



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2012 00092**

(22) Data de depozit: **13.02.2012**

(41) Data publicării cererii:
30.01.2014 BOPI nr. 1/2014

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA DE VEST
"VASILE GOLDIȘ" DIN ARAD,
BD. REVOLUȚIEI NR. 94-96, ARAD, AR, RO

(72) Inventatori:
• CACHIȚĂ-COSMA DORINA,
ALEEA SNAGOV NR. 2, SC. 4, AP. 74,
ET. 3, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;

• ARDELEAN MIRELA, NR. 42A, TĂGĂDĂU,
COMUNA BELIU, AR, RO;
• TURCUȘ VIOLETA, STR. TÂRGULUI
NR. 5-7, BL. 15, SC. A, ET. 3, AP. 16, ARAD,
AR, RO

(54) **PROCEDEU DE GELIFICARE ȘI DE COLORARE A MEDIILOR
DE CULTURĂ ASEPTICE DESTINATE CREȘTERII *IN VITRO*
A FITOINOCULILOR UTILIZÂND GRANULE SAU SFERE
HIDRATATE DE POLIACRILAMIDĂ**

(57) Rezumat:

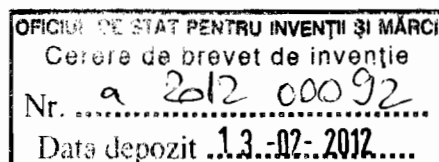
Prezenta invenție se referă la un procedeu de gelificare și colorare a mediilor de cultură aseptice, destinate creșterii *in vitro* a fitoinoculilor, utilizând, ca înlocuitor de agar-agar, particule sau sfere de poliacrilamidă variat colorate, având capacitatea de a se îmbiba în prezența apei, crescând în volum. Acest material poate fi sterilizat prin autoclavare la 120°C, împreună cu restul componentelor din mediul de cultură, se gelifică prin

răcire și poate fi inoculat cu explante vegetale ce pot fi crescute în condiții de sterilitate. Gelurile colorate astfel inoculate au un efect estetic deosebit și pot fi comercializate cu succes la un preț mult mai mic decât cele obținute utilizând, ca mediu de cultură, agar-agar.

Revendicări: 1
Figuri: 3

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).





Descrierea invenției

Introducere- stadiul actual a cunoștințelor

Fitoinoculii sunt cultivați *in vitro* pe medii aseptice, complexe, care sunt – de regulă- gelificate cu agar- agar, ori cu microcristale de celuloză, sau cu biogel (*Pierik*, 1987; *Cachiță*, 1987, *Cachiță* și colab., 2007).

Biogelul este un compus organic de sinteză, respectiv o *poliacrilamidă*, ce -în practică- se utilizează ca agent de afânare și de structurare a solurilor (mai ales la plantele cultivate în ghivece), care se comercializează sub formă de granule, și care în contact cu apa se hidratează puternic, gonflându-se, mărindu-și foarte mult volumul.

În prezenta invenție am utilizat în prepararea mediilor de cultură destinate inoculării și a creșterii pe medii aseptice a explantelor vegetale sferule sau glomerule de *poliacrilamidă*, ca înlocuitor de *agar-agar*, folosindu-le pentru solidificarea mediilor de cultură aseptice, destinate cultivării *in vitro* de fitoinoculi. Astfel de formațiuni sunt comercializate sub formă incoloră sau variat colorate, ele fiind recomandate pentru a fi introduse în vasele în care se pun în apă florile tăiate. Noi am considerat oportună folosirea glomerulelor sau a sferulelor de *poliacrilamidă* pentru *colorarea* substraturilor de cultură destinate vitrocultivării fitoinoculilor, fapt realizabil prin adăugarea acestui produs în momentul preparării acestor medii, întrucât, în acest mod, se ridică valoarea estetică a flacoanelor ce dețin fitoinoculi. Avantajele utilizării unui astfel de mediu constau nu numai într-un efect estetic, superior, ci și în faptul că asemenea medii sunt mult mai puțin costisitoare decât cele gelificate cu agar- agar și care în multe țări sunt comercializate.

