



MD 3375 F1 2007.08.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **3375** (13) **F1**  
(51) Int. Cl.: *A01H 4/00* (2006.01)  
*A01H 5/04* (2006.01)  
*A01H 5/06* (2006.01)  
*A61K 36/41* (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

| Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi<br>revocată în termen de 6 luni de la data publicării                                                                                                                                                                                                  |                                                                                            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| (21) Nr. depozit: a 2007 0082<br>(22) Data depozit: 2007.03.23                                                                                                                                                                                                                                                 | (45) Data publicării hotărârii de<br>acordare a brevetului:<br>2007.08.31, BOPI nr. 8/2007 |
| (71) Solicitant: INSTITUTUL DE GENETICĂ ȘI FIZIOLOGIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE<br>ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD<br>(72) Inventatori: CĂLUGĂRU Tatiana, MD; DELEAN Tatiana, MD; DASCALIUC Alexandru, MD<br>(73) Titular: INSTITUTUL DE GENETICĂ ȘI FIZIOLOGIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE<br>ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD |                                                                                            |

(54) **Procedeu de micropropagare a plantelor de *Rhodiola rosea L. in vitro***

(57) **Rezumat:**

1  
Invenția se referă la biotehnologie și poate fi  
utilizată pentru micropropagarea plantelor de  
*Rhodiola rosea L. in vitro*.

Procedeu include cultivarea minirizomilor și a  
explantelor de pe minirizomi, obținute din mugurii  
axilari pe mediul nutritiv agarizat Murashige-  
Skoog, ce conține suplimentar cărbune activat în  
cantitate de 1200 mg/l, având pH-ul 6,5, la o tem-

2  
peratură de 26°C și umiditatea relativă a aerului de  
70% cu o fotoperioadă de 16 ore și intensitatea  
iluminării de 1000 lx.

5  
Rezultatul invenției constă în sporirea co-  
eficientului de multiplicare a plantelor de *Rhodiola*  
*rosea L.*, pe baza majorării intensității de formare a  
lăstarilor.

Revendicări: 1

10

MD 3375 F1 2007.08.31

**Descriere:**

Invenția se referă la biotehnologie și poate fi utilizată pentru micropropagarea plantelor de *Rhodiola rosea* L. *in vitro*.

5 *Rhodiola rosea* L. este o plantă medicinală prețioasă, din familia *Crassulaceae*, care crește spontan în diferite regiuni ale globului, inclusiv munții Carpați. Rizomii de *Rhodiola rosea* L. acumulează și sintetizează substanțele biologic active, care manifestă proprietăți adaptogene, biostimulatoare și antioxidante.

Datorită acestor proprietăți *Rhodiola rosea* L. se colectează intensiv, de aceea este o plantă pe cale de dispariție.

10 Restabilirea populațiilor de *Rhodiola rosea* L. în condiții naturale durează 10...15 ani. Totodată, multiplicarea prin semințe este anevoioasă din cauza mărimii infime a lor (1 g de semințe de *Rhodiola rosea* L. conține circa 7000 de semințe).

15 Este cunoscut procedeul de micropropagare a plantelor de *Rhodiola rosea* L., ce constă în activarea meristemelor axilare de la baza lăstarilor. Pentru activarea și creșterea intensivă a mugurilor de la baza lăstarilor, explantele primare au fost cultivate pe un mediu nutritiv de bază, ce conține săruri minerale după Murashige-Skoog (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) suplinit cu 6-benzilamino-purină 0,2 mg/dm<sup>3</sup> și acid indolilacetic 0,1 mg/dm<sup>3</sup>, agar 0,6%, valoarea pH-lui fiind ajustată la 5,8 până la autoclavare [1].

20 Neajunsurile acestui procedeu sunt coeficientul de micropropagare scăzut, nu toate explantele asigură inițierea creșterii mugurilor axilari de la baza lăstarilor (de la o plantă este posibil de a obține aproximativ 100 de plante pe parcursul unui an).

Problema pe care o rezolvă invenția constă în sporirea coeficientului de multiplicare a plantelor de *Rhodiola rosea* L.

