



MD 46 Z 2009.07.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **46**⁽¹³⁾ **Z**
(51) Int. Cl.: *A01H 4/00* (2006.01)
C12N 5/04 (2006.01)
A01N 27/00 (2006.01)
A61K 36/28 (2006.01)

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

(21) Nr. depozit: s 2009 0042 (22) Data depozit: 2009.03.03	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2009.07.31, BOPI nr. 7/2009 (67)* Nr. a 2009 0026 și data transformării cererii: 2009.03.27
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE GENETICĂ ȘI FIZIOLOGIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD (72) Inventatori: CALALB Tatiana, MD; JACOTĂ Anatol, MD; BUJOREANU Nicolae, MD; CHIRILOVA Eleonora, MD; BEJAN Nina, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE GENETICĂ ȘI FIZIOLOGIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	

(54) **Procedeu de obținere *in vitro* a biomasei de fructe de *Aronia melanocarpa***

(Michx.) Elliot

(57) **Rezumat:**

1
Invenția se referă la biotehnologie.
Procedeul, conform invenției, include obținerea *in vitro* a explantelor din fructe de *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot, cultivarea lor pe mediul nutritiv Murashige-Skoog, care conține suplimentar: acid naftilacetic 3,0...3,5 mg/L;

2
kinetină 0,5 mg/L; zaharoză 60 g/L, având pH 5,7,
5 totodată cultivarea se efectuează la temperatura de 18...22°C, cu fotoperioada zi-noapte respectiv de 16 și 8 ore.
Revendicări: 1

10

MD 46 Z 2009.07.31

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie.

Fructele de *Aronia melanocarpa* caracterizate printr-un conținut fenolic (flavonoide, inclusiv antociani, acizi fenilpropionici, taninuri) cu proprietăți antioxidante, vasoconstrictoare, hipotensive, antiradiante sunt solicitate ca sursă de medicament și aliment sănătos. Deoarece satisfacerea necesităților crescând de fructe de aronie prin metodele tradiționale *in vitro* este problematică (dependența de rotația sezonieră, consecințele crizei ecologice și ale calamităților naturale, aplicarea măsurilor agrotehnice și de protecție sezoniere anevoioase și costisitoare), s-a încercat obținerea biomasei antocianifere de fructe de aronie în condiții *in vitro* ca alternativă la creșterea fructelor.

Este cunoscut procedeul de obținere a biomasei de fructe de *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot de culoare verde din explante prelevate de la fructele de aronie pe mediu nutritiv Murashige-Skoog, care conține suplimentar, mg/L: acid 2,4-diclorfenoxiacetic 2,0; kinetina 0,5; zaharoză 60, având pH 5,7. Cultivarea se efectuează la temperatura de 22...24°C, cu fotoperioada zi-noapte respectiv de 16 și 8 ore și condiții aseptice [1].

Neajunsurile acestui procedeu constau în aceea că prin inocularea explantelor de aronie pe medii nutritive aseptice cu formula hormonală descrisă se obține *in vitro* biomasa asimilatoare de fructe de culoare verde cu conținutul fenolic minim.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în obținerea biomasei antocianifere de fructe de aronie de culoare violacee, bogată în conținut fenolic în condiții controlate, ecologic pure, dirijate, în flux continuu ca alternativă la obținerea biomasei de fructe de aronie de culoare verde cu conținut fenolic minim.

Procedeul, conform invenției, include obținerea *in vitro* a explantelor din fructe de *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot, cultivarea lor pe mediu nutritiv Murashige-Skoog, care conține suplimentar: acid naftilacetic 3,0...3,5 mg/L; kinetina 0,5 mg/L; zaharoză 60 g/L, având pH 5,7, totodată cultivarea se efectuează la temperatura de 18...22°C, cu fotoperioada zi-noapte respectiv de 16 și 8 ore.

Rezultatul invenției constă în obținerea garantată a biomasei de fructe de aronie *in vitro*, îmbogățită cu conținut fenolic, în flux continuu, în condiții controlate, ecologic pure, independent de rotația sezonieră, calamitățile naturale și condițiile pedoclimatice.

Exemplu de realizare a invenției

O parte de explante din fructe de *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot (variante de control) a fost inoculată pe mediu nutritiv Murashige - Skoog, cu conținut de săruri minerale, mg/mL: 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, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 223, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,025, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,025, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 9,6, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,25, KI 0,83, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 27,8, Na_2EDTA 37,3 (Murashige T., Skoog F. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, Physiology Plantarum, 1962, V. 15, nr. 95, p. 473-497).

A doua parte de explante din fructe de *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot a fost inoculată în condiții aseptice pe mediu nutritiv cu săruri minerale Murashige-Skoog suplimentat cu reglatori de creștere: acid 2,4-diclorfenoxiacetic 2,0 mg/L, kinetina 0,5 mg/L; zaharoză 30 g/L, având pH-ul 5,7, la temperaturi de 22...24°C și condiții aseptice cu fotoperioada zi-noapte respectiv de 16 și 8 ore (cea mai apropiată soluție).

