



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2014 00211**

(22) Data de depozit: **17/03/2014**

(41) Data publicării cererii:
27/11/2015 BOPI nr. **11/2015**

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

(72) Inventatori:
• **POP LIVIU, STR. LUNGĂ NR. 1/A,
ORADEA, BH, RO;**

• **CACHIȚĂ-COSMA DORINA,
ALEEA ȘNAGOV NR. 2, SC. 4, AP. 74,
ET. 3, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
• **TURCUȘ VIOLETA, STR. TÂRGULUI
NR. 5-7, BL. 15, ARAD, AR, RO;**
• **GRECU HORIAN-MIHAI,
STR. SIMION MEHEDIȚI NR. 8, BL. 96,
SC. A, ET. 7, AP. 43, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO**

(54) UTILIZAREA POLIMERILOR ELECTROLUMINISCENȚI LA ILUMINAREA VITROCULTURILOR VEGETALE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un sistem de iluminare a culturilor vegetale forțate, de exemplu, a iluminării fitoinoculilor crescuți pe medii agarizate sau în regim submers, în soluții nutritive lichide, în bioreactoare, cu dispozitive care au în structura lor polimeri electroluminiscenți. Sistemul conform invenției reprezintă o incintă de conservare a germoplasmei vegetale în condiții de vitrocultură, în regim de creștere lentă, confecționată din material lemnos, căptușit la interior cu folie reflectorizantă din aluminiu, pentru exploatarea maximă a cuantelor luminoase, în care se introduce o sursă de iluminare electroluminiscentă polimerică (LEP) și un alimentator pentru sursa de iluminare.

Revendicări: 1
Figuri: 4

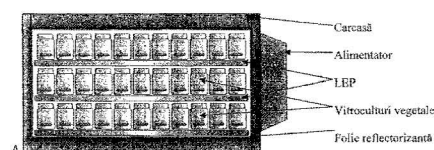
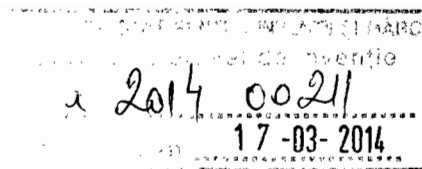


Fig. 3A





36

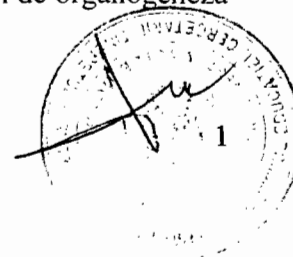
UTILIZAREA POLIMERILOR ELECTROLUMINISCENTI LA ILUMINAREA VITROCULTURILOR VEGETALE

REZUMAT

Invenția se referă la un sistem de iluminare a culturilor vegetale, forțate, de exemplu a iluminării fitoinoculilor crescuți pe medii agarizate sau în regim submers, în soluții nutritive lichide, în bioreactoare, cu dispozitive care au în structura lor polimeri electroluminiscenti (abreviat LEP – Light Emitting Polymers). În mod deosebit, dispozitivele electroluminiscente, polimerice, servesc la iluminarea vitroculturilor supuse unui regim de „creștere lentă”, pentru stocarea acestora în „bănci de gene”, dar și pentru retardarea creșterilor, pentru a mări intervalul de subcultură, reducând astfel costurile de întreținere pe timp îndelungat a vitroculturilor, și evitând riscurile de contaminare a acestora cu germeni, fără a anihila capacitatea regenerativă a inoculilor de proveniență variată, respectiv de natură vegetală sau algală. Conservarea acestora va putea fi făcută fie la temperatura camerei, fie la frigider, la $+4^{\circ}\text{C}$, în regim continuu de iluminare, sau în lumină intermitentă. Conductorii electroluminiscenti polimerici sunt economici, nu cresc temperatura ambientală, pot fi amplasați în imediata apropiere a culturilor, sunt emitenți de lumină albă ori colorată și pot fi submersați în bioreactoare etc.

