



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2011 00859

(22) Data de depozit: 01.09.2011

(41) Data publicării cererii:
28.09.2012 BOPI nr. 9/2012

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLATARE PENTRU
ȘTIINȚE BIOLOGICE BUCUREȘTI-
CENTRUL DE CERCETĂRI BIOLOGICE,
"STEJARUL" PIATRA NEAMȚ,
STR. ALEXANDRU CEL BUN NR. 6,
PIATRA NEAMȚ, NT, RO

(72) Inventatori:
• ȘTEFĂNACHE CAMELIA PAULA,
ALEEA ULMILOR NR. 36, BL. B29, AP. 59,
PIATRA NEAMȚ, NT, RO;
• DĂNILĂ DOINA, STR. SOMEȘ NR. 22,
PIATRA NEAMȚ, NT, RO;

• GILLE ELVIRA, STR. PLEVNEI NR. 4,
BL. F10, SC. C, AP. 51, PIATRA NEAMȚ,
NT, RO;
• VĂNTU SMARANDA,
STR. ANASTASIE PANU NR. 23,
BL. MUNTENIA AP. 4, IAȘI, IS, RO;
• NECULA RADU, BD. TRAIAN NR. 2,
BL. S1, SC. E, AP. 151, PIATRA NEAMȚ,
NT, RO;
• TĂNASE CĂTĂLIN,
STR. PETRU CARAMAN NR. 2, BL. TC,
SC. A, ET. 5, AP. 10, IAȘI, IS, RO;
• ȚEBRENCU CARMEN ELENA,
BD. DECEBAL NR. 57, BL. B3, SC. C,
AP. 38, PIATRA NEAMȚ, NT, RO

(54) METODĂ PENTRU REALIZAREA CULTURILOR *IN VITRO* LA
SPECIA *ARNICA MONTANA L.* UTILIZATĂ ÎN EVALUAREA
BIOSINTEZEI UNOR COMPUȘI BIOLOGIC ACTIVI

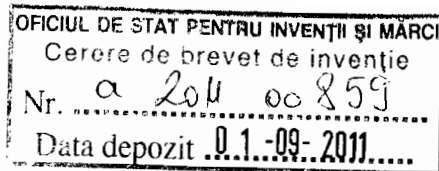
(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la o metodă de realizare a culturii *in vitro* la specia *Arnica montana L.*, prin dezvoltarea următoarelor procese: culturi de țesuturi diferențiate (țesuturi meristematice) și nediferențiate (calus și clustere celulare), în scopul realizării unei evaluări integrate a biosintezei compușilor biologici activi. Acestea constau în: culturi de micropropagare (explant - vârfuri tulpinale obținute prin germinarea semințelor în condiții aseptice) utilizând mediul de cultură Murashige și Skoog (1962) (MS), cu 25g/l zaharoză, solidificat cu 8...8,5% agar și suplimentat cu 1,0 mg/l BAP, culturi de calus (explant - fragmente

foliare și radiculare prelevate de la plante regenerare *in vitro*, inflorescențe imature) utilizând mediul de cultură MS cu 30 g/l zaharoză, solidificat cu 7,5% agar, în trei variante de balanțe hormonale (0,5 mg/l BAP și 1,5mg/l 2,4D, 0,5 mg/l kinetină și 1,5 mg/l 2,4 D, 1,0 mg/l kinetină și 1,0 mg/l ANA), culturi submerse (inocul - calus obținut în condițiile menționate mai sus), utilizând mediul de cultură MS (lichid) cu 30 g/l zaharoză, fără regulatori de creștere.

Revendicări: 6





METODA PENTRU REALIZAREA CULTURILOR *IN VITRO* LA SPECIA *ARNICA MONTANA* L. UTILIZATA IN EVALUAREA BIOSINTEZEI UNOR COMPUSI BIOLOGIC ACTIVI

Autori: Stefanache Camelia Paula, Danila Doina, Gille Elvira, Vantu Smaranda,
Necula Radu, Tanase Catalin, Tebrencu Carmen Elena

DESCRIEREA INVENTIEI

Inventia se refera la o metoda eficienta pentru realizarea culturilor *in vitro* – micropropagare, culturi de calus, culturi submerse la specia *Arnica montana* L. in scopul realizarii unei evaluari integrate a biosintezei compusilor biologic activi.