Într-o lucrare publicată de către *Vancea* și *Cachiță* (2002) au fost prezentate noi formulări de substraturi de aclimatizare a exvitroplantulelor, utilizabile în momentul transferării acestora la regimul de viață *din mediul septic*, substraturi care, conțineau în ele particule de *poliacrilamidă* însă, nu erau aseptice. Rolul *poliacrilamidei* în acele substraturi a fost cu totul diferit de cel propus de noi în prezenta invenție, cu atât mai mult cu cât în procedurile elaborate de noi în această propunere de invenție impun ca particulele de *poliacrilamidă*, obligatoriu, să treacă printr-un procedeu de aseptizare, prin autoclavare. Utilizarea particulelor colorate de *poliacrilamidă* ca agent gelificant a mediilor de cultură destinate creșterii *in vitro* a fitoinoculilor, ne-a fost inspirat de la

faptul că, o serie de vitoculturi vegetale- cu substrat incolor agarizat- sunt comercializate în Italia, Belgia, Olanda, Austria, etc., nu numai ca material de plantat, ci și atare, flacoanele cu fitoinoculi fiind valorificate din punct de vedere ornamental, ele fiind achiziționate de către cumpărători datorită aspectului lor interesant și estetic. Vitroplantulele din interiorul vaselor de cultură miniaturizate fiind, pentru publicul neavizat, stârnesc interes. În plus, un efect estetic este oferit și de modelele de recipiente utilizate ca vase de cultură deținătoare de fitoinoculi. În consecință, am considerat oportună adăugarea la acest efect și a unei modalități de colorare a substraturilor de cultură din recipiente, în acest mod ridicându-se valoarea ornamentală a flacoanelor cu fitoinoculi, destinate comercializării acestora (Fig. 1-3).

Astfel de flacoane cu fitoinoculi, obligatoriu sunt păstrate fără a fi deschise, ceea ce le face ca ele să se mențină ca atare mult timp, fără a necesita operațiuni de întreținere, ele păstrându-și valoarea estetică timp de câteva luni, fără ca vitroculturile să fie udate; când se dorește scoaterea vitroplantulelor și amplasarea lor în sol se va proceda la îndepărtarea mediului gelozat de la nivelul rădăcinițelor acestora și introducerea zonei radiculare a acestora într-un substrat de compoziție și consistență variată, care să le susțină creșterea; temporar, după transferarea *ex vitro* a plantulelor, trebuie luate măsuri de împiedicare a deshidratării exvitroplantulelor, prin acoperirea ghivecelor cu cutii din material plastic, incolor. În cazul plantulelor de „roua cerului” (*Drosera rotundifolia*) (Fig. 2A-D) vitroculturile pot fi menținute clausturate mult timp, de exemplu cca. un an, ele înflorind *in vitro* fiind. De altfel, pot fi practicate și culturi de butoni florali, aceștia înflorind *in vitro*, pe substrat colorat, ceea ce mărește și mai mult efectul estetic al unor astfel de vitroculturi.

Efectul estetic al flacoanelor cu fitoinoculi sporește în cazul în care în mediul de cultură se fac combinații de variate sfere de *poliacrilamidă*, diferit colorate.

În Fig. 1Aa este ilustrat aspectul sferulelor de *poliacrilamidă* neîmbibate, iar în aceeași figură, în poziția b sunt prezentate sferulele respective după ce au fost îmbibate, de exemplu timp de 4 ore, în apă de robinet. Formațiunile de *poliacrilamidă* se găsesc în comerț fie în stare uscată, fie îmbibată, sub formă de sfere, sau ca și corpuri mici de forme variate- dreptunghiulare sau pătrate- cu dimensiuni de aproximativ 1 cm diametru,

transparente; ele pot fi incolore sau colorate și sunt comercializate sub diferite denumiri: *Plant balls, Pământ artificial, etc.*