DESCRIERE

Sistemele de iluminare pe bază de polimeri luminiscenti pot fi utilizați în scopuri variate, de exemplu - în funcție de intensitatea luminoasă realizată, în dependență de natura polimerilor și a frecvenței curentului electric care alimentează conductorii polimerici – putem varia intensitatea luminoasă a lor și, în raport cu aceasta, se poate lărgi gama de utilități a sistemelor realizate. Astfel, în cazul fitoinoculilor (vitroculturi vegetale) există diferite situații în care asemenea sisteme pot fi utilizate în variate tipuri de culturi efectuate *in vitro*, de exemplu, explante prelevate de la plante, sau subculturi (repicări) ale acestora, ori a culturilor algale, inoculi care pentru creșterea lor necesită lumină. Ele pot beneficia de un asemenea mod de iluminare în regim septic sau aseptice. În dependență de intensitatea luminii și, eventual, de culoarea acesteia, se poate influența capacitatea regenerativă a inoculilor, dar și procesele de morfogeneză și de organogeneză



28

la nivelul fitoinoculilor, viteza de creștere a organelor rămâne, sau încetinirea acestor fenomene, inclusiv a creșterii, dar cu păstrarea în timp a puterii lor regenerative, realizând ceea ce se numește un regim de "creștere lentă", procedură utilizată în „băncile de gene” profilate pe stocarea unor inoculi, măbind mult intervalul lor de subcultivare, fapt care reduce mult – în astfel de unități - prețurile de cost, în procedurile de conservare.

Invenția se referă la utilizarea sistemelor construite pe bază de polimeri electroluminiscenți (abreviat LEP – Light Emitting Polymers) pentru iluminarea culturilor vegetale, de exemplu a vitroculturilor de explante (fitoinoculilor), constând din organe, țesuturi, celule sau protoplaști, care fac obiectul a o serie de practici ce se înscriu în diferite categorii de biotehnologii vegetale, atât cu caracter teoretic, cât și practic, dar și a culturilor algale sau a altor viețuitoare dependente de lumină, în biobaze.

Important este faptul că, în biotehnologiile vegetale operându-se cu variate categorii de fitoinoculi, care au fost enumerate mai sus, ca plante fotoautotrofe, sunt dependente de lumină care reprezintă un factor indispensabil în menținerea acestora în viață, dar și în reglarea statutului lor, influențând procesele lor de morfogeneză, de organogeneză și de creștere.

Deci, un sistem de iluminare a fitoinoculilor cu LEP (Light Emitting Polymers), prin scăderea la o limită fiziologic satisfăcătoare a intensității luminii produsă de acestea, se poate încetini creșterea inoculilor pentru ca să se mărească cât mai mult intervalul de subcultură, păstrându-se vitalitatea și capacitatea regenerativă, de exemplu a materialului vegetal aflat în vitrocultură, facilitând nu numai menținerea lor în timp, ci și conservarea fitoinoculilor într-un regim optim de supraviețuire, răbind foarte mult intervalul de subcultură (repicarea și subcultivarea vitroculturilor), reducând costurile de perpetuare a germoplasmei care este cultivată „in vitro”, dar și conservarea acesteia în "bănci de gene", diminuând costurile legate de asigurarea necesarului de compuși pentru prepararea mediilor nutritive, dar și riscurile de contaminare cu germeni (infecțare) a substratului de creștere al vitroculturilor etc..

Utilitatea unor proceduri de iluminare cu LEP (Light Emitting Polymers) poate fi extinsă și la perioada de aclimatizare a exvitroplantulelor la viața în mediul natural de existență, respectiv cel septic, care durează timp de câteva săptămâni.



În condițiile operării cu culturi de celule, de organe vegetale, sau de alge, practicate în bioreactoare, pentru sintetizarea în acestea a produșilor secundari de metabolism, cum este cazul la fitoinoculi, care sintetizează în corpul lor substanțe cu o valoare fitoterapeutică ridicată a extractelor preparate din biomasa acestora, iluminarea vitroculturilor este absolut indispensabilă, iar variatele sisteme de iluminare de tip LEP (Light Emitting Polymers) ce au o durată lungă de funcționare, „corpul” lor „îmbrăcând” o gamă largă de forme, sunt foarte economice, nu încălzesc substratul, etc.; menționăm că, 1 Km de fir LEP consumă echivalentul energetic ce este necesar pentru alimentarea unui bec cu filament de 100 W, și are un potențial de iluminare de peste 200 Cd/m².

