



(12)

## CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2010 00736**

(22) Data de depozit: **13.08.2010**

(41) Data publicării cererii:  
**30.04.2012** BOPI nr. **4/2012**

(71) Solicitant:  
• **UNIVERSITATEA DIN ORADEA,**  
**STR.UNIVERSITĂȚII NR.1, ORADEA, BH,**  
**RO**

(72) Inventatori:  
• **PETRUȘ ADRIANA, STR.ROȘIORILOR**  
**NR.19, BL.PB 18, ET.4, AP.19, COD 410213,**  
**ORADEA, BH, RO;**

• **RADOVEȚ DORINA, STR.TRANSILVANIEI**  
**NR.33, BL.B 58, ET.4, AP.25, COD 410396,**  
**ORADEA, BH, RO;**

• **CACHIȚĂ DORINA, ALEEA SNAGOV**  
**NR.2, SC.4, AP.74, COD 4000420, CLUJ**  
**NAPOCA, CJ, RO**

(54) **PROCEDURI DE PREVENIRE SAU DE ANIHILARE A  
HIPERHIDRIEI LA FITOINOCULI CU AJUTORUL APEI PI**

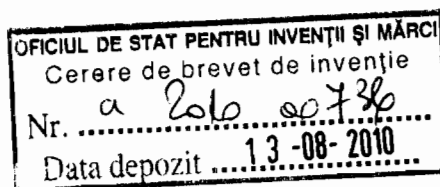
(57) **Rezumat:**

Prezenta invenție se referă la un procedeu de prevenire sau anihilare a hiperhidriei la fitoinoculi, prin utilizarea în mediul de cultură a apei Pi, utilizând un sistem de culturi în dublu strat, cel bazal, solidificat cu un agent

solidificant, iar cel lichid, aplicat ca și supernatant, conținând în compoziția sa apă Pi sau glucoză.

Revendicări: 2





## **PROCEDURI DE PREVENIRE SAU DE ANIHILARE A HIPERHIDRIEI LA FITOINOCULI CU AJUTORUL APEI PI**

### **DESCRIERE**

#### **Domeniul tehnic**

Invenția se referă la două proceduri: una de anihilare, cealaltă de prevenire a unui fenomen neoplazic care apare la nivelul fitoinoculilor și anume hiperhidria, utilizând apa Pi.

#### **Stadiul tehnicii**

În industria de micropropagare există importante pagube economice în urma apariției de necontrolat a hiperhidriei, un fenomen neoplazic caracterizat prin modificări de ordin morfo-anatomic, fiziologic, biochimic și ultrastructural, mai ales la specii recalcitrante, precum cele ale genului *Beta*, *Asparagus*, *Petunia*, *Coleus* și încă nu s-au putut descoperi soluții cu valoare practică mondială și mai ales cu caracter de generalizare.

Factorii care induc și susțin o astfel de stare, la nivelul vitroplantulelor sunt necunoscuți. La actualul nivel al cunoștințelor, sunt incriminate variate cauze, ca fiind producătoare de hiperhidrie, la vitroculturile vegetale. Dintre cei mai des menționați sunt: temperaturi prea ridicate în camerele de creștere; atmosfera din recipientele de cultură; natura și concentrația regulatorilor de creștere; sursa de carbon; umiditatea excesivă din vasele de cultură; starea fizică a mediului de cultură și agentul solidifiant; agentul chimic de dezinfectare a suprafeței materialului vegetal; concentrația ionilor de amoniu; dar și o anumită predispoziție genetică a unor specii vegetale, la acest fenomen etc. (Cachiță și colab., 2004).