Exemple de realizare a invenției

Pentru prepararea mediilor de cultură – potrivit prezentei propuneri de invenție- ce sunt destinate inoculării și creșterii fitoinoculilor, se respectă într-un totul compoziția mediilor de cultură și modul de eșalonare a introducerii variațiilor compuși chimici în acestea (indiferent de rețetele folosite), doar că în loc de *agar-agar*, în soluția finală, ca agent gelifiant, se adaugă sferurile sau granulele incolore sau colorate de *poliacrilamidă*, de regulă prealabil gonflante în apă distilată, timp de 1-24 de ore, după cât de mult se dorește să se solidifice mediul, după autoclavarea acestuia. După preparare, mediul acesta se repartizează în flacoane, care obturate fiind, se asepsizează potrivit metodologiilor clasice de autoclavare, practicate în mod curent, respectiv temperatura de 121°C (presiunea 1 atm.), timp de acțiune 25 de minute.

După răcirea și solidificarea mediilor de cultură, ce au fost autoclavate odată cu flacoanele, în hota sterilă, în regim aseptice, se procedează la introducerea pe substratul gelificat cu *poliacrilamidă* a variațiilor fitoinoculi. Sferurile sau granulele de *poliacrilamidă*- incolore sau colorate, preferabil transparente- procurate din comerț se introduc ca atare în mediile de cultură; dacă se dorește ca substratul de cultură să fie colorat uniform, se va proceda la *zdrobirea* sferulelor – uscate fiind- cu un aparat de măcinat piper sau cafea, ori la mărunțirea lor- îmbibate fiind, în prealabil, în apă sau în mediul de cultură- cu ajutorul unui blender. În cele ce urmează prezentăm câteva exemple de realizare a invenției:

1. În mediul de cultură, bază ***Murashige-Skoog*** (1962), care constă din macroelemente, microelemente și Fe EDTA (amestec mineral conform cu rețeta originală) plus vitamine: piridoxină HCl, tiamină HCl și acid nicotinic, mezo-inozitol și cu adaos de 30 g/l zaharoză și de variați regulatori de creștere, ce se gelifică cu *poliacrilamidă*- variat colorată- în loc de *agar-agar*. Pentru gelificare, recomandăm introducerea în mediu, prealabil repartizării acestuia în recipientele de cultură, fie a 2,5 g/l de particule de *poliacrilamidă*, aflate în stare uscată, fie a câte 50g/l de particule după ce ele au fost îmbibate, în prealabil, 4-24 ore în apă. Apoi, mediul de cultură se porționează în recipiente, după care acestea sunt autoclavate la temperatura de 121⁰C,

timp de 25 de minute. După răcirea recipientelor cu medii, granulele și-au păstrat forma și culoarea (Fig.1C-E). În cazul utilizării de sferule nefragmentate acestea se evaluează ca număr în raport cu greutatea lor aproximativă, astfel încât să nu se supraîncarce recipientul și să nu se suprasolidifice mediul de cultură după autoclavarea și solidificarea acestora în substrat. În continuare, după răcirea mediilor se procedează la inocularea fitoinoculilor pe mediul de cultură astfel constituit (Fig.1 A-C).

2) Sferulele sau granulele *hidratate de poliacrilamidă*, pot fi adăugate ca înlocuitor de agar-agar, în mediul de cultură și după mărunțirea lor cu ajutorul unui blender (Fig.2A-E), situație în care ele solidifică și colorează mediul de cultură după autoclavarea, dar își pierd forma sferică, diminuându-se efectul estetic.

3) Dacă se dorește ca substratul de cultură să fie colorat uniform, se va proceda la o *zdrobire* a sferulelor sau granulelor prin măcinare – uscate fiind- cu un aparat de mărunțit piper sau cafea, adăugându-le astfel în mediile de cultură ca înlocuitor de agar-agar, poliacrilamida fiind pulverulentă, sau fin granulată (Fig.3 A și B).

Important este faptul că, sferulele din *poliacrilamidă* colorate (probabil, cu coloranți vitali de tipul violetului de gențiană, a portocaliului de acridină, a albastrului de metilen, etc. folosiți în diluții mari), nu prezintă efecte fitotoxice, majoritatea fitoinoculilor evoluând excelent pe astfel de substrat de cultură.