Alte avantaje ale iluminării cu LEP (Light Emitting Polymers) sunt:

- LEP-urile reprezintă o sursă de lumină unicat, ea beneficiind de conductori electrici cu diametre mici, ce pot avea lungimi nelimitate;
- sursele de LEP-uri emit de jur împrejurul lor - o lumină plăcută și uniformă, de-a lungul conductorului (360°) și pe toată lungimea acestuia;
- LEP-urile sunt surse netoxice de lumină (respectiv sunt ecologice) și au un grad foarte ridicat de siguranță;
- furnizează o lumină rece, și pot fi portabile;
- conductorii LEP sunt total flexibili, ei pot fi răsuciți, spiralați, îndoiți și/sau împlețiți și pot fi tăiați la orice lungime, după care trebuie racordați la sursa de curent electric;
- conductorii sau dispozitivele de tip LEP-urilor sunt disponibile într-o gama largă de culori;
- sunt rezistente la stropire și la submersarea în apă;
- LEP-urile pot fi alimentate de la baterii (prin convertoare) sau la rețeaua electrică, folosind transformatoare;
- LEP-urile au o durată foarte lungă de folosință, fiind durabile și nu se defectează într-un mod catastrofic;
- LEP-urile sunt certificate de către Comunitatea Europeană ca „fire de iluminat”; și sunt aprobate de MSHA (Mining Safty and Health Administration din SUA) pentru folosire ca “frânghii luminoase”, de exemplu în mine;



Referitor la actualul nivel al cunoștințelor în domeniul LEP-urilor, în cele ce urmează vom enumera câteva aspecte legate de construcția unor astfel de dispozitive.

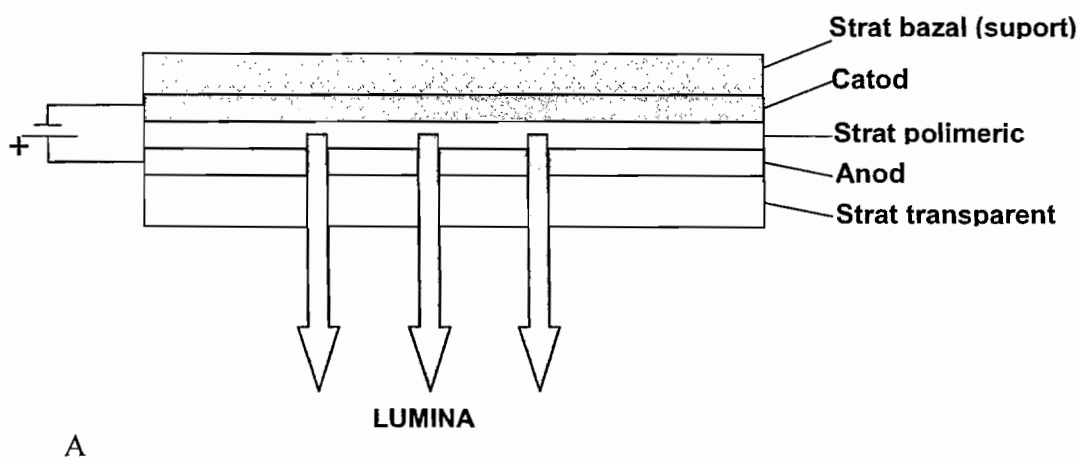
Tehnologia polimerilor electroluminiscenti (LEP - Light Emitting Polimers) ca substrat al diodelor organice electroluminiscente, a fost descoperită în Laboratoarele Cavendish ale universității Canbridge, în anul 1989.