Este cunoscut ca *Arnica montana* (familia *Asteraceae*) este o specie medicinala cu utilizare traditionala in Europa si America de Nord. *Arnica montana* este o planta erbacee perena, cu tulpina aeriana de 20-50 cm inaltime, flori de culoare galbena sau galbena-portocalie grupate in calatidii, fructul este achena paroasa. Este o specie hemicriptofita, cu areal european montan, de plina lumina, cu raspandire in fanetele din zonele racoroase montane, pe soluri moderat umede – reavane, cu pH acid, sarace in azot mineral. In scop fitoterapeutic se utilizeaza rizomul si radacinile recoltate in luna septembrie, fructele si inflorescentele recoltate inainte de supramaturare, care contin lactone sescviterpenice (helenalina si dihidrohelenalina) si uleiuri volatine cu monoterpene aromatice. Componentii identificati in rizomi si radacini sunt: fructoza (2.5%), zaharoza (1,0%), inulina (9-12%), uleiuri volatile (0,05-0,12%), acizi alifatici monobazici (acid angelic), taninuri catechinice (2,3%), acid lactic, acid izobutiric, acid succinic, acid formic, acid fumaric, triterpene (taraxasterol) si mucilagii. Frunzele contin: esterii ai lactonelor (arnicolid A-D) si lactone sescviterpenice (arnifolin, helenalin); florile contin: fitosteroli, rasini, taninuri, acizi (acid malic), acizi fenolici (acid clorogenic, acid cafeic), trimetilamina, ceruri si gume (Burzo *et al.*, 2005).

Este cunoscut ca extractele au proprietati stimulatorie pentru circulatia sangvina, antiinflamatorii, analgezice, antiseptice, cicatrizante, coleretice, colagoge, si antihelmintice. Se utilizeaza pentru tratarea hematoamelor, contuziilor si ranilor, furunculozei, bronsitei, cistitei, accidentelor vasculare, reumatismului, acneei, a durerilor de cap, cancerului de piele, insomniilor, palpitatiilor cardiace etc. Uleiul de arnica este utilizat ca aromatizant in industria bauturilor. Se utilizeaza sub forma de pulbere obtinuta din florile uscate, sub forma de infuzii sau tincturi.

Este cunoscut ca, datorita colectarii excesive, intensificarii agriculturii si a fragmentarii habitatelor, specia a devenit tot mai rara, fiind introdusa in Anexa D a EU Council Regulation No. 338/97 si in Anexa V(b) a *Directivei Habitate* (92/43/CE – Directiva de Conservare a Habitatelor Naturale si a Faunei si Florei Salbatice). *Arnica montana* este inclusa in Lista Rosie a plantelor superioare din flora Romaniei, cu statutul de specie vulnerabila si rara (Boscaiu *et al.*, 1994).

Este cunoscut ca, pentru specia *Arnica montana*, au fost elaborate tehnici de micropropagare - Conchou *et al.* (1992), C. L. Lê (1998), iar la nivel national Butiuc-Keul si Deliu (2001), precum si tehnici de culturi de calus (Petrova *et al.*, 2010).

Este cunoscut ca utilizarea culturilor *in vitro* confera, comparativ cu metodele conventionale de cultura, avantajul obtinerii unui material vegetal uniform – cu caracteristici bioproductive superioare, liber de viroze/bacterioze, precum si a unui numar relativ mare de indivizi intr-un interval scurt de timp.

Este cunoscut ca multiplicarea *in vitro* la *Arnica montana* are caracter clonal, prin utilizarea culturilor *in vitro* obtinandu-se material vegetal uniform din punct de vedere genetic (Butiuc-Keul si Deliu, 2001).

Problema pe care o rezolva inventia noastra consta in realizarea unei metode eficiente de culturi *in vitro* – culturi pentru micropropagare, culturi de calus, culturi submerse, cu aplicabilitate in evaluarea biosintezei compusilor biologic activi si in producerea de material vegetal cu caracteristici bioproductive optime, respectiv standardizare.