25 Esența invenției constă în aceea că se propune un procedeu de micropropagare a plantelor *Rhodiola rosea* L. *in vitro*, care include cultivarea minirizomilor și a explantelor de pe minirizomi, obținute din mugurii axilari pe mediul nutritiv agarizat Murashige-Skoog, la o temperatură de 26 °C și umiditatea relativă a aerului de 70% cu o fotoperioadă de 16 ore, totodată mediul nutritiv conține suplimentar cărbune activat în cantitate de 1200 mg/l, pH-ul fiind ajustat până la 6,5, iar intensitatea iluminării fiind de 1000 lx.

30 Rezultatul invenției constă în sporirea coeficientului de multiplicare a plantelor de *Rhodiola rosea* L. pe baza majorării intensității de formare a lăstarilor. De la o plantă se pot obține până la 4800 de plante pe parcursul unui an.

*Exemplu de realizare a invenției*

35 Plantele de *Rhodiola rosea* L. au fost obținute din semințe colectate din munții Carpați din România. Pentru a asigura sterilizarea ele au fost tratate cu agent de înălbire pe bază de clor de 20% pe parcursul a 7 min și spălate de trei ori cu apă sterilă. Germinarea semințelor și creșterea plantulelor a fost realizată pe mediul nutritiv agarizat Murashige-Skoog, ce conține suplimentar cărbune activat în cantitate de 1200 mg/l, având pH-ul 6,5, la o temperatură de 26°C și umiditatea relativă a aerului de 70%, cu o fotoperioadă de 16 ore și intensitatea iluminării de 1000 lx.

40 În calitate de material inițial au servit plantulele în vârstă de 6 luni.

O parte de explante (variante de control) au fost cultivate pe mediul nutritiv Murashige-Skoog, ce conținea săruri minerale, mg/l: NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> – 1650, KNO<sub>3</sub> – 1900, MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O – 370, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 170, CaCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O – 440, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> – 6,2, MnSO<sub>4</sub>•4H<sub>2</sub>O – 22,3, CoCl<sub>2</sub>•6H<sub>2</sub>O – 0,025, CuSO<sub>4</sub>•5H<sub>2</sub>O – 0,025, ZnSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O – 8,6, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O – 0,25, KI – 0,83, FeSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O – 27,8, Na<sub>2</sub>EDTA – 37,3.

45 Altă parte a fost cultivată pe mediul Murashige-Skoog suplimentat cu regulatori de creștere: 6 – benzilaminopurină și acid indolilacetic, valoarea pH-lui a fost ajustată înainte de autoclavare până la 5,8.

50 A treia parte de explante a fost cultivată pe mediul nutritiv Murashige-Skoog suplimentat cu cărbune activat 1200 mg/l. Valoarea pH-lui a fost ajustată înainte de autoclavare până la 6,5. În așa fel mediile de cultivare se deosebeau după conținutul unor componente. Explantele celor trei variante au fost cultivate la temperatura de 26 °C și umiditatea relativă a aerului de 70%, cu o fotoperioadă de 16 ore și intensitatea iluminării de 1000 lx.

55 Creșterea și dezvoltarea mugurilor axilari de la baza lăstarilor pe mediul nutritiv Murashige-Skoog a fost observată după 5...7 zile de la momentul inoculării, iar după 30 zile lăstarii au atins înălțimea de 1,5...2 cm. După încă 14 zile au apărut lăstari noi. În decurs de 48...56 zile de pe fiecare inocul lăstarii au fost detașați și ulterior inoculați pentru rizogeneză. În cazul inoculilor ce conțineau cărbune activat s-a recurs și la secționarea rizomului în minirizomi, care erau cultivați în continuare la intervale de 48...56 zile, cu obținerea a 7 cicluri de minirizomi.

## MD 3375 F1 2007.08.31

4

Plantele cultivate în decurs de 48...56 zile, după metoda cunoscută și cea propusă se deosebeau prin aceea că în primul caz s-au format 5...8 lăstari, iar în al doilea caz 16...20 de lăstari. Prin urmare, adăugarea cărbunelui activat stimulează formarea numărului de lăstari. Un efect pozitiv are și valoarea pH-ului, care sporește efectiv coeficientul de micropropagare a plantelor de *Rhodiola rosea* L.