Tehnologia a fost preluată de către o serie de instituții de cercetare și de către mari corporații din Anglia, Germania, SUA, Japonia și, în ultimul timp, din China, țări care au dezvoltat această tehnologie în diferite variante.

Principiul de bază al funcționării LEP-urilor constă în recombinarea electronilor difuzați dinspre catod, cu „golurile” dinspre anod, recombina care produce o descărcare de energie sub forma luminoasă, în masa polimerului.

Construcția specifică LEP-urilor:

- Un strat amorf din polimer electroluminiscent se aplică pe un substrat transparent (sticlă, plastic) între doi electrozi: catod și anod.
- Cei doi electrozi - sub influența unei diferențe de potențial - vor difuza electroni în stratul de polimer electroluminiscent (respectiv catod) și „goluri” (respectiv anod).
- Recombinarea electronilor cu „golurile” are loc prin interacțiune electrostatică cu degajare de energie luminoasă.
- Lungimea de undă a luminii degajate depinde de natura stratului de polimer electroluminiscent, folosit.



A

Fig. 1. Structura unui LEP cu formă plană.



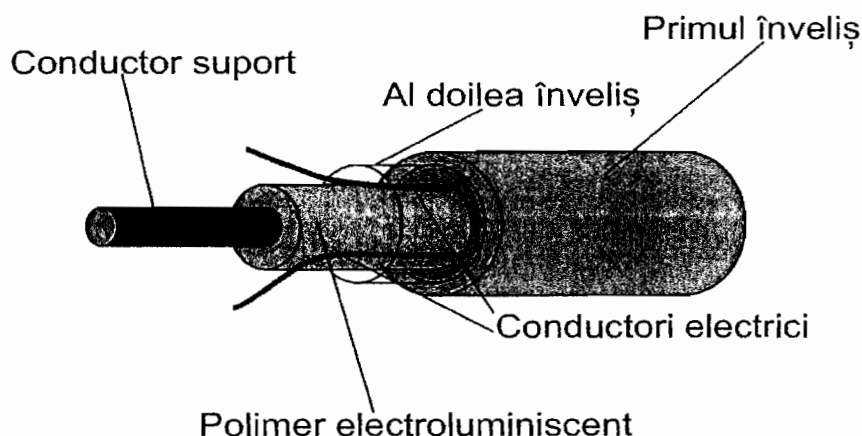


Fig.2. Structura unui LEP filiform.

EXEMPLU DE REALIZARE A INVENȚIEI

1. Incinte de conservare a germoplasmei vegetale în condiții de vitrocultură, în regim de creștere lentă, conceput de noi

Incinta realizată de noi a fost confecționată din material lemnos, căptușit la interior cu folie reflectorizantă din aluminiu, pentru exploatarea maximă a cuantelor luminoase, având următoarele dimensiuni:

- 30 cm lungime
- 13 cm lățime
- 11 cm înălțime
- 1 cm grosimea perete

Atât natura materialului din care a fost confecționată incinta, cât și dimensiunile acesteia, pot fi modificate în funcție de cerințele pe care le impune situația concretă unde urmează ca invenția să fie aplicată.

Ca sursă de iluminare a fost utilizat LEP (Light Emitting Polymers) filiform, emitent de lumină albă, cu o intensitate (la nivelul fitoinoculilor) de 120 lucși ($1,62 \mu\text{Moli/m}^2/\text{s}$), dar atât forma și dimensiunile LEP (Light Emitting Polymers), cât și intensitatea luminoasă ori culoarea luminii, pot fi modificate în funcție de cerințe.



