



MD 3899 B1 2009.05.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **3899** ⁽¹³⁾ **B1**
(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**

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată în termen de 6 luni de la data publicării	
(21) Nr. depozit: a 2009 0018 (22) Data depozit: 2009.02.23	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2009.05.31, BOPI nr. 5/2009
(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 *Echinacea purpurea* L. Moench *in vitro*

(57) Rezumat:

1 Invenția se referă la biotehnologie, în particular
la un procedeu de micropropagare a plantelor de
Echinacea purpurea L. Moench *in vitro*.

Procedeul, conform invenției, include germi-
narea aseptică a semințelor, obținerea explantelor,
segmentarea și cultivarea lor pe mediul nutritiv
Murashige-Skoog, ce conține suplimentar glico-
zida steroidică Melongozidă, obținută din semințe
de pătlăgele vinete *Solanum melongena* L. prin
extracție cu apă la încălzire, în concentrație de
(3,5...4,0)·10⁻³%, totodată cultivarea se efectuează

2
5 la o temperatură de 22...26°C, umiditatea relativă
a aerului de 70%, cu o fotoperioadă de 16 și 8 ore
noapte/zi și intensitatea iluminării de 3000 lx.

Rezultatul invenției constă în sporirea embrio-
genezei somatice și regenerării plantelor.

Revendicări: 1

15

MD 3899 B1 2009.05.31

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie, în particular la un procedeu de micropropagare a plantelor de *Echinacea purpurea* L. Moench *in vitro*.

Echinacea purpurea L. Moench este o plantă decorativă și medicinală prețioasă, multianuală. Acumulează și sintetizează substanțele biologic active, fiind mult apreciată pentru calitățile sale terapeutice, precum și proprietățile imunostimulente și antivirale. În componența rădăcinilor se conține substanța anginoli. Preparatul din flori posedă capacitate hemostatică și de vindecare a rănilor. Toate părțile componente ale plantei conțin glicozida steroidică echimacozidă și ulei volatil eteric până la 1%.

Este cunoscut procedeu de micropropagare a plantelor de *Rhodiola rosea* L., ce include obținerea și activarea meristemoizilor, de la baza cărora pornesc lăstarii. Pentru activarea și creșterea intensivă a plantulelor, explantele primare prelevate din plantule obținute prin germinarea semințelor au fost cultivate pe mediul 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) suplimentat cu cărbune activat în cantitate de 1200 mg/l, valoarea pH-ului fiind ajustată la 6,5 până la autoclavare [1].

Neajunsurile acestui procedeu sunt: coeficientul de micropropagare scăzut, nu toate explantele asigură inițierea creșterii meristemoizilor, de la baza cărora pornesc lăstarii.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în sporirea coeficientului de multiplicare a plantelor de *Echinacea purpurea* L. Moench pe calea modificării conținutului mediului nutritiv utilizat pentru micropropagare.

Esența invenției constă în aceea că procedeul include germinarea aseptică a semințelor, obținerea explantelor, segmentarea și cultivarea lor pe mediul nutritiv Murashige-Skoog, ce conține suplimentar glicozida steroidică 3-O-{[?D-galactopiranozil(1→4)-?D-glucopiranozil(1→2)]-[?D-ramnopiranozil(1→3)]-?D-glucopiranozil}-[(25R)-furost-5-en-3?,22α,26-triol]-26-O-?D-glucopiranozidă (Melongozidă), obținută din semințe de pătlăgele vinete *Solanum melongena* L. prin extracție cu apă la încălzire, în concentrație de (3,5...4,0)·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 noapte/zi și intensitatea iluminării de 3000 lx.

Preparatul Melongozidă a fost obținut din semințe de pătlăgele vinete *Solanum melongena* (SU 1162203 1985.02.15).

Rezultatul invenției constă în sporirea embriogenezei somatice și regenerării plantelor.

