



MD 605 Y 2013.03.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **605** (13) **Y**
(51) Int.Cl: *A01H 4/00* (2006.01)
A01H 5/04 (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 2012 0098 (22) Data depozit: 2012.07.09	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2013.03.31, BOPI nr. 3/2013
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE GENETICĂ ȘI FIZIOLOGIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD (72) Inventatori: CĂLUGĂRU-SPĂTARU Tatiana, MD; DASCALIUC Alexandru, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE GENETICĂ ȘI FIZIOLOGIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	

(54) **Procedeu de micropropagare a plantelor de *Actinidia arguta in vitro***

(57) Rezumat:

1

2

Invenția se referă la biotehnologie, în particular la un procedeu de micropropagare a plantelor de *Actinidia arguta in vitro*.

Procedeul, conform invenției, include inocularea mugurilor laterali ai minibutașilor și cultivarea lăstarilor obținuți cu inducerea rizogenezei pe un mediu nutritiv, care conține ½ săruri minerale față de mediul Murashige-

5 Skoog și suplimentar cărbune activat 1200 mg/L, totodată cultivarea se efectuează la temperatura de 26°C, umiditatea relativă a aerului de 70%, cu o fotoperioadă de 16 ore lumină, intensitatea iluminării de 1000 lx și pH-ul 5,8.

Revendicări: 1

15

MD 605 Y 2013.03.31

(54) Process for microclonal propagation of *Actinidia arguta* plants *in vitro*

(57) Abstract:

1
The invention relates to biotechnology, in particular to a process for microclonal propagation of *Actinidia arguta* plants *in vitro*.

The process, according to the invention, includes inoculation of lateral buds of minicuttings and cultivation of the obtained shoots with rhizogenesis induction on a nutrient medium containing ? of mineral salts with respect to the Murashige-Skoog medium

2
and additionally activated coal 1200 mg/L, at the same time cultivation is carried out at a temperature of 26°C, air relative humidity of 70%, with a photoperiod of 16 hours of light, light intensity of 1000 lux and pH 5.8.

Claims: 1

(54) Способ микроклонального размножения растений *Actinidia arguta* *in vitro*

(57) Реферат:

1
Изобретение относится к биотехнологии, в частности к способу размножения растений *Actinidia arguta* *in vitro*.

Способ, согласно изобретению, включает инокуляцию боковых почек мини-черенков и выращивание полученных побегов с индукцией ризогенеза на питательной среде, содержащей ? минеральных

2
солей по отношению к среде Мурасиге-Скуга и дополнительно активированный уголь 1200 мг/л, при этом культивирование осуществляют при температуре 26° С, относительной влажности воздуха 70%, при фотопериоде 16 часов света, интенсивности освещения 1000 люкс и pH 5,8.

П. формулы: 1

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie, în particular la un procedeu de micropropagare a plantelor de *Actinidia arguta in vitro*.

5 *Actinidia arguta* este o plantă liană, aparține familiei *Actinidaceae*, care cuprinde mai mult de 60 specii. În natură specia se întâlnește în sudul Siberiei, Manciuria, Nordul Chinei, Coreea, Japonia până la altitudini de 600 metri. Plantele de *Actinidia arguta* cresc în general în pădurile de conifere, mixte sau la marginea acestora. *Actinidia arguta* atinge în lungime 25 m, iar în grosime 15...18 cm. Durata vieții acestei plante poate depăși vârsta de 100 ani.

10 *Actinidia arguta* este o specie care se cultivă ca plantă ornamentală și pentru obținerea fructelor. Deoarece plantele sunt heterozigote, mărimea și calitatea fructelor la plantele obținute din semințe pot varia foarte mult, de aceea este necesară multiplicarea vegetativă a genotipurilor valoroase. Dintre aceste genotipuri a fost aleasă linia Tatiana. Fructele acestei linii au o aromă similară cu cea de kiwi, care a fost descrisă că fiind o combinație a aromelor de căpșune, pepene galben, banane, smochine și coacăză, având totodată și particularități distincte. Gustul lor variază de la astringent, în timpul coacerii devreme, până la dulce la maturare deplină.