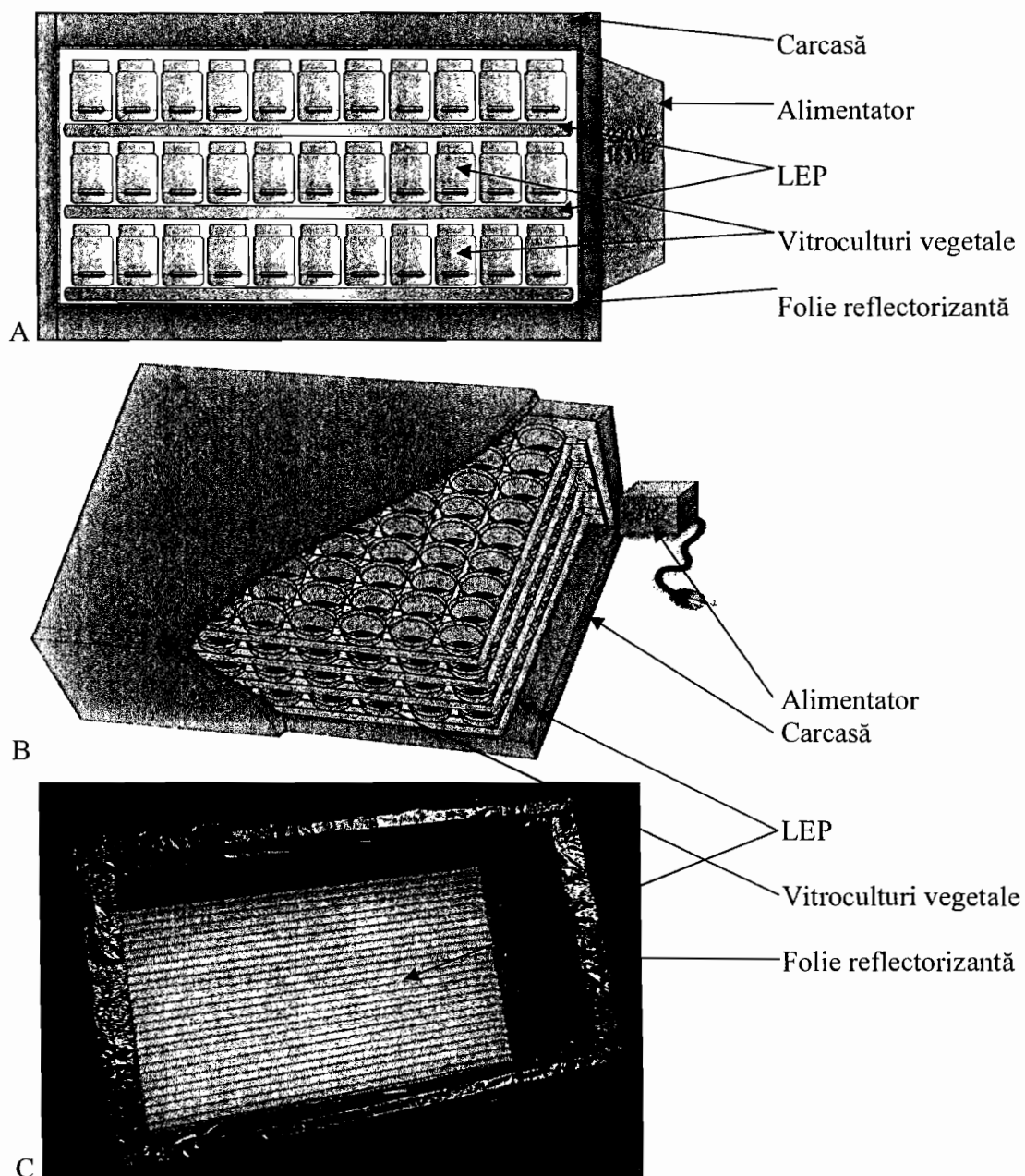


Fig. 3. Amplasarea polimerilor luminiscenti sub recipientele de cultură, în incintele de creștere (A - imagine plană; B - vedere de perspectivă; C - incinta construită de noi-vedere de sus) pentru conservare în bănci de gene, eventual în frigidere, a recipientelor cu fitoinoculi.



2. Pentru iluminarea unor vitroculturi tubul de polimeri poate fi dispus spiralat, mai strâns sau mai lax, pe o suprafață plană, sau ascendent, de exemplu într-un cilindru sau într-un bioreactor umplut cu aer sau cu mediu lichid.