Potrivit literaturii de specialitate - deosebit de bogată în acest domeniu, ceea ce demonstrează interesul acordat de cercetători acestui fenomen - metodele de prevenire a hiperhidriei sunt variate, printre acestea menționăm ventilarea recipientelor de cultură pentru eliminarea excedentului de etilenă nativă, suplimentarea concentrației de agar-agar în substrat, anihilarea producției de etilenă în vasele de cultură, prin adăugarea în compoziția acestora de săruri de azotat de argint sau de clorură de cobalt ș.a.m.d.. Procedurile de prevenire sau de anihilare a hiperhidriei pot fi grupate în funcție de factorii exogeni (ecofiziologici) sau endogeni care produc fenomenul. În hiperhidrie, situația generală este extrem de complexă și polifactorială, iar reacția fitoinoculilor – în condițiile create – este dependentă de modul de "filtrare" a acestora de către factorii endogeni și de capacitatea adaptativă a fitovitroculturilor în regimul creat. Aceste

proceduri deja cunoscute, de reducere a hiperhidriei, prezintă dezavantajul că inhibă și procesul de multiplicare desfășurat la nivelul inoculilor, atenuează marcant creșterea, micșorează randamentul într-o unitate de producție, ridică costurile și scad calitatea răsadurilor. Industria modernă este axată pe înmulțirea plantelor de interes economic în bioreactoare, în regim submers, sistem care favorizează, o dată în plus, apariția hiperhidriei.

Eficiența măsurilor practicate până în prezent, în eradicarea hiperhidriei este încă slabă, iar reacția fitoinoculilor este – într-o foarte mare măsură – dependentă de genotipul vegetal vitrocultivat. Dintre metodele practicate până în prezent în scopul prevenirii hiperhidriei amintim (după Cachiță și colab., 2009): evitarea suprapopulării recipientelor de cultură; creșterea concentrației de agar-agar; utilizarea unor punți de hârtie sau de lignoskeleton în mediul lichid; scăderea concentrației de citochinine; eliminarea ionilor de amoniu din compoziția mediului de cultură; creșterea concentrației de Fe sau de Mg; aport suplimentar de Ca; înlocuirea agar-agarului cu pectină sau cu agar hidrolizat; adăugarea cărbunelui activ în mediul de cultură; utilizarea unui retardant de tipul acimidolului sau paclobutrazonei în mediul de cultură din bioreactoare; adăugarea în mediul de cultură a unor hidrolizate preparate din proteine din pește; adăugarea de manitol sau sorbitol mediului de cultură; adăugarea de elemente rare (La, Ce sau Nd) în compoziția mediului de cultură; răcirea zonei superioare a recipientelor de cultură, timp de 28 de zile; cocultura fitoinoculilor cu tulpini ale bacteriei *Pseudomonas*.

Metodele de anihilare a hiperhidriei deja instalate la nivelul fitoinoculilor menționate de literatura de specialitate sunt: subcultivarea de pe medii cu benziladenină, pe medii lipsite de regulatori de creștere; altoirea lăstarilor vitrificați pe alții nevitrificați; răcirea bazei recipientelor de cultură sau menținerea culturilor la 5 °C, timp de 5 zile; subcultivarea lăstarilor hiperhidrici pe medii în care agar-agarul a fost înlocuit cu amestec de amidon de porumb și Gelrite; ventilarea vaselor de cultură cu ajutorul unor capace speciale; utilizarea unui sistem de imersie și suplimentarea CO<sub>2</sub> (după Cachiță și colab., 2009).

Există o metodă elaborată de către noi tot în scopul anihilării (cu o eficiență ridicată) a hiperhidriei deja instalate la nivelul vitroplantulelor, prin culturi în dublu strat utilizând apă sărăcită în deuteriu (Cachiță și colab., in curs de brevetare). De asemenea, tot cu ajutorul apei sărăcite în deuteriu, noi am reușit să prevenim apariția fenomenului neoplazic. Cele două proceduri pe care dorim să le propunem acum pentru brevetare, față de cele amintite anterior - care fac deja obiectul unei cereri de brevetare – prezintă avantajul că utilizează apa Pi, care este

de 20 ori mai ieftină, comparativ cu apa sărăcită în deuteriu, iar la specii precum *Petunia* a avut un efect mai bun comparativ cu apa sărăcită în deuteriu.