Metoda pentru realizarea culturilor *in vitro* conform inventiei consta in utilizarea plantulelor obtinute in urma germinarii in conditii aseptice ca sursa de explant pentru micropropagare (1); utilizarea fragmentelor foliare si radiculare prelevate de la plante regenerare *in vitro*, si a inflorescentelor imature ca sursa de explant pentru culturile de calus (2); utilizarea calusului obtinut prin procedeul mentionat anterior ca inocul pentru culturile submerse (3). Astfel se reduce riscul de contaminare a culturilor, de necrozare a tesuturilor prin utilizarea agentilor de sterilizare, fiind necesara doar sterilizarea semintelor si a inflorescentelor imature. Pentru realizarea culturilor *in vitro* a fost utilizat mediul bazal MS (Murashige si Skoog, 1962), suplimentat cu diferite tipuri si cantitati de regulatori de crestere – auxine si citochinine.

Pentru analiza fitochimica a materialului vegetal de *Arnica montana*, au fost utilizate metodele CSS (Cromatografie in Strat Subtire) si RP-HPLC-UV (Cromatografie de Lichide de Inalta Performanta, cu Faza Inversa si detector UV - Agilent Technologies 1200 Series) pentru extracte metanolice epuizate – compusi polifenolici si flavonoidici; extractele diclormetanice au fost analizate prin CSS (calitativ) pentru compusii terpenici. Probele analizate au constat in

material vegetal prelevat de la plantele donator colectate din populatii naturale si material vegetal obtinut prin metoda culturilor *in vitro* (regeneranti, calus, culturi submerse).

Conform cu standardele utilizate, extractele plantelor donator contin: compusi polifenolici si derivati (apigenina, apigenol, luteolina, acid clorogenic), triterpene si compusi sterolici (β -sittosterol, acid oleanolic, acid ursolic). Apigenolul, identificat si dozat in acestea, este cuprins intre 3,33 si 10,38 mg/100g material vegetal proaspat. La toate probele de culturi *in vitro*, s-a identificat acidul clorogenic. La regeneranti s-a dozat valoarea cea mai mare cuprinsa intre 4,61 – 18,44 mg/100g extract vegetal. Pentru acizii polifenolici (exprimati in echivalenti de acid clorogenic), valorile au fost cuprinse intre 2,75 – 8,67 la calus si de 93,41 – 257,24 la regeneranti. S-a evidentiat mentinerea potentialului biosintetic pentru compusii polifenolici si terpenici, in probele obtinute *in vitro*, corelat cu tipul de explant/inocul si conditiile de cultura.

Ca posibile utilizari practice imediate, mentionam producerea de material vegetal/material saditor uniform, in flux continuu - indiferent de factorii climatici, cu caracteristici bioproductive/biosintetice superioare (prin selectia si perpetuarea ecotipurilor valoroase) – standardizarea materialului vegetal; producerea la scara larga a principiilor biologice active. Calusul, precum si clusterelor de celule obtinute prin culturi submerse pot fi procesate sub forma de pulberi, si utilizate direct in prepararea de fitopreparate. Din aceste considerente, abordarea biotehnologica este o alternativa la propagarea si conservarea resursei vegetale, dar si de valorificare a principiilor biologice active.

Inventia prezinta urmatoarele avantaje:

- Are utilizari practice imediate in producerea de material vegetal standardizat, utilizabil si in strategiile de conservare a speciei, producerea de principii biologice active prin biotehnologii;
- Are utilitate in studii fundamentale privind biosinteza compusilor biologice activi, in intitiera culturii *in vitro* – de micropropagare utilizandu-se ca explant, apexul tulpinal provenit dintr-o plantula provenita din seminte germinate aseptice;
- Se obtine o cantitate mare de material vegetal, plecand de la un explant/inocul minimal (prin tehnica multiplicarii *in vitro* se obtin circa 40-60 indivizi/flacon de initiere in 12 - 15 saptamani de cultura);
- Metoda are un numar redus de faze;

Exemplu de realizare a inventiei

Se da in continuare un exemplu de realizare a inventiei:

Materialul vegetal – explantele constau in inflorescente imature si varfuri tulpinale excizate de la plantule obtinute in urma germinarii semintelor in conditii aseptice – pe hartie de filtru umectata cu apa distilata suplimentata cu 0.02 mg/l kinetina si 2 mg/l acid giberelic. Pentru izolarea aseptica a materialului vegetal se utilizeaza clorura mercurica 0,1%, timp de 10, 15, respectiv 20 de minute – in functie de tipul de explant si gradul de contaminare a acestora.