EXEMPLU DE APLICARE A INVENȚIEI

Incintele iluminate cu LEP-uri (Light Emitting Polymers) au fost utilizate într-un experiment, care a avut ca scop demonstrarea aplicabilității acestor dispozitive la vitroconservarea germoplasmei vegetale, în condițiile vitrocultivării acestora, în regim de „creștere încetinită”. Intensitatea luminoasă - la baza recipientelor de cultură - a fost de 15 lucși, asigurându-se astfel un minim luminos necesar menținerii pigmentilor asimilatori de la nivelul fitoinoculilor într-un regim de supraviețuire, menținându-se astfel procesele metabolice ale vitroculturilor la o cotă scăzută de intensitate. Materialul biologic a constat din explante de *Solanum tuberosum* L., respectiv fragmente uninodale de tulpinițe provenite dintr-o vitrocultură anterioară dimensionate la 1 cm.

Ca mediu de cultură am utilizat mediul Murashige-Skoog (1962), lichid, lipsit de regulatori de creștere. În experiment am utilizat trei variante, și anume: un lot martor - crescut în condiții de temperatură și iluminare obișnuite, – optime, precum și două variante experimentale, după cum urmează:

- V_0 – culturi menținute la temperatura de 24°C, iluminare cu tuburi fluorescente albe, o fotoperioadă de 16 h lumină/8 h întuneric, intensitate luminoasă 1200 lucși ($16,2 \mu\text{Moli/m}^2/\text{s}$);
- V_1 – culturi menținute la temperatura de 24°C și o iluminare cu LEP-uri emitente de lumină albă – în regim continuu – cu o intensitate de 120 lucși ($1,62 \mu\text{Moli/m}^2/\text{s}$);
- V_2 – culturi menținute în frigider, la o temperatură de 4°C și o iluminare cu LEP-uri emitente de lumină albă, în regim continuu, cu o intensitate de 120 lucși ($1,62 \mu\text{Moli/m}^2/\text{s}$).

Flacoanele cu vitroculturile lotului martor au fost așezate pe rafturi, în camera de creștere, aflată sub lumină fluorescentă, albă, în regim fotoperiodic de 16 h/24 h; variantele experimentale V_1 și, respectiv, V_2 ce au fost expuse la lumină albă, continuă, emisă de LEP-uri, vitroculturile fiind așezate în incintele confecționate de noi (fig. 3); cutia cu probele variantei V_1 au fost menținute la 24°C, iar cutia cu lotul experimental V_2



a fost introdusă în frigider și păstrată la o temperatură +4°C. Experimentul a durat 60 de zile, timp suficient pentru a face observațiile vizând evoluția parametrilor biologici monitorizați (tabelul 1) și a trage concluziile de rigoare, care, în cele din urmă, au validat ipoteza că LEP-urile pot servi la realizarea cu succes a programelor de vitroconservare a germoplasmei în „băncile de gene”, în cazul de față a celei vegetale.

Fitoînoculii au constat din minibutași, uninodali, confecționați din tulpinițele regenerare din vitroplantule de cartof (*Solanum tuberosum*). Aspectul vitroplantulelor - la 60 de zile de la inoculare - este ilustrat în figura 4, iar valorile parametrilor monitorizați se regăsesc în tabelul 1. Din imaginea figurii 4, se poate observa, chiar și cu ochiul liber, fără a recurge la metode instrumentale de evaluare, faptul că la variantele experimentale V₁ și V₂, probe iluminate cu LEP-uri - la o intensitate luminoasă de 120 lucși - inoculii au avut o creștere mult mai redusă, în comparație cu cei cultivați la lotul de control, V₀.

Prin analiza statistică a datelor experimentale, efectuată cu programul MS Excel, a fost evidențiată semnificația diferențelor față de martor utilizând *testul T* aplicat la șiruri cu varianțe inegale și cu două extremități (two tailed).