Începând de primele cercetări ale hiperhidrie, descrisă pentru prima dată de Gautheret, în anul 1977, cercetătorii au descris aspectele fiziologice, morfo-anatomice și ultrastructurale ale fenomenului. Există mai multe grade de hiperhidrie, în ceea ce privește exteriorizarea (caracterele fenotipice) fitoinoculilor, în marea lor majoritate, simptomele de anormalitate descrise sunt ireversibile, factorul genetic acționând de manieră decisivă în amploarea destrucțiilor și a malformațiilor provocate biostructurilor vegetale de către condițiile ambientale în care evoluează fitoinoculii (George, 1996). Uneori, comparativ cu lăstarii normali, vitrotulpinițele cu simptome slabe de hiperhidrie manifestă o creștere mult mai rapidă (Aitken și colab., 1985), ele prezentând o rată mai ridicată de regenerare de mugurași axilari, însă, dacă condițiile de vitrocultură nu se echilibrează, unele dintre aceste avantaje pot să dispară, iar plantulele să intre într-un stadiu mai avansat de hiperhidrie și să piară. Pentru ca hiperhidria să poată fi valorificată în tehnicile de micropropagare, atunci când se dorește creșterea masei vegetale aeriene, este recomandat utilizarea unor metode de înlăturare a fenomenelor nedorite, manifeste la nivelul vitroplantulelor vitrificate, astfel încât să se reușească aclimatizarea cu succes a ex vitro plantulelor, în momentul transferării lor în mediu septic.

Procedeu conform invenției noastre are la bază substituirea – totală sau parțială – a apei bidistilate din compoziția mediilor de cultură, cu apă Pi. Principiile metodelor inventate de noi constă fie în prevenirea, fie în anihilarea procesului de hiperhidrie, la nivelul variatelor tipuri de fitoinoculi, cu ajutorul apei Pi.

Pentru cunoașterea factorilor implicați în fenomenele de cancerizare a celulelor vegetale, vitrocultivate, sub acțiunea unor condiții exogene, care exercită o stare de stres, noi am făcut multiple cercetări privind creșterea fitoinoculilor în variate condiții, suplimentând aceste studii cu analize de enzimologie și cu examinări de microscopie electronică. Am reușit să provocăm hiperhidria cu ajutorul tratamentelor cu Ethrel, un preparat comercial care are ca principiu de bază acidul cloroetilfosfonic, ce – în timp – se descompune în etilenă și în acid fosforic, etilena, fiind unul dintre principalii factori cauzatori de hiperhidrie, în condițiile în care sunt depășite anumite praguri de toleranță; prin creșterea în recipientele de cultură a nivelului de etilenă se declanșează, în țesuturi – aproape instantaneu – hiperhidria.

**Problema tehnică** pe care o rezolvă invenția este realizarea a două proceduri, prima vizând prevenirea, iar cea de-a doua anihilarea hiperhidriei din vitroculturile vegetale, prin înlocuirea din compoziția mediului de vitrocultură a apei distilate cu apă Pi, respectiv prin realizarea unui sistem în dublu strat, în care, peste un strat de mediu de cultură solid, mineral, de bază, Murashige – Skoog (1962), cu modificările aduse de noi, s-a adăugat un al doilea strat, lichid, ca supernatant, cu conținut de apă Pi.

În raport cu stadiul tehnicii, invenția prezintă următoarele avantaje: costuri mult mai reduse de micropropagare; eficiență bună în producerea rezultatului scontat (înlăturarea hiperhidriei); aplicabilitate facilă, atât din punct de vedere al componentei utilizate (apa Pi), cât și a realizării procedurii.

Tehnicile - conform modelelor propuse de noi pentru prevenirea, respectiv pentru anihilarea hiperhidriei - vizează fie substituirea totală a apei distilate din substratul de cultură a fitoinoculilor cu apă Pi, fie efectuarea de culturi în dublu strat, în care peste mediul de cultură agarizat, pe care se află fitoinoculii, să se aplice un supernatant constând din apă Pi sau o soluție – de exemplu de glucoză sau de zaharoză – preparată cu apă Pi. În primul caz, măsura determină prevenirea apariției fenomenului neoplazic, iar în cel de al doilea, prin aplicarea supernatantului peste vitroplantulele deja aflate într-un stadiu incipient de vitrificare, tehnica conduce la anihilarea sau atenuarea fenomenului respectiv, efect descoperit de noi în urma cercetărilor executate pe variate modele experimentale și la mai multe specii vegetale.

