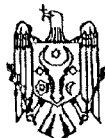




MD 1091 Y 2016.11.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **1091** (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 2016 0032 (22) Data depozit: 2016.03.04	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2016.11.30, BOPI nr. 11/2016
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE GENETICĂ, FIZIOLOGIE ȘI PROTECȚIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD (72) Inventatori: CĂLUGĂRU-SPĂTARU Tatiana, MD; CIOCÂRLAN Nina, 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 micropropagare a plantelor de *Mentha gattefossei* Maire *in vitro***

(57) **Rezumat:**

1

Invenția se referă la biotehnologie, și anume la un procedeu de micropropagare a plantelor de *Mentha gattefossei* Maire *in vitro*.

Procedeu, conform invenției, include inocularea minibutașilor și cultivarea lăstarilor obținuți din mugurii axilari cu inducerea rizogenezei pe un mediu nutritiv, care conține ½ săruri minerale față de mediul Murashige-

2

Skoog, 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 2000 lx și pH-ul 5,8, timp de 4...5 săptămâni.

Revendicări: 1

Figuri: 1

MD 1091 Y 2016.11.30

(54) Process for micropropagation of *Mentha gattefossei* Maire plants *in vitro*

(57) Abstract:

1

The invention relates to biotechnology, particularly to a process for micropropagation of *Mentha gattefossei* Maire plants *in vitro*.

The method, according to the invention, comprises the inoculation of minicuttings and cultivation of shoots obtained from axillary buds with induction of rhizogenesis on a nutrient medium, containing ? mineral salts in

2

relation to Murashige-Skoog medium, wherein the cultivation is carried out at a temperature of 26°C, relative humidity of 70%, with a photoperiod of 16 hours of light, light intensity of 2000 lx and pH 5.8, for 4...5 weeks.

Claims: 1

Fig.: 1

(54) Способ микроклонального размножения растений *Mentha gattefossei* Maire *in vitro*

(57) Реферат:

1

Изобретение относится к биотехнологии, в частности к способу микроклонального размножения растений *Mentha gattefossei* Maire *in vitro*.

Способ, согласно изобретению, включает инокуляцию миничеренков и выращивание побегов полученных из пазушных почек с индукцией ризогенеза на питательной среде, содержащей ? минеральных солей по отношению к среде

2

Мурасиге-Скуга, при этом культивирование осуществляют при температуре 26°C, относительной влажности воздуха 70%, при фотопериоде 16 часов света, интенсивности освещения 2000 люкс и pH 5,8, в течение 4...5 недель.

П. формулы: 1

Фиг.: 1

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie, și anume la un procedeu de micropropagare a plantelor de *Mentha gattefossei* Maire *in vitro*.

5 *Mentha gattefossei* Maire este o plantă medicinală rară din familia *Lamiaceae*, endemică din Maroc, cu un areal de răspândire foarte restrâns, estimat la 2000 km².

10 Partea aeriană a plantei sintetizează ulei volatil și alte clase de compuși biologic activi (polifenoli, flavonoide) cu efect antioxidant pronunțat. Conform studiului bibliografic de specialitate planta până în prezent rămâne a fi insuficient cercetată din punct de vedere fitochimic.

15 Specia este protejată la nivel internațional, fiind inclusă în Lista Roșie a IUCN (*International Union for the Conservation of Nature*) la categoria plantelor *Near Threatened*. Efectivul populațiilor naturale este în continuă descreștere ca rezultat al colectării intensive în scopuri medicinale și ca sursă alimentară. Se exploatează, de asemenea, intensiv și pentru extragerea uleiului volatil la nivel local și internațional.

20 În Republica Moldova se menține pe terenul experimental al Grădinii Botanice (I) a AȘM, fiind obținută prin schimbul internațional de semințe cu Grădina Botanică din Coimbra, Portugalia. Numărul redus de exemplare nu asigură materialul inițial de înmulțire pentru o eventuală extindere în cultură pe suprafețe mai mari, precum și a materialului vegetal suficient pentru studii chimice ulterioare. Acest fapt implică necesitatea elaborării metodei de multiplicare rapidă în cultura *in vitro* a plantelor de *Mentha gattefossei* Maire, fiind în același timp o

25 măsură eficientă de conservare *ex situ* a acestui taxon puternic periclitat la nivel mondial.

Se cunoaște procedeul de micropropagare a plantelor de *Mentha piperita*, ce constă în activarea mugurilor axilari, prezenți la nivelul internodurilor, respectiv la subsuoara frunzelor. Pentru activarea și creșterea intensivă a mugurilor axilari,

30 explantele au fost cultivate pe mediul nutritiv de bază cu un conținut de săruri minerale după Murashige-Skoog (Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*, 1962, v.15, N95, p.473), suplinit cu 6-benzilaminopurină – 0,6 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 dublă de micropropagare.