După cum am mai menționat, **avantajele** utilizării unor astfel de medii de cultură constau nu numai în efectul lor estetic și, în consecință, deschiderea unor noi posibilități de valorificare prin comercializare a unor astfel de fitoinoculi (în special a celor constând din boboci), ci și în faptul că asemenea medii sunt mult mai puțin costisitoare decât cele gelificate cu *agar-agar*, întrucât dacă comparăm costul agar-agarului de tip *Difco Bacto Agar*, utilizat de regulă în solidificarea mediilor de cultură, costă 28 Roni per un litru de mediu, iar costul acestor granule de *poliacrilamidă*, folosite cu succes în același scop, la un litru de mediu este de 1 Ron; deci, utilizând *poliacrilamida* ca agent gelifiant, costurile de producere a substratului de cultură a fitoinoculilor se reduc foarte mult.

Revendicare

Poliacrilamida colorată (de regulă cu coloranți vitali, lipsiți de fitotoxicitate), sub formă de particule sau de sferule, poate fi utilizată în gelificarea mediilor aseptice de cultură- variate ca și compoziție- destinate cultivării *in vitro* a diferitelor tipuri de fitoinoculi; acest compus având capacitatea să se îmbibe în prezența apei, crescând în volum, la temperatura de autoclavare (120⁰C) se gelifică și după răcirea mediilor în care ea este prezentă conferă soliditate. Acest substrat, după răcire poate fi inoculat cu explante vegetale ce pot fi crescute în condiții de sterilitate. Gelurile realizate fiind colorate au un efect estetic deosebit și fitoinoculii cultivați pe astfel de medii de cultură pot fi comercializați cu succes, prețul de cost al mediilor cu *poliacrilamidă*, colorată sau nu, fiind mult mai scăzut decât a acelor gelificate cu agar-agar.

Inventatorii,

Prof.univ.dr. Cachiță Dorina,
Asist. cerc. drd. Ardelean Mirela,
Conf.univ.dr. Turcuș Violeta

Bibliografie

1. **CACHIȚĂ C.D., DELIU C., TICAN R.L., ARDELEAN A.**, 2004, *Tratat de biotehnologie vegetală*, vol.I, Editura Dacia, Cluj-Napoca.
2. **CACHIȚĂ C.D., ARDELEAN A.**, 2009, *Tratat de biotehnologie vegetală*, vol.II, Editura Dacia, Cluj-Napoca.
3. **CACHIȚĂ C.D.**,1987, *Metode in vitro la plantele de cultură- baze teoretice și practice*, Editura Ceres, București.
4. **MURASHIGE, T., SKOOG, F.**, 1962, *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. *Physiol. Plant.* 15:473-97.
5. **PETRUȘ-VANCEA, A., ȘIPOȘ, M., CACHIȚĂ C.D.**, 2007, *The aspects regarding Chrysanthemum vitro- and exvitroplantlets anatomical structure*, *Analele Univ. Oradea, Fasc. Biologie, Tom. XIV*, p. 65-68.

Revendicare

Poliacrilamida colorată (de regulă cu coloranți vitali, lipsiți de fitotoxicitate), sub formă de particule sau de sferule, poate fi utilizată în gelificarea mediilor aseptice de cultură- variate ca și compoziție- destinate cultivării *in vitro* a diferitelor tipuri de fitoinoculi; acest compus având capacitatea să se imbibe în prezența apei, crescând în voium, la temperatura de autoclavare (120°C) se gelifică și după răcirea mediilor în care ea este prezentă conferă soliditate. Acest substrat, după răcire poate fi inoculat cu explante vegetale ce pot fi crescute în condiții de sterilitate. Gelurile realizate fiind colorate au un efect estetic deosebit și fitoinoculii cultivați pe astfel de medii de cultură pot fi comercializați cu succes, prețul de cost al mediilor cu *poliacrilamidă*, colorată sau nu, fiind mult mai scăzut decât a acelor gelificate cu agar-agar.

