



MD 57 Z 2009.08.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **57** ⁽¹³⁾ **Z**
(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**

(21) Nr. depozit: s 2009 0036 (22) Data depozit: 2009.03.03	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2009.08.31, BOPI nr. 8/2009 (67)* Nr. și data transformării cererii: a 2009 0025, 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 *Stevia rebaudiana* Bertoni in vitro**

(57) **Rezumat:**

1
Invenția se referă la biotehnologie, în particular la un procedeu de micropropagare a plantelor de *Stevia rebaudiana* Bertoni in vitro.

Procedeul, conform invenției, include obținerea explantelor, sterilizarea, 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

2
5 concentrație de $(2,5...3,0) \cdot 10^{-3}\%$, totodată cultivarea se efectuează la o temperatură de 22...26°C, umiditatea relativă a aerului de 70%, cu o foto-perioadă de 16 și 8 ore zi și noapte 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 *Stevia rebaudiana* Bertoni *in vitro*.

Stevia rebaudiana Bertoni este o specie nouă pentru flora Europei și a Moldovei în particular. Această specie în prezent este în faza de introducere în cultura *in vitro* în mai multe țări ale lumii (SUA, Japonia, Coreia, Brazilia, Italia). Ea provine din America Latină, din Paraguay, unde populația băștinașă o folosește în calitate de „iarba mierii” și plantă medicinală deja de câteva secole. Principala calitate a *Steviei rebaudiana* este aceea de a furniza substanțe dulci cu un conținut de calorii foarte scăzut. Natura substanțelor dulci este cunoscută - frunzele conțin glicozide diterpene „stevozid”, dulceața cărora depășește dulceața zaharozei de circa 300 ori. Datorită calității de „superdulceață” și unor proprietăți curative ea este recomandată pentru nutriția bolnavilor de diabet. Deoarece la *Stevia rebaudiana* există o sterilitate completă a semințelor, pentru sterilizarea materialului inițial - segmentele explantelor (de tulpină, frunze, noduri, internoduri), prelevate din plantele donatoare de explante, s-a utilizat agent de înălbire pe bază de clor de 10%, timp de 20 minute.

Este cunoscut procedeul de obținere a răsadului de *Stevia rebaudiana* Bertoni, ce constă în multiplicarea plantelor de stevie prin culturi *in vitro*, secționarea plantelor multiplicare în butași cu 4...6 frunzulițe, înrădăcinarea și adaptarea lor la condițiile mediului înconjurător pe mediul nutritiv Knop timp de 14...15 zile și plantarea ulterioară în sol deschis [1].

Neajunsurile acestui procedeu sunt: coeficientul de micropropagare scăzut, faptul că nu toate explantele asigură inițierea creșterii meristemoizilor, de la baza cărora pornesc lăstarii și care au un procent foarte scăzut de înrădăcinare.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în sporirea coeficientului de multiplicare a plantelor de *Stevia rebaudiana* Bertoni pe calea modificării conținutului mediului nutritiv utilizat pentru micropropagare.

Procedeul, conform invenției, include obținerea explantelor, sterilizarea, 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 $(2,5...3,0) \cdot 10^{-3}\%$, 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 zi și noapte și intensitatea iluminării de 3000 lx.

Rezultatul invenției constă în sporirea embriogenezei somatice și regenerării plantelor.

Glicozidele steroidice au fost obținute din rădăcini de pătlăgele vinete *Solanum melongena* L. prin extracție cu apă la fierbere, prelucrarea extractului obținut cu butanol-1 și concentrare (SU 1473317 A1 1988.12.15).

Exemplu de realizare a invenției

Explantate de *Stevia rebaudiana* Bertoni, obținute în condiții sterile, s-au tratat cu agent de înălbire pe bază de clor de 15%, timp de 15 minute, spălându-se de 4...5 ori cu apă distilată sterilă. Explantate obținute ajungând la mărimea 7...10 cm, s-au segmentat și cultivat în condiții aseptice la hota cu flux de aer laminar steril. În vasele de sticlă de 50...100 ml s-au repartizat câte 15...20 ml de mediu nutritiv în fiecare vas. S-au sterilizat prin autoclavare, în faza de vapori 10 minute aerisire și 15 minute sterilizare în condițiile de presiune $p = 1 \text{ atm}$ și temperatură $t = 121^\circ\text{C}$, pH-ul a fost ajustat la 5,8...5,9.