Fig. 4 – Aspectul vitroculturilor de cartof (*Solanum tuberosum*), la 60 de zile de vitrocultură pe medii de cultură lichide [V₀ – vitroculturi menținute la temperatura de +24°C și iluminare cu tuburi fluorescente albe, într-o fotoperioadă de 16h lumină/24h, la 1200 lucși (16,2 μMoli/m²/s); V₁ – vitroculturi menținute la temperatura de +24°C și iluminare cu LEP-uri la 120 lucși (1,62 μMoli/m²/s); V₂ – vitroculturi menținute la temperatura de +4°C și iluminare continuă cu LEP-uri cu o intensitate de 120 lucși (1,62 μMoli/m²/s)].



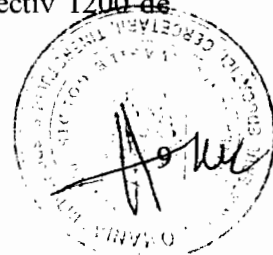
28

Tabelul 1 – Valorile medii ale parametrilor monitorizați la nivelul vitroculturilor de *Solanum tuberosum*, la 60 de zile de vitrocultură pe medii de cultură lichide V₀ – vitroculturi menținute la temperatura de +24°C și iluminare fluorescentă albă, emitente de 1200 lucși (16,2 μMoli/m²/s) în regim de 16h lumină/24h; V₁ – vitroculturi menținute la temperatura de +24°C și iluminare continuă cu LEP-uri emitente de lumină albă, cu o intensitate de 120 lucși (1,62 μMoli/m²/s); V₂ – vitroculturi menținute la temperatura de +4°C și iluminare cu LEP-uri la 120 lucși (1,62 μMoli/m²/s).

Nr.crt.	Parametrul	Varianta experimentală					
		V ₀		V ₁		V ₂	
		Valoare absolută	%	Valoare absolută	%	Valoare absolută	%
1	Lungime medie tulpiniță (cm)	8,3	100	2	24,09	1,2	13,58
	Abaterea standard	0,3232		0,1414		0,1054	
	Varianța	0,1044		0,0200		0,0111	
	Semnificația statistică	-		***		***	
2	Număr mediu de frunzulițe	19,2	100	3	15,06	0	0
	Abaterea standard	1,2293		0,6667		0	
	Varianța	1,5111		0,4444		0	
	Semnificația statistică	-		***		***	
3	Număr mediu de lăstari	2,1	100	2	94,78	0	0
	Abaterea standard	0,3162		0,6667		0	
	Varianța	0,1000		0,4444		0	
	Semnificația statistică	-		***		***	
4	Lungime medie rădăcinițe (cm)	3,4	100	2,8	82,35	1,2	35,29
	Abaterea standard	0,1886		0,2449		0,1700	
	Varianța	0,0356		0,0600		0,0289	
	Semnificația statistică	-		**		***	
5	Număr mediu de rădăcinițe	3,3	100	3,8	115,15	2,1	63,63
	Abaterea standard	0,4830		0,4216		0,3162	
	Varianța	0,2333		0,1778		0,1000	
	Semnificația statistică	-		**		***	

Legenda: * - diferența față de martor semnificativă; ** - diferența față de martor distinct semnificativă; *** - diferența față de martor foarte semnificativă (semnificație din punct de vedere statistic).

Vitroculturile constând din minibutași de cartofi, crescute sub o lumină albă, de intensitate scăzută, dar continuă (120 lucși), emisă de LEP-uri, au prezentat o creștere mult mai lentă decât cele cultivate în condiții normale de iluminare, respectiv 1200 de lucși, mai ales cele care au fost stocate în figider (fig. 3).



În situația coborârii temperaturii în camera de creștere, în cazul nostru prin plasarea vitroculturilor în frigider, la o temperatură continuă de + 4°C și o intensitate luminoasă non stop de 120 lucși, fenomenul de creșterea a minibutașilor de cartof a avut loc cu o intensitate mult mai redusă, în condițiile menționate acesta fiind aproape insesizabilă. De menționat este faptul că, într-un astfel de regim rizogeneza (formarea de rădăcinițe) a fost prezentă la flacoanele din ambele tipuri de variante experimentale, iar după trecerea acestor vitroculturi la un regim optim de lumină și de temperatură, regenerarea se reia și creșterea acestora intră în regim de normalitate.