A treia parte de explante, prelevate de la fructele de aronie, au fost sterilizate cu agent chimic „Diacid” timp de 7 min, spălate de 3 ori cu apă bidistilată sterilă. Explantele au fost inoculate pe mediu nutritiv Murashige-Skoog suplimentat cu reglatori de creștere: acid naftilacetic 3,5 mg/L, kinetina 0,5 mg/L; zaharoză 60 g/L, având pH-ul 5,7, cu fotoperioada zi-noapte respectiv de 16 și 8 ore, la temperaturi de 18...22°C și condiții aseptice.

Pe mediu nutritiv de control a fost observată doar calusarea incipientă a explantelor la a 12-a...14-a zi de la momentul inoculării, iar la a 20-a zi a fost fixată necrotizarea.

A doua parte de explante a generat o biomasă de fructe viabilă, de culoare verde, la a 5-a...36-a zi de la inoculare, cu un conținut minim de compuși fenolici (tabelul).

MD 46 Z 2009.07.31

4

Tabel

Obținerea *in vitro* a biomasei de fructe de aronie

Componenta mediului nutritiv	Regim de lumină	Tempe-ratura, °C	Rezultate	Conținutul fenolic		
				Antociani, mg/100 g fructe	Flavonoide (g% rutozidă)	Taninuri, g%
MS + zaharoză (60 g/L) + ANA (3,0...3,5 mg/L) + K (0,5 mg/L) (invenția)	Fotoperioada zi/noapte – 16/8 ore	18...22	Biomasa de fructe violacee (antocianiferă)	680	0,483	11,2
MS + zaharoză (30 g/L) + 2,4-D (2,0 mg/L) + K (0,5 mg/L) (cea mai apropiată soluție)	Fotoperioada zi/noapte – 16/8 ore	22...24	Biomasa de fructe verde (clorofiliană)	156	0,230	2,6

5 MS – mediul Murashige - Skoog (1962); ANA – acid naftilacetic; 2,4-D – diclor-fenoxiacetic; K – kinetină.

10 In cazul explantelor inoculate pe mediul nutritiv Murashige-Skoog, suplimentat cu acid naftilacetic 3,0...3,5 mg/L, kinetină 0,5 mg/L; zaharoză 60 g/L, iar pH-ul ajustat la 5,7 și regimul de temperaturi 18...22°C s-a menționat inițierea calusogenezei la a 5-a...6-a zi și acumularea maximă de biomasă de fructe viabilă, de culoare violacee la a 26-a...30-a zi, caracterizată printr- un conținut sporit de compuși fenolici: antociani 680 mg/100 g de produs vegetal; flavonoide 0,483 g%; taninuri 11,2% (tabelul).

15

(57) Revendicări:

20 Procedeu de obținere *in vitro* a biomasei de fructe de *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot, care include cultivarea explantelor obținute din fructe de *Aronia melanocarpa* pe mediul nutritiv Murashige-Skoog, care conține suplimentar: acid naftilacetic 3,0...3,5 mg/L; kinetină 0,5 mg/L; zaharoză 60 g/L, avand pH 5,7, totodată cultivarea se efectuează la temperatura de 18...22°C, cu fotoperioada zi-noapte respectiv de 16 și 8 ore.

25

(56) Referințe bibliografice:

1. MD 3763 B1 2009.03.31

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 0042	(85) Data fazei naționale PCT:
(22) Data depozit: 2009.03.03	(86) Cerere internațională PCT:
Prioritatea invocată: (31) nr.: 32) data: 33) țara: (51) IPC: Int. Cl.: A01H 4/00 (2006.01) C12N 5/04 (2006.01) A01N 27/00 (2006.01) A61K 36/28 (2006.01) Alți indici de clasificare: Titlul: Procedeu de obținere <i>in vitro</i> a biomasei de fructe de <i>Aronia melanocarpa</i> (Michx.) Elliot (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: a) Indicii IPC (ultima redacție): A01H 4/00; C12N 5/04; C07 3/04 Termeni caracteristici, cuvinte-cheie, sinonime: - obținere <i>in vitro</i> ; explante obținute din fructe; biomasa de fructe, cultivate explantelor; acidnaftilacetic. - obtaining <i>in vitro</i> ; explants obtained from fruits; fruit biomass; explant cultivation; naphthylacetic acid.	
IV. Documente considerate a fi relevante	
Categoria	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente
A	1. Litwińcczuk W. Propagation of black chokeberry(<i>Aronia melanocarpa</i> Elliot) through <i>in vitro</i> culture. Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, 2002, Volume 5, N. 2, p.423-428.
A	2. <URL/http:> 478 ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ КАРТОФЕЛЯ В качестве эксплантов были взяты части проросших семян, почек ... Экспланты из семян стерилизовали 70%-ным этанолом в течение ... http://www.chem.asu.ru/confer/conf-2005/cprm-2005- ... заэкшированная страница Google:3
A	3. MD 3763 B1 2009.03.31
	Relevant față de revendicarea nr.
	1
	1
	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
---------------	-----------------