Dezavantajul menționat poate fi înlăturat cu ajutorul procedurii revendicate.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în reducerea perioadei de micropropagare, sporirea coeficientului de multiplicare a plantelor și, respectiv,

40 diminuarea cheltuielilor pentru a obține o plantă nouă de *Mentha gattefossei* Maire.

Procedeul, conform invenției, include inocularea minibutașilor și cultivarea lăstarilor obținuți din mugurii axilari cu inducerea rizogenezei pe un mediu nutritiv, care conține ½ săruri minerale față de mediul Murashige-Skoog, totodată

45 cultivarea se efectuează la temperatura de 26°C, umiditatea relativă a aerului de 70%, cu o fotoperioadă de 16 ore lumină, intensitatea iluminării de 2000 lx și pH-ul 5,8, timp de 4...5 săptămâni.

Avantajele invenției sunt:

• posibilitatea de a obține dintr-un explant (minibutaș) în decurs de 4...5

50 săptămâni, lăstari cu lungimea de 8...9 cm a câte 7...9 internoduri (invenția), în comparație cu lăstari de 2...3 cm a câte 4...5 internoduri dintr-un explant în aceeași perioadă de timp (cea mai apropiată soluție);

• sporirea coeficientului de micropropagare de la aproximativ 4000 plante în șase luni (cea mai apropiată soluție) până la 150000 plante (invenția) în aceeași

55 perioadă de timp;

• în comparație cu cea mai apropiată soluție, procesul de micropropagare a plantelor de *Mentha gattefossei* Maire prin procedeul revendicat se caracterizează

prin reducerea timpului de menținere *in vitro* și diminuarea numărului de explante necesare pentru multiplicare cu $\approx 50\%$.

Rezultatul invenției constă în sporirea coeficientului de multiplicare de la aproximativ 4000 plante în șase luni (cea mai apropiată soluție) până la 150000 plante (invenția) de *Mentha gattefossei* Maire în aceeași perioadă de timp, datorită modificării conținutului mediului nutritiv ($\frac{1}{2}$ săruri minerale după Murashige-Skoog). Aceste modificări induc creșterea lăstarilor cu majorarea numărului de internoduri (ceea ce sporește coeficientul potențial de multiplicare).

Exemplu de realizare concretă a invenției

Plantele de *Mentha gattefossei* Maire au fost obținute din lăstarii plantelor cultivate din semințe pe terenul experimental al Grădinii Botanice (I) a AȘM. Pentru a asigura sterilizarea, lăstarii de *Mentha gattefossei* Maire au fost tratați cu preparatul comercial ACE (agent de înălbire pe bază de clor) de 20% pe parcursul a 10 minute și spălați de trei ori cu apă sterilă. Inducerea lăstarilor și creșterea plantulelor a fost realizată pe mediul nutritiv Murashige-Skoog (MS) cu pH-ul 5,8, la regimul de temperatură de 26°C, cu fotoperioada de 16 ore lumină (2000 lx) și 8 ore întuneric.

O parte din minibutași (controlul) a fost cultivată pe mediul nutritiv Murashige-Skoog, cu următorul conținut de 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, Na_2EDTA – 37,3; agar – 0,6%. Altă parte a fost cultivată pe același mediu, dar suplimentat cu regulatorul de creștere 6-benzilaminopurină, valoarea pH-ului fiind 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 ? săruri minerale indicate în control, pH-ul fiind 5,8, fără fitohormoni (invenția). În așa fel mediile de cultivare se deosebeau după concentrația și conținutul unor componente. Minibutașii celor trei variante au fost cultivați la temperatura 26°C, cu fotoperioada de 16 ore lumină (2000 lx) și 8 ore întuneric. Umiditatea relativă a aerului a fost de 70%.

Creșterea și dezvoltarea lăstarilor de la baza mugurilor axilari și a rădăcinilor, pe mediul nutritiv conform invenției, a fost observată după 3 zile de la momentul inoculării, iar după 4...5 săptămâni lăstarii au atins înălțimea de 7...9 cm. După 4...5 săptămâni de la momentul inoculării, fiecare plantă a fost secționată în internoduri, care ulterior au fost inoculați pentru următorul ciclu de dezvoltare pe același mediu nutritiv. În așa fel, pe același mediu nutritiv este posibilă inițierea culturii *in vitro* și cultivarea minibutașilor pentru a obține plantule, care sunt pregătite pentru cultivarea în condiții *ex vitro*. În cazul celei mai apropiate soluții, lăstarii cultivați după 4...5 săptămâni au atins înălțimea de numai 2,5...3 cm.

