



MD 3899 C2 2009.05.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) 3899⁽¹³⁾ C2

(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

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>(21) Nr. depozit: a 2009 0018 (22) Data depozit: 2009.02.23</p> | <p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2009.05.31, BOPI nr. 5/2009</p> |
| <p>(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</p> | |

(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*.

Procedeu, conform invenției, include germi-
narea aseptică a semințelor, obținerea explantelor,
segmentarea și cultivarea lor pe mediul nutritiv
Murashige-Skoog, ce conține suplimentar glicozida
steroidică Melongozidă, 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 tempera-

2
5 tură 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.

10 Revendicări: 1

15

MD 3899 C2 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*.

5 *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%.

10 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].

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

20 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.

25 Esența invenției constă în aceea că procedeu 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.

30 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

35 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.

40 În calitate de material inițial pentru inițierea micropropagării de plantule au servit segmente de hipocotil și frunze prelevate de la plantulele germinate aseptic 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.

45 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 lucși.

50 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%.

55 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.

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

5 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.

10 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 prezente 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...85,4%. Capacitatea embriogenezei somatice a constituit 70,5...73,6%, iar capacitatea de regenerare a evoluat între 75,2...78,4%. În general calusul embrionar a fost multiplicat în scopul variabilității genetice de micropropagare a plantulelor obținute *in vitro*.

20

(57) Revendicări:

25 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-{{[?]-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, 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