Rezultatele acestui experiment susțin ipoteza că vitroculturilor de *Solanum tuberosum* li se poate asigura un regim de creștere lentă, în vederea conservării acestei specii în „living collections”, prin utilizarea luminii de slabă intensitate, obținută din surse cu polimeri electroluminiscenti.

Această tehnică poate fi aplicată - în funcție de scopul urmărit - în diferite alte tipuri de vitroculturi de fitoinoculi, sau în culturi algale.

REVENDICARE

Sistemul de iluminare cu LEP (Light Emitting Polymers), utilizat în scopul asigurării necesarului de lumină indicat de tipul de vitrocultură ales, în ceea ce privește durata de iluminare, intensitatea luminoasă, natura luminii, sunt parametrii care pot fi reglați după dorință, în funcție de condițiile experimentale impuse. Ceea ce caracterizează dispozitivele de acest tip privește realizarea unor economii de energie, o sporire a densității flacoanelor cu inoculi în spații limitate (cum este și cazul frigiderelor), iar în mediile lichide - de exemplu în bioreactoare de mare capacitate (ce necesită prezența luminii în interiorul lor, la vitroculturile fotoautotrofe), pentru asigurarea în întreaga masă a acestora a luminii, de diferite lungimi de undă, acest sistem de iluminare poate fi aplicat cu succes, de exemplu în vitroculturile vegetale sau algale, ca de altfel și în culturile forțate, păstrate în sere sau solarii, care pe perioada de cultură nu necesită o intensitate luminoasă mare. Lumina poate fi reglată în regim continuu sau cu intermitență, (pulsatorie), sau poate fi administrată într-un regim programat.



În situația coborârii temperaturii în camera de creștere, în cazul nostru prin plasarea vitroculturilor în frigider, la o temperatură continuă de + 4°C și o intensitate luminoasă non stop de 120 lucși, fenomenul de creșterea a minibutașilor de cartof a avut loc cu o intensitate mult mai redusă, în condițiile menționate acesta fiind aproape insesizabilă. De menționat este faptul că, într-un astfel de regim rizogeneza (formarea de rădăcinițe) a fost prezentă la flacoanele din ambele tipuri de variante experimentale, iar după trecerea acestor vitroculturi la un regim optim de lumină și de temperatură, regenerarea se reia și creșterea acestora intră în regim de normalitate.

Rezultatele acestui experiment susțin ipoteza că vitroculturilor de *Solanum tuberosum* li se poate asigura un regim de creștere lentă, în vederea conservării acestei specii în „living collections”, prin utilizarea luminii de slabă intensitate, obținută din surse cu polimeri electroluminiscenti.

Această tehnică poate fi aplicată - în funcție de scopul urmărit - în diferite alte tipuri de vitroculturi de fitoinoculi, sau în culturi algale.

REVENDICARE

Sistemul de iluminare cu LEP (Light Emitting Polymers), utilizat în scopul asigurării necesarului de lumină indicat de tipul de vitrocultură ales, în ceea ce privește durata de iluminare, intensitatea luminoasă, natura luminii, sunt parametrii care pot fi reglați după dorință, în funcție de condițiile experimentale impuse. Ceea ce caracterizează dispozitivele de acest tip privește realizarea unor economii de energie, o sporire a densității flacoanelor cu inoculi în spații limitate (cum este și cazul frigiderelor), iar în mediile lichide - de exemplu în bioreactoare de mare capacitate (ce necesită prezența luminii în interiorul lor, la vitroculturile fotoautotrofe), pentru asigurarea în întreaga masă a acestora a luminii, de diferite lungimi de undă, acest sistem de iluminare poate fi aplicat cu succes, de exemplu în vitroculturile vegetale sau algale, ca de altfel și în culturile forțate, păstrate în sere sau solarii, care pe perioada de cultură nu necesită o intensitate luminoasă mare. Lumina poate fi reglată în regim continuu sau cu intermitență, (pulsatorie), sau poate fi administrată într-un regim programat.