15 Raportul vitaminei C în fructul de mini-kiwi este același ca la kiwi, și anume de 37...85 mg/100 g în produsul proaspăt. În medicina tradițională, fructele de *Actinidia arguta* sunt utilizate pentru tratarea bronșitei, tuberculozei, tusei convulsive, scorbutului, cariei, stomatitei etc. *Actinidia arguta* este numită fructul sănătății

Doar consumarea a 2...3 fructe poate satisface necesitatea zilnică de vitamina C. Sucul din fructele de mini-kiwi dilată vasele sangvine, reduce tensiunea arterială, stimulează activitatea inimii.

25 Înmulțirea *Actinidia arguta* se realizează vegetativ, cu dificultăți mai pronunțate decât vița de vie. Din această cauză am elaborat un procedeu de micropropagare a plantelor în condițiile *in vitro*. Micropropagarea a fost realizată la linia de mini-kiwi Tatiana, dar ea este aplicabilă pentru specia de *Actinidia arguta* în general.

30 Este cunoscut procedeu de micropropagare a plantelor de *Actinidia arguta*, ce constă în activarea mugurilor laterali. Pentru activarea și creșterea intensivă a mugurilor laterali, explantii primari au fost cultivați pe un mediu nutritiv de bază cu conținut de săruri minerale după Murashige-Skoog (Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio- assays with tabaco tissue cultures Physiology Plantarum, 1962, v.15, N 95, p.473) și suplimentat cu 6-benzilaminopurină – 1,0 mg/l, agar – 0,6%; valoarea pH-lui a fost ajustată la 5,8 până la autoclavare [1].

35 Însă acest procedeu are un dezavantaj, ce se manifestă prin perioada lungă de micropropagare, realizată în două etape:

- 1) proliferarea lăstarilor din mugurii laterali;
- 2) inducerea rizogenezei.

40 Dezavantajele menționate pot fi înlăturate cu ajutorul procedurii revendicate.

Problema pe care o rezolvă invenția propusă constă în micșorarea perioadei de micropropagare, sporirea coeficientului de multiplicare a plantelor și, respectiv, diminuarea cheltuielilor pentru a obține o plantă nouă de *Actinidia arguta*.

45 Procedeu de micropropagare a plantelor de *Actinidia arguta in vitro* include inocularea mugurilor laterali ai minibutașilor și cultivarea lăstarilor obținuți cu inducerea rizogenezei pe un mediu nutritiv, care conține ½ săruri minerale față de mediul Murashige-Skoog și suplimentar cărbune activat 1200 mg/L, totodată cultivarea se efectuează la temperatura de 26°C, umiditatea relativă a aerului de 70%, cu o fotoperioadă de 16 ore lumină, intensitatea iluminării de 1000 lx și pH-ul 5,8.

50 Avantajele invenției sunt:

– posibilitatea de a obține în decurs de 10...12 săptămâni dintr-un explant 7...9 lăstari (invenția), în comparație cu 6...7 lăstari dintr-un explant în 14...16 săptămâni (cea mai apropiată soluție);

55 – sporirea coeficientului de micropropagare anuală de la aproximativ 300 plante anual (cea mai apropiată soluție) până la 8000 plante (conform invenției);

– în comparație cu cea mai apropiată soluție, procesul de micropropagare a plantelor de *Actinidia arguta* prin procedeu propus se caracterizează prin reducerea timpului de

menținere *in vitro* din contul timpului consumat pentru inducerea rizogenezei cu aproximativ 25% și diminuarea numărului de explanți necesari pentru multiplicare cu 20%.

Rezultatul invenției constă în sporirea coeficientului de multiplicare de la 300 plante anual (cea mai apropiată soluție) până la 8000 (invenția propusă) plante de *Actinidia arguta*, datorită modificării conținutului mediului nutritiv ($\frac{1}{2}$ săruri minerale după Murashige-Skoog și suplimentarea cu cărbune activat). Aceste modificări provoacă creșterea lăstarilor cu majorarea numărului de internoduri (ceia ce sporește coeficientul potențial de multiplicare) și paralel, inducerea rizogenezei, cu formarea unui sistem radicular bine dezvoltat.

