulgare	C – document considerat ca cea mai apropiată soluție
	& – document, care face parte din aceeași familie de brevete
P - document publicat înainte de data de depozit, dar după data priorității invocate	L – document citat cu alte scopuri

Data finalizării documentării 2015.01.29

Examinator COLESNIC Inesa