5

### (57) Revendicare:

10       Procedeu de micropropagare a plantelor *Rhodiola rosea* L. *in vitro*, care include cultivarea minirizomilor și a explantelor de pe minirizomi, obținute din mugurii axilari pe mediul nutritiv agarizat Murashige-Skoog, la o temperatură de 26 °C și umiditatea relativă a aerului de 70% cu o fotoperioadă de 16 ore, **caracterizat prin aceea că** mediul nutritiv conține suplimentar cărbune activat în cantitate de 1200 mg/l, pH fiind ajustat până la 6,5, iar intensitatea iluminării fiind de 1000 lx.

15

### (56) Referințe bibliografice:

1. Ишмуратова М. Растительные ресурсы. Клональное микроразмножение *Rhodiola rosea* L. и *R. iremelica* Boriss. *in vitro*. Т.34, 1998, вып. 1, p. 12-23

Șef Secție:

GROSU Petru

Examinator:

DUBĂSARU Nina

Redactor:

LOZOVANU Maria

## RAPORT DE DOCUMENTARE

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (21) Nr. depozit: a 2007 0082                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | (85) Data fazei naționale PCT:                                                                                                                                                                                                                                               |
| (22) Data depozit: 2007.03.23                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | (86) Cerere internațională PCT:                                                                                                                                                                                                                                              |
| (51) : <b>Int.Cl:</b> <i>A01H 4/00</i> (2006.01)<br><i>A01H 5/04</i> (2006.01)<br><i>A01H 5/06</i> (2006.01)<br><i>A61K 36/41</i> (2006.01)<br>Alți indici de clasificare:<br><b>Titlul</b> : Procedeu de micropropagare a plantelor de <i>Rhodiola rosea</i> L. in vitro<br>(71) Solicitantul : INSTITUTUL DE GENETICĂ ȘI FIZIOLOGIE A PLANTELOR AL<br>ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD<br>Termeni caracteristici :<br>a) limba română: micropropagare, mediu nutritiv Murashige Scooge, explantare<br>b) limba engleză: micropropagation, nutrient medium Murashige Scooge, explantation<br>c) limba rusă :микроразмножение, питательная среда Murashige Scooge , эксплантация |                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| I. Minimul de documente consultate (sistema clasificării și indici de clasificare Int. Cl.-8                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| MD Perioada 1993 – 2007                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| EA Perioada 1996 – 2007                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| SU Perioada 1972 – 1993                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| II. Documente considerate ca relevante                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Categoria*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Date de identificare ale documentelor citate si indicarea pasajelor pertinente                                                                                                                                                                                               |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 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                                                                                                     |
| Numărul revendicării vizate                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 1                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| <input type="checkbox"/> Documentele următoare sunt indicate în continuare a rubricii II                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | <input type="checkbox"/> Informația referitoare la brevete paralele se anexează                                                                                                                                                                                              |
| * categoriile speciale ale documentelor consultate:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | P - document publicat înainte de data de depozit dar după data priorității invocate                                                                                                                                                                                          |
| A - document care definește stadiul anterior general                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | T - document publicat după data de depozit sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidența principiul sau teoria care conține baza invenției                                                     |
| E - document anterior dar publicat la data de depozit național reglementar sau după aceasta data                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | X - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă                                                                                                                                                    |
| L - document care poate pune în discuție data priorității invocate, poate contribui la determinarea datei publicării altor divulgări sau pentru un motiv expres ( se va indica motivul)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Y - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă cand documentul este asociat cu unul sau mai multe alte documente de aceeași natură, aceasta combinație fiind evidentă pentru o persoană de specialitate |
| O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expunere sau orice altă                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | & - document care face parte din aceeași familie de documente                                                                                                                                                                                                                |
| Data finalizării documentării 2007.05.31                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Examinatorul DUBĂSARU Nina                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                              |