Inventatorii,

Prof.univ.dr. Cachiță Dorina,
Asist. cerc. drd. Ardelean Mirela,
Conf.univ.dr. Turcuș Violeta

Bibliografie

1. **CACHIȚĂ C.D., DELIU C., TICAN R.L., ARDELEAN A.**, 2004, *Tratat de biotehnologie vegetală*, vol.I, Editura Dacia, Cluj-Napoca.
2. **CACHIȚĂ C.D., ARDELEAN A.**, 2009, *Tratat de biotehnologie vegetală*, vol.II, Editura Dacia, Cluj-Napoca.
3. **CACHIȚĂ C.D.**,1987, *Metode in vitro la plantele de cultură-* baze teoretice și practice, Editura Ceres, București.
4. **MURASHIGE, T., SKOOG, F.**, 1962, *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. *Physiol. Plant.* 15:473-97.
5. **PETRUS-VANCEA, A., ȘIPOȘ, M., CACHIȚĂ C.D.**, 2007, *The aspects regarding Chrysanthemum vitro- and exvitroplantlets anatomical structure*, *Analele Univ. Oradea, Fasc. Biologie, Tom. XIV*, p. 65-68.

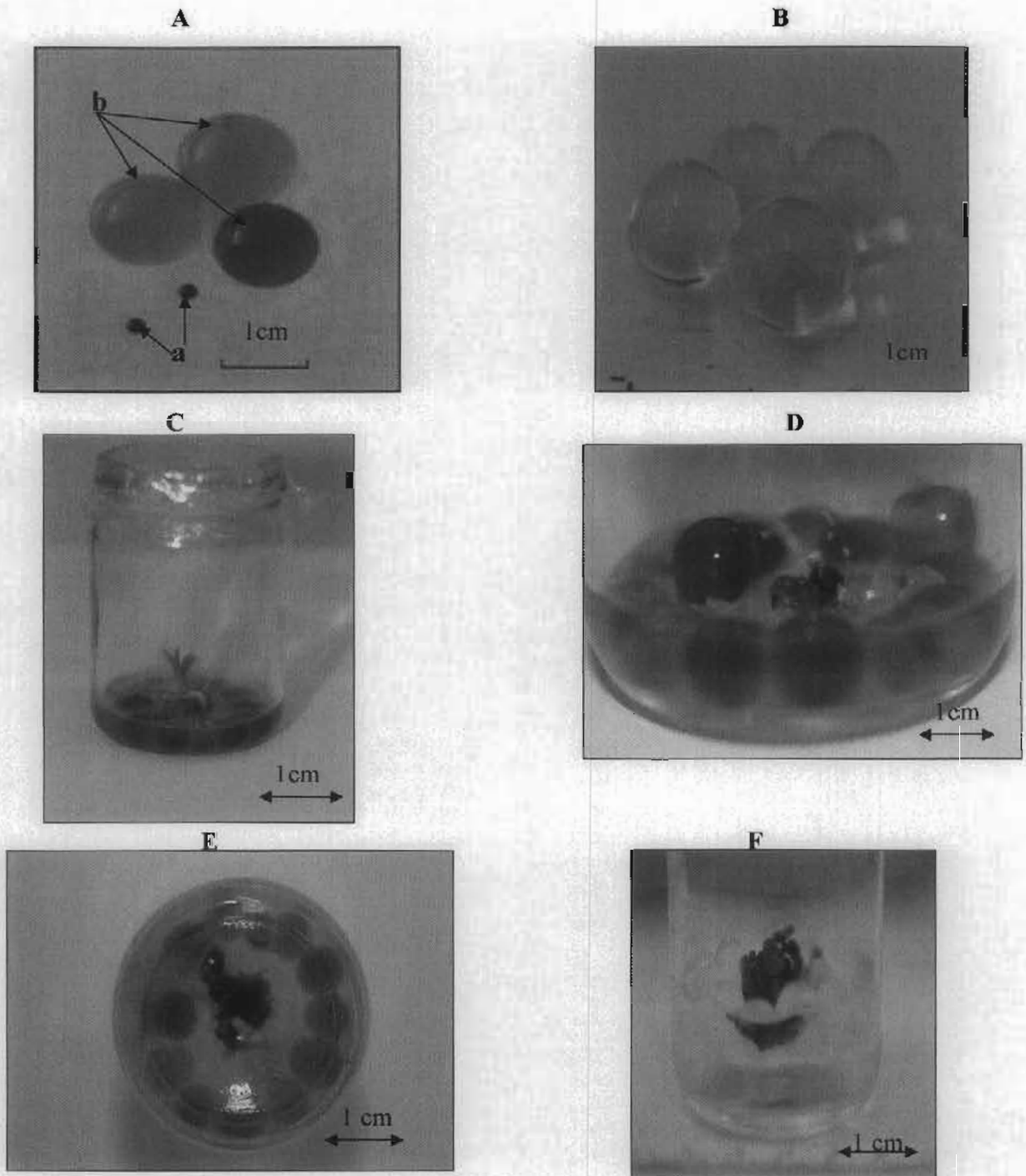


Fig. 1A-F - Sferule fine de poliacrilamidă (Aa- sferule de poliacrilamidă colorate neîmbibate; Ab- sferule de poliacrilamidă colorate după 4h de îmbibare în apă; B- sferule de poliacrilamidă incolore după 4h de îmbibare în apă; C-D- fitoinoculi de orhidee inoculați și creșcuți pe mediu solidificat cu sferule de poliacrilamidă colorate îmbibate timp de 4 h în apă distilată; E- vasul de cultură văzut în zona bazală; F- colonic de plantule de *Sedum telephium* ssp. *maximum* crescută pe mediu de cultură gelificat cu sferule incolore, transparente de poliacrilamidă).