În calitate de material inițial pentru inițierea micropropagării explantelor au servit segmentele de hipocotil și frunze prelevate din plantule, care au fost sterilizate. În vasele de sticlă de 50...100 ml s-au repartizat câte 15...20 ml de mediu nutritiv în fiecare vas. S-au sterilizat prin autoclavare, în faza de vapori 10 minute aerisire și 15 minute sterilizare în condițiile de presiune $p = 1 \text{ atm}$ și temperatură $t = 121^\circ\text{C}$, pH-ul a fost 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 22...26°C, umiditatea relativă a aerului de 70%, cu o fotoperioadă de 16 și 8 ore zi și noapte și intensitatea iluminării de 3000 lx.

O parte de explante (varianta 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 Knop - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,2 g/l, KH_2PO_4 - 0,2 g/l și $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 0,9 g/l.

A treia parte de explante au fost utilizate pe mediul de cultură de bază Murashige-Skoog, suplimentat cu Somelongozidă în concentrație de $2,5...3,0 \cdot 10^{-3}\%$.

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

MD 57 Z 2009.08.31

4

5 Utilizarea mediului $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,2 g/l, KH_2PO_4 - 0,2 g/l și $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 0,8 g/l - cea mai apropiată soluție, proliferarea explantelor s-a evaluat după 12 zile de la inoculare, la 20 zile s-a observat formarea și dezvoltarea calusului. Apariția plantulelor după 25 zile. Creșterea și dezvoltarea plantulelor s-a observat după 30 zile. În acest caz micropropagarea plantulelor a constituit $2 \cdot 10^5$ plante anual.

10 Pe al treilea mediu, conform invenției, proliferarea explantelor s-a evaluat 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 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 $(2,5 \dots 3,0) \cdot 10^{-3}\%$. În această variantă raportul optimal al ingredientelor prezentate în mediul nutritiv de cultură artificial sporește considerabil coeficientul de micropropagare a plantulelor de *Stevia rebaudiana* Bertoni - cu $4 \cdot 10^5$ plante anual. În această variantă s-a manifestat formarea structurilor calusale cu un potențial stimulator de 112,1% (38,6 mg/expl.), masa medie a unui explant regenerant a constituit 41,9...49,7 mg/expl. mugure, în raport procentual cu valori de 117,3...138,8%. În funcție de variabilitatea genetică de micropropagare a plantulelor *in vitro* capacitatea de regenerare este de 95,3...98,1%.

20

(57) Revendicări:

25 Procedeu de micropropagare a *Stevia rebaudiana* Bertoni *in vitro* care include obținerea explantelor, sterilizarea, 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 $(2,5 \dots 3,0) \cdot 10^{-3}\%$, totodată cultivarea se efectuează la o temperatură de $22 \dots 26^\circ\text{C}$, umiditatea relativă a aerului de 70%, cu o fotoperioadă de 16 și 8 ore zi și noapte și intensitatea iluminării de 3000 lx.

35

(56) Referințe bibliografice:

1. MD 1262 G2 1999.07.31

Șef Secție:

COLESNIC Inesa

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 0036 (22) Data depozit: 2009.03.03	(85) Data fazei naționale PCT: (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>Stevia rebaudiana</i> Bertoni <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): A01H 4/00 (2006.01) C12N 1/38 (2006.01) A01N 45/00 (2006.01) A61K 36/28 (2006.01) Termeni caracteristici, cuvinte-cheie, sinonime: a) limba română: micropropagare, mediu nutritiv Murashige-Skoog, explantare; glicozide steroidice; a) limba engleză: micropropagation, nutrient medium Murashige Scoog, explantation; steroid glicozides c) limba rusă: микроразмножение, питательная среда Мурасиге-Скуга, эксплантация;стероидные гликозиды		
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	RU 2080780 C1 1997.06.10	1
A	FR 2278267 A1 1976.02.13	1
A	WO 2005122752 A1 2005.12.29	1
A	BG 107956 A 2005.02.28	1
A	FR 2278267 A1 1976/02/13	1
A	MD 3375 G2 2007.08.31	1
A	MD 3899 B1 2009.05.31	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		2009.05.25
Examinatorul		GORDIENCO Maria