Mediile de cultura utilizate pentru culturile *in vitro* constau in variante ale mediului bazal MS (Murashige Skoog, 1962): pentru micropropagare variante ale mediului MS suplimentat cu 25 g/l zaharoza si solidificat cu 8 – 8,5 % agar: mediul MS fara regulatori de crestere pentru initierea culturii si inradacinare, respectiv mediul MS suplimentat cu 1 mg/l BAP¹ (B₁₀) pentru multiplicare; pentru culturile de calus mediul MS suplimentat cu 30 g/l zaharoza solidificat cu 7,5 % agar, suplimentat cu 0,5 mg/l BAP si 1.5 mg/l 2.4D² (BD), 0,5 mg/l kinetina si 1.5 mg/l 2.4 D (KD), respectiv 1 mg/l kinetina si 1 mg/l ANA³ (KN): pentru culturile submerse se utilizeaza mediul MS lichid suplimentat cu 30 g/l zaharoza, fara regulatori de crestere. Variantele de mediu de cultura agarizat este repartizat in flacoane Erlenmeyer de 100 ml (25 ml mediu/flacon), iar mediul lichid in flacoane Erlenmeyer de 250 ml (100 ml mediu/flacon), si apoi autoclavat la 120°C (15 minute). Regulatorii de crestere sunt adaugati in mediu (acolo unde a fost cazul) anterior autoclavarii.

Conditile de cultura. pentru toate variantele de culturi *in vitro* sunt: fotoperioada de 16 ore lumina si 8 ore intuneric, la o temperatura $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Culturile submerse sunt mentinute in conditii de agitatie continua, pe un shaker.

Pentru realizarea micropropagarii sunt inoculate 2 varfuri tulpinale/flacon. Dupa 4 saptamani, explantele sunt transferate pe mediul de multiplicare B₁₀; subcultivarile se realizeaza la 3 – 4 saptamani. Pentru inducerea rizogenezei, tulpinile se separa, si se inoculeaza, cate una, in flacoane cu mediu MS (fara regulatori de crestere), aceasta definitivandu-se in 3 – 4 saptamani (randament de 90 – 95%). Reducerea densitatii lastarilor si cresterea concentratiei de agar din mediu, asigura obtinerea lastarilor cu aspect caracteristic si reduce riscul de vitrificare a tesuturilor. Pentru aclimatizarea *ex vitro*, regenerantii ce prezinta un sistem radicular viguros sunt transferati in ghivece cu sol steril, fiind acoperiti cu pahare transparente – ulterior indepartate progresiv, pentru a asigura o atmosfera constanta, saturata in vapori. Aclimatizarea se mai poate realiza in sistem hidroponic. Dupa 4 – 5

saptamani de acomodare. regenerantii pot fi transferati in jardiniere cu un amestec de sol – sol de gradina si sol prelevat de la situl de colectare al materialului vegetal (rata de supravietuire de 85 – 90%). Prin tehnica multiplicarii *in vitro* se obtin circa 40-60 indivizi/flacon de initiere in 12-15 saptamani de cultura.

In vederea realizarii culturilor de calus, fragmentele foliare si radicularare prelevate de la plante regenerare *in vitro*, si inflorescentele imature sunt inoculate in flacoane cu mediu de cultura, fiind anterior supuse unui stres mecanic – pentru stimularea calusogenezei. Calusarea devine vizibila pe suprafata tesutului dupa 3 – 4 saptamani. Subcultivarile se realizeaza la intervale de circa 4 – 5 saptamani. Calusul este friabil, de culoare galben-verzuie.

Pentru realizarea culturilor submerse, inoculul – variante de calus obtinute prin procedeul mentionat anterior, este transferat in mediu MS lichid, fara regulatori de crestere (100 ml mediu/flacon). Flacoanele se mentin in conditii de agitare continua, pe un shaker. Subcultivarile se realizeaza la 7 zile – celulele si clusterile de celule sunt preluate cu o sita si transferate in flacoane cu mediu proaspat.