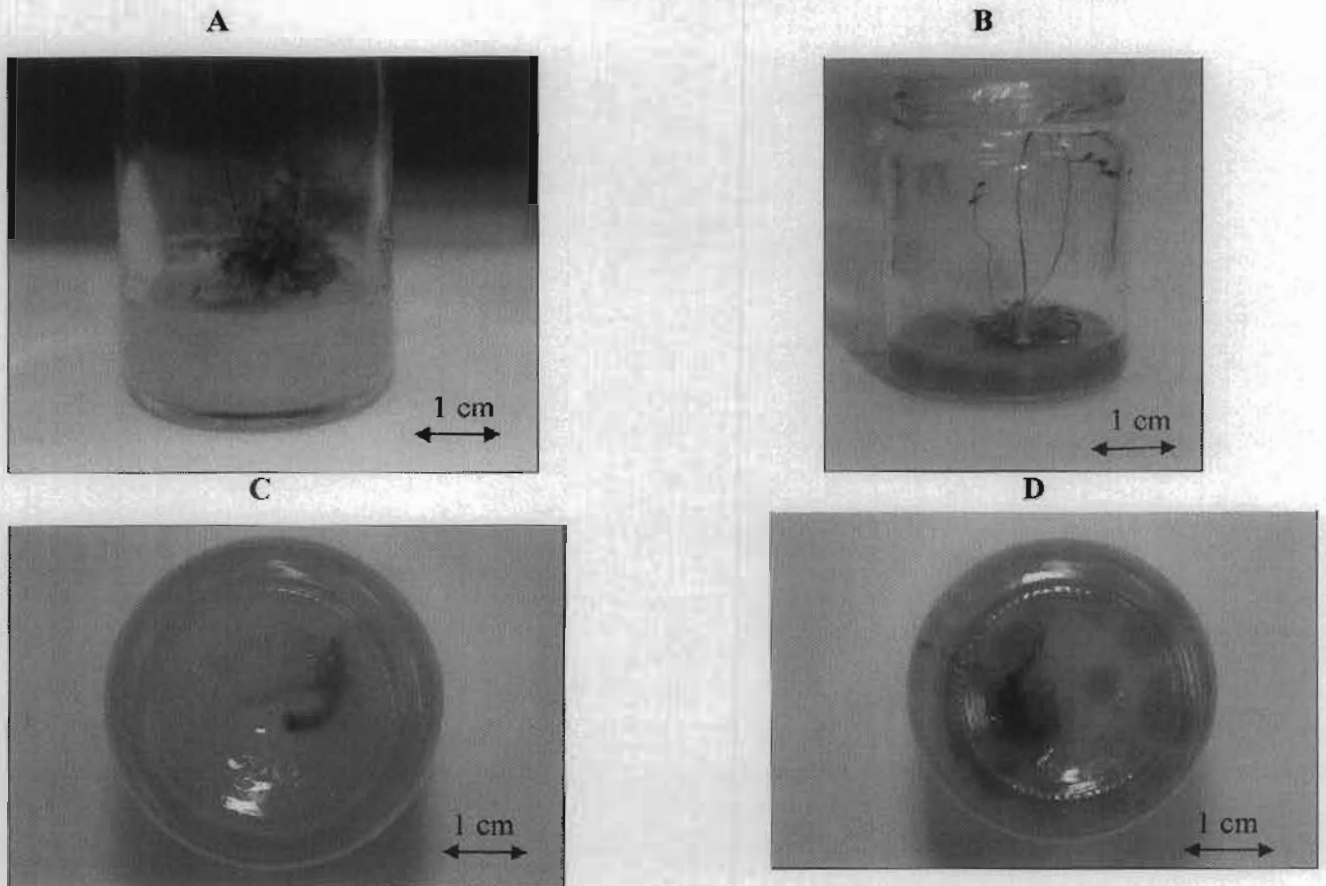


Fig. 2A-D Fitoinoculi crescuți pe medii solidificate cu sferulele de poliacrilamidă hidratate și mărunțite (A și B- plantule de *Drossera rotundifolia* înflorite; C și D- zona bazală a flacoanelor în care se vede textura mediului și formarea sistemului radicular