Exemplu de realizare a invenției

Plantulele de *Echinacea purpurea* L. Moench au fost obținute prin germinarea aseptică a semințelor. Pentru a asigura sterilitatea, semințele s-au tratat cu agent de înălbire pe bază de clor de 15%, timp de 20 min, spălându-se de 4...5 ori cu apă distilată sterilă, în continuare inoculându-se pe mediul nutritiv de bază MS. Plantulele obținute ajungând la mărimea de 7...10 cm, s-au segmentat și cultivat în condiții aseptice la hota cu flux de aer laminar steril în vase de sticlă de 50...100 ml, în fiecare vas fiind repartizați câte 15...20 ml de mediu nutritiv. S-au sterilizat prin autoclavare, în faza de vapori 10 min aerisire și 15 min sterilizare în condițiile de presiune 1 atm și temperatura 121°C, pH-ul a fost ajustat la 5,8...5,9.

În calitate de material inițial pentru inițierea micropropagării de plantule au servit segmente de hipocotil și frunze prelevate de la plantulele germinate aseptice din semințe. În vasele de sticlă de 50...100 ml s-au repartizat, în fiecare vas, câte 15...20 ml de mediu nutritiv. S-au sterilizat prin autoclavare, în faza de vapori 10 min aerisire și 15 min sterilizare în condițiile de presiune 1 atm și temperatura 121°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 24±2°C, umiditatea relativă a aerului de 70%, durata perioadei de iluminare 16 ore/zi și 8 ore/noapte, intensitatea luminii 3000 lueși.

O parte de explante (varianta control) s-au inoculat pe mediul de cultură de bază Murashige-Skoog, ce conținea macroelemente (săruri minerale, mg/l): NH₄NO₃ – 1650, KNO₃ – 1900, MgSO₄·7H₂O – 370, KH₂PO₄ – 170, CaCl₂·7H₂O – 440, microelemente, mg/l: H₃BO₃ – 6,2, MnSO₄·4H₂O – 22,3, CoCl₂·6H₂O – 0,025, CuSO₄·5H₂O – 0,025, ZnSO₄·7H₂O – 8,6, Na₂MoO₄·2H₂O – 0,25, KI – 0,83, FeSO₄·7H₂O – 27,8, Na₂EDTA – 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 de bază Murashige-Skoog, suplimentat cu cărbune activat în cantitate de 1200 mg/l, pH-ul fiind ajustat până la 6,5.

A treia parte de explante au fost utilizate pe mediul de cultură de bază Murashige-Skoog, suplimentat cu Melongozidă în concentrație de 3,5...4,0·10⁻³.

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

MD 3899 B1 2009.05.31

4

În al doilea caz, la utilizarea mediului MS + cărbune activat – cea mai apropiată soluție, proliferarea explantelor s-a realizat după 10 zile de la inoculare, inducerea, creșterea și dezvoltarea calusului s-a observat după 18 zile. Apariția plantulelor s-a realizat după 25 zile. Creșterea și dezvoltarea plantulelor s-a observat după o lună de zile. În acest caz micropropagarea plantulelor a constituit $3 \cdot 10^5$ plante anual.

5 Pe al treilea mediu, prin urmare, proliferarea explantelor a evoluat 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 melongozidă în concentrație de $(3,5 \dots 4,0) \cdot 10^{-3}\%$. Menționăm că în această variantă raportul optimal al ingredientelor prezenți în mediul nutritiv de cultură artificial sporește considerabil coeficientul de micropropagare a plantulelor de *Echinacea* – cu $5,0 \cdot 10^5$ plante anual. Includerea în ciclul de cultură *in vitro* a unei faze de calus sub acțiunea glicozidei steroidice mărește considerabil frecvența somaclonelor. Valoarea maximală a masei celulare a calusului s-a caracterizat cu valori variate, în medie $80,3 \dots 85,4\%$. Capacitatea embriogenezei somatice a constituit $70,5 \dots 73,6\%$, iar capacitatea de regenerare a evoluat între 15 $75,2 \dots 78,4\%$. În general calusul embrionar a fost multiplicat în scopul variabilității genetice de micropropagare a plantulelor obținute *in vitro*.