Inocularea culturilor si subcultivarile se realizeaza in conditii aseptice, la o lampa cu flux laminar.

BIBLIOGRAFIE

1. Boscaiu, N., Coldea, Ghe., Horeanu, C., 1994, Lista Rosie a plantelor vasculare disparute, periclitare, vulnerabile si rare din Flora Romaniei. Ocrotirea Naturii si a Mediului Inconjurator. Bucharest. Ed. Acad. Rom. 38 (1): 45 – 56.
2. Burzo I., Dobrescu Aurelia, Bădulescu Liliana, Mihăilescu D., Bălan Daniela, 2005. Fiziologia plantelor, Vol. VIII – Substanțele utile din plante, p. 5-6, Ed. Elisavaras, București.
3. Butiuc-Keul. A.L., Deliu, C. 2001. Clonal propagation of *Arnica montana* L., a medicinal plant. In Vitro Cell Dev. Biol. – Plant, 37, 581-585.
4. Conchou, O., Nichterlein, K., Vömel, A. 1992. Shoot Tip Culture of *Arnica montana* for Micropropagation. Planta Med, 58.
5. I.ê. C.L., 1998. In vitro clonal multiplication of *Arnica montana* L., Acta Horticulturae, 457.
6. Petrova Mariya, Zayova Ely, Zankova Elina, Baldzhiev G., 2011, *Plant regeneration from callus culture of Arnica montana*, Romanian Biotechnological Letters Vol. 16, No.1, 2011. Supplement.

**METODA PENTRU REALIZAREA CULTURILOR *IN VITRO* LA SPECIA
ARNICA MONTANA L. UTILIZATA IN EVALUAREA BIOSINTEZEI UNOR
COMPUSI BIOLOGIC ACTIVI**

Autori: Stefanache Camelia Paula, Danila Doina, Gille Elvira, Vantu Smaranda,
Necula Radu, Tanase Catalin, Tebrencu Carmen Elena

REVENDICARI

1. Metoda culturilor *in vitro* la specia *Arnica montana* **caracterizata prin aceea ca**, este realizata integrat prin succesiunea culturilor de tesuturi: diferite (explante florifere si vegetative) si dediferentiate (calus si clustere celulare), obtinerea de extracte vegetale si evaluarea fitochimica a compusilor polifenolici si terpenici.
2. Metoda definita in revendicarea 1 este caracterizata prin aceea ca pentru initierea culturii *in vitro* – de micropropagare am utilizat ca explant, apexul tulpinal provenit dintr-o plantula provenita din seminte germinate aseptice.
3. Metoda de cultivare *in vitro* definita in revendicarea 1 **caracterizata prin aceea ca** este constituita din urmatoarele procedee: culturi pentru micropropagare, culturi de calus si culturi submerse, materialul vegetal obtinut prin o metoda reprezentand explant/inocul pentru urmatorul procedeu. Astfel se reduce riscul de contaminare a culturilor si de necrozare a tesuturilor prin utilizarea agentilor de sterilizare, fiind necesara doar sterilizarea materialului vegetal initial. Deasemenea, materialul vegetal este are origine comuna din punct de vedere genotipic.
4. Metoda definita in revendicarea 1 este **caracterizata prin aceea ca** mediul utilizat pentru multiplicarea *in vitro* este reprezentat de mediul bazal Murashige Skoog (MS, 25 g/l zaharoza, 8-8,5 % agar) suplimentat cu 1 mg/l BAP¹.
5. Metoda definita in revendicarea 1 este **caracterizata prin aceea ca** mediile utilizate pentru realizarea culturilor de de calus sunt reprezentate de variante ale mediului bazal MS (30 g/l zaharoza, 7,5 % agar), suplimentat 0,5 mg/l BAP si 1,5 mg/l 2,4D², 0,5 mg/l kinetina si 1,5 mg/l 2,4 D, respectiv 1 mg/l kinetina si 1 mg/l ANA³.
6. Metoda definita in revendicarea 1 este **caracterizata prin aceea ca** mediul utilizat pentru realizarea culturilor submerse este reprezentat de mediul bazal MS lichid (30 g/l zaharoza), fara regulatori de crestere.