

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **3763** ⁽¹³⁾ **G2**
(51) Int. Cl.: *A01H 4/00* (2006.01)
C12N 5/04 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. depozit: a 2008 0177 (22) Data depozit: 2008.06.27	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2008.12.31, BOPI nr. 12/2008
(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 (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.
Procedeu, 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, mg/L: acid 2,4-diclorfenoxiacetic 2,0; kinentină 0,5; zaharoză 30, având pH 5,7, totodată cultivarea se efectuează la temperatura de

2
22...24°C, cu fotoperioada zi-noapte respectiv de 16 și 8 ore.
Revendicări: 1

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie.

5 *Aronia melanocarpa* este o plantă medicinală din fam. *Rosaceae*, la care fructele acumulează substanțe biologic active cu valoroase proprietăți terapeutice: antioxidante, hipotensive, anticancerigene, antiradiante, antiinflamatoare. În ultimul timp fructele de aronie sunt solicitate și ca sursă de alimente sănătoase cu activitate antioxidantă. Obținerea fructelor de aronie ecologic pure și în proporții pentru acoperirea necesităților crescânde prin metode tradiționale *in vivo* este limitată de dependența față de rotația sezonieră, consecințele crizei ecologice și ale calamităților naturale, aplicarea măsurilor agrotehnice și de protecție sezoniere anevoioase și costisitoare.

10 Este cunoscut procedeul de obținere a plantelor de aronie *in vitro* bazat pe activitatea meristemelor nodurilor caulinare pe mediul nutritiv de bază Murashige-Skoog suplimentat cu vitamine; zaharoză (20 mg/L), glucoză (5 mg/L), fructoză (5 mg/L); polivinilpirolidină 360 (1,0 mg/L), benzilaminopurină (0,5 mg/L), acid indolilbutiric (0,5 mg/L); agar (5 mg/L) [1].

15 Neajunsurile acestui procedeu constau în aceea că prin inocularea explantelor pe medii nutritive sterile se obțin plante de aronie *in vitro*, care mai apoi necesită plantarea lor *in vivo*, iar obținerea fructelor depinde de rotația sezonieră, factorii pedoclimatici și cataclismele naturale (înghețurile de primăvară, ploile reci, care se manifestă în perioada de înflorire a aroniei; caniculele sporite de vară duc la căderea prematură a fructelor; ploile îndelungate și înghețurile frecvente în perioada maturizării fructelor); manifestarea consecințelor crizei ecologice (ploile acide, gazul de seră, prezența elementelor nocive în sol și atmosferă etc.) asupra dezvoltării plantelor și cantității și calității fructelor; aplicarea la timp a măsurilor agrotehnice și de protecție sezoniere anevoioase și costisitoare.

20 Problema pe care o rezolvă invenția constă în obținerea biomasei de fructe de aronie *in vitro* în condiții controlate, ecologic pure, dirijate, în flux continuu ca alternativă la obținerea fructelor de la creșterea plantelor *in vivo*.

25 Procedeul conform invenției include cultivarea explantelor obținute din fructe de *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot pe mediul nutritiv Murashige-Skoog, care conține suplimentar, mg/L: acid 2,4-diclorfenoxiacetic 2,0; kinetină 0,5; zaharoză 30, având pH 5,7, totodată cultivarea se efectuează la temperatura de 22...24°C, cu fotoperioada zi-noapte respectiv de 16 și 8 ore.

30 Rezultatul invenției constă în obținerea garantată a biomasei de fructe de aronie *in vitro*, în flux continuu, în condiții controlate, ecologic pure, independent de rotația sezonieră, condițiile pedoclimatice, manifestările calamităților naturale, lucrările agrotehnice și de protecție.

Exemplu de realizare a invenției

35 O parte din explante (variante de control) au fost inoculate pe mediul 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, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 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 (Murashige T., Skoog F. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologiae Plantarum*, 1962, V.15, N 95, p. 473-497).

40 Altă 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. Inocularea a fost realizată în condiții aseptice pe mediu nutritiv cu săruri minerale Murashige-Skoog suplimentat cu reglatori de creștere: acid 2,4-diclorfenoxiacetic (2,0 mg/L), kinetină (0,5 mg/L); zaharoză (30 g/L), iar pH-ul ajustat la 5,7 (invenție) și zaharoză (20 mg/L), glucoză (5 mg/L), fructoză (5 mg/L); polivinilpirolidină 360 (1,0 mg/L), benzilaminopurină (0,5 mg/L), acid indolilbutiric (0,05 mg/L); agar (5 mg/L) (cea mai apropiată soluție).

Pe mediul nutritiv Murashige-Skoog (controlul) a fost observată doar calusarea incipientă la a 12-a...14-a zi de la momentul inoculării, iar la a 20-a zi a fost fixată necrotizarea.

50 În cazul inoculării explantelor pe mediul nutritiv Murashige-Skoog, suplimentat cu reglatori de creștere: acid 2,4-diclorfenoxiacetic (2,0 mg/L), kinetină (0,5 mg/L); zaharoză (30 g/L), iar pH-ul ajustat la 5,7, s-a menționat inițierea calusogenezei la a 5-a...6-a zi și acumularea maximă de biomasă de fructe la a 26-a...28-a zi, pe cand inocularea explantelor pe mediul nutritiv cunoscut (cea mai apropiată soluție), respectiv, inițierea calusogenezei - la a 10-a...12-a zi și acumularea maximă a biomasei de culoare verde la a 36-a...40-a zi. Subcultivarea biomasei la intervale de 55 18...20 zile pe medii nutritive Murashige-Skoog proaspete, suplimentate cu reglatori de creștere, permite inducerea proliferării sporite și acumulării biomasei de aronie în flux continuu.

MD 3763 G2 2008.12.31

4

(57) Revendicări:

- 5 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, mg/L: acid 2,4-diclorfenoxiacetic 2,0; kinetină 0,5; zaharoză 30, având pH 5,7, totodată cultivarea se efectuează la temperatura de 22...24°C, cu o perioadă zi-noapte respectiv de 16 și 8 ore.

10

(56) Referințe bibliografice:

1. Litwińczuk W. Propagation of black chokeberry (*Aronia melanocarpa* Elliot) through *in vitro* culture. Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, 2002, Volume 5, N. 2, p. 423-428