10 *Exemplu de realizare a invenției*

Plantele de *Actinidia arguta* au fost obținute din butașii plantelor în vârstă de 8 ani, colectați din lizimetrele IGFP al AȘM. Pentru a asigura sterilizarea, ele au fost tratate cu agent de înălbire pe bază de clor de 20% pe parcursul a 15 min și spălate de trei ori cu apă sterilă. Inocularea lăstarilor și creșterea plantulelor a fost realizată pe mediul nutritiv Murashige-Skoog (MS), la o temperatură de 26°C, cu o fotoperioadă de 16 ore/zi și 8 ore/noapte, iar intensitatea iluminării de 1000 lux.

O parte din minibutași (variante de control) a fost cultivată pe mediul nutritiv Murashige-Skoog, cu următorul conținut de microelemente și 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, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 440, 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, KI – 0,83, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 27,8, $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 37,3.

Altă parte a fost cultivată pe mediul nutritiv Murashige-Skoog supliment cu 6-benzilaminopurină, valoarea pH-ului a fost ajustată înainte de autoclavare până la 5,8 (cea mai apropiată soluție).

A treia parte de minibutași a fost cultivată pe mediul nutritiv Murashige-Skoog, ce conținea $\frac{1}{2}$ săruri minerale indicate în varianta de control, suplimentat cu cărbune activat 1200 mg/l, pH-ul fiind 5,8, fără fitohormoni (conform invenției). În așa fel mediile de cultivare se deosebeau după conținutul unor componente. Minibutașii din cele trei variante au fost cultivați la temperatura de 26°C, umiditatea relativă a aerului de 70%, cu o fotoperioadă de 16 ore/zi și 8 ore/noapte, intensitatea iluminării de 1000 lux.

Creșterea și dezvoltarea lăstarilor de la baza mugurilor laterali și a rădăcinilor la cultivarea explantelor pe mediul nutritiv Murashige-Skoog conform invenției s-a observat la 7...10 zile de la momentul inoculării, iar după 30 zile lăstarii au atins în înălțime 3...5 cm. După 10...12 săptămâni de la momentul inoculării fiecare plantă a fost secționată în minibutași, care ulterior au fost inoculați pentru următorul ciclu de dezvoltare pe același mediu nutritiv. În așa fel, pe același mediu nutritiv a fost posibilă atât inițierea culturii *in vitro*, cât și cultivarea minibutașilor pentru a obține plantule, care sunt pregătite pentru cultivarea în condițiile *ex vitro*. În cazul celei mai apropiate soluții, lăstarii cultivați după 30 zile atingeau înălțimea de numai 1,5...2 cm.

Spre deosebire de cea mai apropiată soluție, care prevedea introducerea și cultivarea inițială a minibutașilor pe un mediu nutritiv, iar rizogeneza pe alt mediu nutritiv (două etape de cultivare *in vitro*), procedeul revendicat prevede cultivarea *in vitro* pe un singur mediu nutritiv, într-o singură etapă. În așa fel procedeul revendicat face posibilă micșorarea de două ori a cheltuielilor de reagenți pentru cultivarea *in vitro* (după metoda cunoscută și cea propusă), diminuarea duratei de cultivare *in vitro* pentru obținerea unei noi generații de plantule de la 14...16 săptămâni până la 10...12 săptămâni; sporirea coeficientului de micropropagare de la 6 la 8 săptămâni. Pe parcursul a trei cicluri s-au obținut aproximativ 700 de plante (conform invenției), față de cele 300 plante din cea mai apropiată soluție, luând în considerație că în conformitate cu invenția propusă se obțin până la patru cicluri și jumătate pe parcursul unui an, față de cele trei cicluri din cea mai apropiată soluție.

Prin urmare, procedeul revendicat permite de a diminua de două ori cheltuielile pentru reagenți și de 1,77 ori durata menținerii *in vitro* pentru a obține o nouă generație pregătită pentru transferul *ex vitro*; de a spori de 26 ori numărul de plantule multiplicare pe parcursul unui an utilizând aceeași suprafață de cultivare.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Высоцкий В.А., Бартенева Л. Б. Особенности клонального микроразмножения актинидии. Биология культивируемых клеток и биотехнология растений. Москва, Наука, 1991, с. 213-216

(57) Revendicări:

Procedeu de micropropagare a plantelor de *Actinidia arguta in vitro*, care include inocularea mugurilor laterali ai minibutașilor și cultivarea lăstarilor obținuți cu inducerea rizogenezei pe un mediu nutritiv, care conține ½ săruri minerale față de mediul Murashige-Skoog și suplimentar cărbune activat 1200 mg/L, totodată cultivarea se efectuează la temperatura de 26°C, umiditatea relativă a aerului de 70%, cu o fotoperioadă de 16 ore lumină, intensitatea iluminării de 1000 lx și pH-ul 5,8.