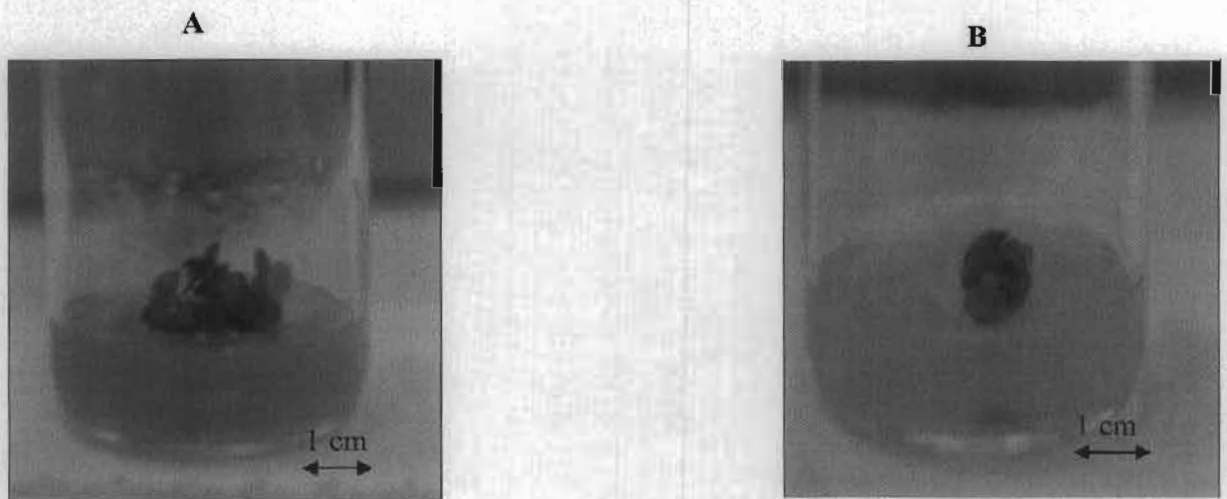


Fig. 3 Ași B- Substrat de cultură colorat uniform cu sferulele de poliacrilamidă uscate care au fost zdrobite cu un aparat de mărunțit piper sau cafea și adăugate astfel în mediul de cultură ca înlocuitor de agar-agar.