

Invenția se referă la biotehnologie, și anume la un procedeu de obținere a biomasei calusului de *Rhodiola rosea* L. in vitro.

Rhodiola rosea L. reprezintă o plantă valoroasă care, datorită metaboliților secundari ce se conțin în rădăcini și rizomi, este folosită pe larg în medicină și farmaceutică. Tocmai de aceea *Rhodiola rosea* L. este colectată intensiv din masivele naturale și în ultimii ani ea a dispărut de pe mai multe creste montane, unde planta creștea spontan. Cultivarea artificială a speciei necesită condiții specifice, din aceasta cauză întâmpină mai multe dificultăți. O cale de soluționare a problemei este obținerea principiilor active caracteristice pentru *Rhodiola rosea* L. din biomasa celulelor calusului obținută pe cale biotehlogică.

Este cunoscută metoda de cultivare a celulelor calusului in vitro [1]. Pentru proliferarea celulelor calusului a fost utilizat mediul nutritiv Murashige-Skoog (MS) (1962), suplinit cu 6-benzilaminopurină (BA) 1,5 mg/l, acid α -naftilacetic (ANA) 0,5 mg/l; valoarea pH-ului fiind ajustată la 5,8 înainte de autoclavare [1]. Din punct de vedere economic acest procedeu necesită îmbunătățire, deoarece cultivarea calusului pe parcursul unei perioade optimale nu asigură acumularea semnificativă a biomasei. Acest neajuns poate fi înlăturat cu ajutorul procedurii propus.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în sporirea proliferării celulare și a acumulării biomasei calusului de *Rhodiola rosea* L.

Procedeu, conform invenției, include inocularea frunzelor prelevate de la plantulele sterile de *Rhodiola rosea* L. pe un mediu nutritiv, obținut prin adăugarea la mediul nutritiv agarizat Murashige-Skoog a 1,5 mg/l 6-benzilaminopurină și 0,5 mg/l acid α -naftilacetic, ajustarea pH-ului până la 5,8, autoclavare și adăugarea unei soluții apoase sterilizate de 5% de substanțe uscate obținute din biomasa algei verzi *Spirogira* sp. prin extragere cu etanol în cantitate de 0,1%, după care se efectuează cultivarea calusului în decurs de 40 zile la temperatura de 26°C și umiditatea relativă a aerului de 70% cu o fotoperioadă de 16 ore lumină și 8 ore întuneric.

Soluția apoasă obținută din biomasa algei verzi *Spirogira* sp. (în continuare preparatul Reglalg, Autorizație AA nr. 0448 eliberată din 21.02.2003 de Centrul de Stat pentru Atestarea Produselor Chimice și Biologice de Protecție și Stimulare a Plantelor. Grupa a 4-a de toxicitate) prezintă un complex de substanțe biologice active, obținute din biomasa algei filamentose verzi *Spirogira* sp. crescute în mediul organic timp de 10...12 zile, uscată până la umiditatea de 5...7% și fărâmițată până la starea de praf, totodată înainte de extragere biomasa se tratează cu clorofom, apoi cu apă, iar extragerea finală se realizează cu alcool etilic în raport de 1:(4...6) cu diluția ulterioară cu apă. Soluția finală conține 5% de substanță uscată.

Avantajele procedurii propus constau în simplitatea lui, sporirea substanțială a biomasei acumulate, conținutului pigmentilor asimilatori și costul redus al preparatului.

Rezultatul constă în sporirea proliferării celulare și a acumulării biomasei calusului de *Rhodiola rosea* L. cu 38%, a concentrației clorofilei a, b și a carotenoidelor în celulele calusului cu 92%, 49% și, respectiv, 53% față de procedeu cunoscut.

Exemplu de realizare a invenției

Pentru inducerea calusului au fost prelevate frunze de la plantulele sterile de *Rhodiola rosea* L., obținute din semințe prealabil sterilizate. Segmente foliare cu dimensiunea de 0,3...0,5 cm au fost inoculate pe mediul MS suplimentat cu 1,5 mg/l BA și 0,5 mg/l ANA, agar 0,6% [1]. Valoarea pH-ului a fost ajustată până la 5,8, înainte de autoclavare. Pentru menținerea calusului, la fiecare 40 de zile de cultivare, fragmente de calus cu masa de aproximativ 2 g erau transferate pe mediul MS proaspăt preparat [1].

O parte din explanți a fost cultivată pe mediul nutritiv MS [1] (cea mai apropiată soluție), alta – pe același mediu suplimentat după autoclavare cu soluție apoasă sterilizată de Reglalg în concentrație finală de 0,001% (invenția propusă). În așa fel, mediile de cultivare se deosebeau numai prin prezența Reglalgului. Explanții celor două variante au fost cultivați la temperatura de 26°C, cu fotoperioada de 16 ore lumină (2000 lux) și 8 ore întuneric. Umiditatea relativă a aerului în camera de cultivare a fost egală cu 70%.

Pentru analiză de la fiecare variantă au fost luate câte 3 vase, au fost prelevate celulele calusului, masa proaspătă a lor fiind determinată prin cântărire. Ulterior din masa calusului au fost extrași componenții clorofilieni, conținutul clorofilei a, b și al carotenoidelor fiind determinat prin metoda spectrofotometrică.

Conform datelor prezentate în tabel, calusurile cultivate conform celei mai apropiate soluții și conform invenției se deosebeau prin sporirea biomasei cu 38% și a conținutului clorofilei a, b și al carotenoidelor cu 92%, 49% și, respectiv, 53%. Prin urmare, suplimentarea mediului de cultivare cu un volum de soluție apoasă sterilizată de Reglalg a asigurat sporirea acumulării biomasei și a conținutului clorofilei a, b și al carotenoidelor în celulele calusului de *Rhodiola rosea* L. (vezi tabelul).

Tabel

Procedeu de cultivare	Biomasa calusului, g	Clorofila a, mg/g	Clorofila b, mg/g	Carotenoide, mg/g
Conform celei mai apropiate soluții	12 ± 0,16	1,27 ± 0,01	0,75 ± 0,04	1,14 ± 0,01
Conform invenției	16,6 ± 0,15	2,44 ± 0,03	1,12 ± 0,01	1,74 ± 0,03