Șef Secție:

IUSTIN Viorel

Examinator:

BODRUG Viorica

Redactor:

LOZOVANU Maria

RAPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii
(21) Nr. depozit: s 2012 0098 (22) Data depozit: 2012.07.09 (71) Solicitant: INSTITUTUL DE GENETICĂ ȘI FIZIOLOGIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD (54) Titlul: Procedeu de micropropagare a plantelor de <i>Actinidia arguta in vitro</i>
II. Clasificarea obiectului invenției:
(51) Int.Cl: A01H 4/00 (2006.01) A01H 5/04 (2006.01)
III. Colecții și Baze de date de brevete cercetate (denumirea, termeni caracteristici, ecuații de căutare reprezentative)
MD a) Int.Cl: A01H 4/00 A01H 5/04 b) limba română: micropropagare, mediu nutritiv Murashige Scooge, cărbune activ, cultivarea lăstarilor. Espacenet a) Int.Cl: A01H 4/00 A01H 5/04 b) limba engleză: micropropagation, Murashige Scooge nutrient medium, active coal, cultivatoin of sprouts. Eapatis a) Int.Cl: A01H 4/00 A01H 5/04 b)) limba rusă :микроразмножение, питательная среда Murashige Scooge, активированный уголь, культивирование побегов. SU a) Int.Cl: A01H 4/00 A01H 5/04 b) limba rusă :микроразмножение, питательная среда Murashige Scooge , активированный уголь, культивирование побегов.
IV. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate
1. Высоцкий, В.А. Бартенева Л. Б. Особенности клонального микроразмножения актинидии // Биология культивируемых клеток и биотехнология растений - М.: Наука, 1991.с. 213-216 2. Ишмуратова М.М. Растительные ресурсы. Клональное микроразмножение <i>Rhodiola rosea L.</i> и <i>R. iremelica</i> Boriss. <i>in vitro</i>. Т.34, 1998,

вып. 1, с. 12-23

3.Катева Н. В., Бутенко Р.Г. Принципы микрклонального размножений на примере герберы. Известия АН СССР, Серия Биологическая, 1982, № 1 с. 126-129

4. Biotehnologii vegetale aplicate la cais (Prunus Armeniaca L.) București 2010, pag. 18-19

V. Documente considerate a fi relevante

Categoria* Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor
pertinente Numărul revendicării

vizate

A,D, C Высоций, В.А. Бартенева Л. Б. Особенности клонального микроразмножения
актинидии // Биология культивируемых клеток и биотехнология растений - М.: Наука, 1991.с.
213-216 1

A MD 3375 G2 2008.04.30 1

A RU 2010146375 A 20.05.2012 1

A

Florea Bianca-Mirela, Biotehnologii vegetale aplicate la cais (Prunus Armeniaca L.) București 2010,
pag.18-19

1

A RO 127795 AO 28.09.2012 1

A MD 31 Z 2009.06.30 1

A MD 57 Z 2009.08.31 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 SU 169585 A1 1991.12.07 1

A RU 2279212 C2 2006.07.10 1

A RU 2180165 C2 2002.10.03 1

A EP 0244211 A 1987.11.04 1

A RU 2080780 C1 1997.06.10 1

A US 4338745 A 1982.07.13 1

A SU 1473317 A1 1987.08.14 1

A 2273987 C2 2004.02.24 1

A 2123256 C1 1998.12.20 1

A Ишмуратова М.М. Растительные ресурсы.

Клональное микроразмножение *Rhodiola rosea* L. и *R. iremelica* Boriss. in vitro. Т.34, 1998, вып.
1, с. 12-23

1

A Катаева Н.В., Бутенко Р.Г. Принципы микрклонального размножения растений на
примере герберы.

Известия АН СССР, Серия Биологическая, 1982, №1, с. 126-129 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
revendicăată nu poate fi considerată nouă sau
implicând activitate inventivă când
documentul este luat în considerație de unul

E – document anterior dar publicat la data depozit
național reglementar sau după aceasta dată

singur	
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	
Examinator	
BODRUG Viorica	