Spre deosebire de cea mai apropiată soluție, procedeul revendicat contribuie la micșorarea de două ori a cheltuielilor pentru reagenții utilizați la cultivarea *in vitro*; diminuarea duratei de cultivare *in vitro* pentru obținerea unei noi generații de plantule în decurs de 4...5 săptămâni; sporirea coeficientului de micropropagare de la 4 la 8. Pe parcursul a 3 cicluri s-au obținut aproximativ 500 de plante (invenția), față de cele 60 plante (cea mai apropiată soluție), luând în considerație faptul că în conformitate cu invenția propusă se obțin până la unsprezece cicluri pe parcursul unui an, față de cele cinci cicluri (cea mai apropiată soluție), pe parcursul a jumătate de an se pot obține cel puțin 150000 plante.

Prin urmare, procedeul revendicat permite de a diminua de două ori cheltuielile pentru reagenți, durata menținerii *in vitro* pentru a obține o nouă generație pregătită pentru transferul *ex vitro*; de a spori de 35 ori numărul de plantule multiplicare pe parcursul unui an, utilizând aceeași suprafață a camerei de cultivare.

55

(56) Referințe bibliografice citate in descriere:

1. Santoro M.V., Nieves F., Zygadlo J., Giordano W., Banchio E. Effects of Growth Regulators on Biomass and the Production of Secondary Metabolites in Peppermint (*Mentha piperita*) Micropropagated in vitro. American Journal of Plant Sciences, 2013, 4, 49-55 <<http://dx.doi.org/10.4236.2013.45A008>> Mai, 2013

(57) Revendicări:

Procedeu de micropropagare a plantelor de *Mentha gattefossei* Maire *in vitro*, care include inocularea minibutașilor și cultivarea lăstarilor obținuți din mugurii axilari cu inducerea rizogenezei pe un mediu nutritiv, care conține ½ săruri minerale față de mediul Murashige-Skoog, 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 2000 lx și pH-ul 5,8, timp de 4...5 săptămâni.

Șef Direcție Brevete:

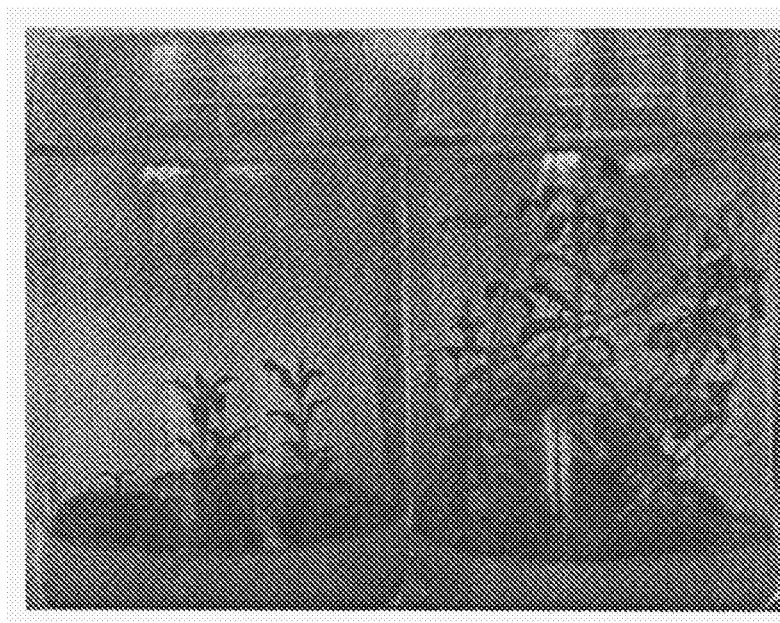
GUȘAN Ala

Examinator:

COLESNIC Inesa

Redactor:

LOZOVANU Maria



RAPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii

(21) Nr. depozit: s 2016 0032 (32) Data de prioritate recunoscută:
 (22) Data depozit: 2016.03.04 Raport de documentare internațională: ☐ da
 (67) Numărul cererii transformate și data transformării:
 (71) Solicitant: **INSTITUTUL DE GENETICĂ, FIZIOLOGIE ȘI PROTECȚIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD**
 (54) **Titlul: Procedeu de micropropagare a speciei *Mentha gattefossei* Maire in vitro**

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

A01H 4/00
A01H 5/04
Mentha gattefossei, micropropagare

EA (Eapatis):

A01H 4/00
A01H 5/04
 Микроклональное размножение, *Mentha gattefossei*,

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 cazul, indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	MD 605 Y 2013.03.31	1
A, D, C	Santoro M.V, Nieves F., Zygodlo J., Giordano W., Banchio E. Effects of Growth Regulators on Biomass and the Production of Secondary Metabolites in Peppermint (<i>Mentha piperita</i>) Micropropagated in vitro. American Journal of Plant Sciences, 2013, 4, 49-55 http://dx.doi.org/10.4236.2013.45A008 Published Online May, 2013	1

*** categoriile speciale ale documentelor citate:**

A – document care definește stadiul anterior | **T** – document publicat după data depozitului sau

general	a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidența 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 2016.08.08	
Examinator COLESNIC Inesa	