20

(57) Revendicări:

Procedeu de micropropagare a *Echinacea purpurea* L. Moench *in vitro* care include germinarea aseptică a semințelor, obținerea explantelor, segmentarea și cultivarea lor pe mediul nutritiv Murashige-Skoog, ce conține suplimentar glicozida steroidică 3-O- $\{[? \text{-D-galactopiranozil}(1 \rightarrow 4) \text{-? \text{-D-glucopiranozil}(1 \rightarrow 2)] \text{-}[? \text{-D-rampiranozil}(1 \rightarrow 3)] \text{-? \text{-D-glucopiranozil}} \text{-}[(25R)\text{-furost-5-en-3?,22}\alpha,26\text{-triol}]\text{-}26\text{-O-? \text{-D-glucopiranozidă}}$, obținută din semințe de pătlăgele vinete *Solanum melongena* L. prin extracție cu apă la încălzire, în concentrație de $(3,5 \dots 4,0) \cdot 10^{-3}\%$, 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 noapte/zi și intensitatea iluminării de 3000 lx.

30

(56) Referințe bibliografice:

1. MD 3375 G2 2007.08.31

Șef Secție:

COLESNIC Inesa

Examinator:

GORDIENCO Maria

Redactor:

CANȚER Svetlana

2009 0018

032 / FC / 05.0 / A / 2 / I /

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: a 2009 0018	(85) Data fazei naționale PCT:
(22) Data depozit: 2009.02.23	(86) Cerere internațională PCT:
Prioritatea invocată : (31) nr.: (32) data : (33) țara : (51) : 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: (54) Titlul : Procedeu de micropropagare a <i>Echinacea purpurea</i> L. Moench <i>in vitro</i> (71) Solicitantul : INSTITUTUL DE GENETICĂ ȘI FIZIOLOGIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD Termeni caracteristici : a) limba română: micropropagare, mediu nutritiv Murashige Scooge, explantare b) limba engleză: micropropagation, nutrient medium Murashige Scooge, explantation c) limba rusă :микроразмножение, питательная среда Murashige Scooge , эксплантация	
I. Minimul de documente consultate (sistema clasificării și indici de clasificare Int. Cl.)	
Int. Cl. Int. Cl.: A01H 4/00 ;C12N 1/38; A01N 45/00;A01H 5/04; A01H 5/06 ; A01H 5/12; A61K 36/28	
II. Literatura tehnico-științifică consultată adăugător la minim de documentație (autori, titluri, editura, țara și data publicării)	
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	
III. Baze de date electronice consultate (denumirea BD și termen de documentare)	
(MD, EA, SU, inclusiv și colecția „nepublică”)	
MD Perioada: 1993-2008.08.07	
EA Perioada: 1996-2008.08.07	
SU Perioada: 1972-1993	
ESP@CENET - WORLDWIDE (WO, EP, CH, DE, GB, FR, US, JP...)	

IV. Documente considerate ca relevante		
Categor ia*	Date de identificare ale documentelor citate si indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate

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	RU 2279212 C2 2006.07.10	1
A	SU 169585 A1 1991.12.07	1
A	RU 2180165 C2 2002.10.03	1
A	EP 0244211 A 1987.11.04	1
A	RU 2324338 C1 2002.05.20	1
A	RU 2080780 C1 1997.06.10	1
A	RU2039427 C1 1995.07.20	1
A	US 4338745 A 1982.07.13	1
A	RU 2273987 C2 2004.02.24	1
A	RU 2123256 C1 1998.12.20	1
A	MD 3375 G2 2007.08.31	1
☐ Documentele următoare sunt indicate in rubrica IV		☐ Informația referitoare la brevete paralele se anexează
* categoriile speciale ale documentelor consultate:		P - document publicat înainte de data depozit, dar după data priorității invocate
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 evidența principiul sau teoria pe care se bazează invenția
E - document anterior dar publicat la data depozit național reglementar sau după aceasta data		X - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă când documentul este luat de unul singur
L - document care poate pune în discuție data priorității invocate sau 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 când 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 divulgare		& - document care face parte din aceeași familie de documente
Data finalizării documentării		2009.03.02
Examinatorul		GORDIENCO Maria