Se dă în continuare câte un exemplu de realizare a invenției, respectiv a celor două proceduri, de prevenire și de anihilare a hiperhidriei din vitroculturi:

În scopul **prevenirii** hiperhidriei, la vitroculturile de sfecla de zahăr (*Beta vulgaris* var. *Saccharifera*) (predispuse, în foarte mare măsură, în mod nativ, la hiperhidrie), minibutașii uninodali, apicali – proveniți de la vitroplantule rezultate în urma germinării semințelor în condiții aseptice, pe un mediu mineral Murashige-Skoog (MS) (1962), ½, lipsit de regulatori de creștere, aportul de compuși organici fiind modificat de noi – în raport cu rețeta originală – după cum urmează: tiamină HCl, piridoxină HCl și acid nicotinic, câte 0,1 mg/l, în loc de 0,5 mg/l; totodată, mediul a fost lipsit de glicină și a conținut doar 20 g/l zaharoză, în loc de 30 g/l, concentrația stipulată în rețeta originală; solidificarea mediului de cultură s-a făcut cu 7 g/l agar-agar, iar pH-ul mediului de cultură a fost ajustat la valoarea de 5,7, prealabil autoclavării acestuia. Minibutașii au fost subcultivați tot pe mediu de cultură descris anterior, dar cu componentele

minerale ale mediului neînjumătățite și cu adaos de 2,5 mg/l BA. Componentele chimice au fost dizolvate fie în apă distilată, la lotul control (de referință), mediul fiind lipsit de regulatori de creștere (varianta  $V_0$ ), fie – într-o variantă secundară ( $V_1$ ) – mediul a conținut și citochinină de sinteză; benziladenină (BA) inductoare de hiperhidrie, fie – la varianta  $V_2$  – toate substanțele au fost solvite în apă Pi, în substrat fiind prezentă și BA în concentrație de 2,5 mg/l, similară cu cea folosită la varianta  $V_1$ , utilizată pentru provocarea hiperhidriei.

După inocularea minibutașilor, recipientele de cultură au fost amplasate timp de 30 de zile în camera de creștere, la temperatura de 23-25° C, iluminate fiind cu tuburi fluorescente (emitente de lumină albă), cu o intensitate luminoasă de 1700 lucși și fotoperioada de 16 h lumină/24h.

Dacă la lotul martor (cu conținut de BA și preparat cu AD), la care din totalul mediu de 9 frunzulițe, în medie de 3,5 (cca 1/3 sau 38% hiperhidrie din totalul de frunzulițe) exemplare sufereau de un avansat stadiu de transparentizare (hiperhidrie), la lotul de vitroplantule cultivat pe medii de cultură preparate cu apă Pi (cu adaos de 2,5 mg/l BA), procentul de frunzulițe hiperhidrice a fost mult mai scăzut decât la varianta martor cu 85,7%. Altfel spus, din totalul de 7 frunzulițe/inocul, în medie doar 0,5 exemplare sufereau de hiperhidrie (adică incidența hiperhidriei per lot experimental a fost de 7%). Deci, apa Pi a avut o contribuție majoră în prevenirea producerii hiperhidriei la sfecla de zahăr. Rezultatele privind indicii de creștere au fost asigurate statistic, iar aspectele privind starea de normalitate/anormalitate a frunzelor au fost evaluate structural, ultrastructural și biochimic.

În scopul **anihilării** efectelor nedorite provocate de hiperhidrie, produse la nivelul vitroplantulelor de *Coleus* și de *Petunia*, am realizat un sistem de vitrocultură în dublu strat, caz în care peste materialul vegetal hiperhidric s-a aplicat un supernatant. Mediul de cultură utilizat ca substrat agarizat a fost cel folosit de noi anterior (Bază MS, 1962), lipsit de regulatori de creștere; condițiile de vitrocultură au fost identice cu cele amintite mai sus. După 60 de zile de vitrocultură, hiperhidria a fost manifestă fie din cauza menținerii culturilor la temperaturi de 40°C (la *Coleus*), fie ca urmare a înlocuirii agentului de solidificare agar-agar, cu biogel, în fragmente de lignoskeleton de lufa (la *Petunia*). Pentru a anihila hiperhidria, în condiții sterile, peste vitroculturi s-a aplicat al doilea strat, ca supernatant, care a constat din:

- ↓ la *Coleus*:  $V_0$  - apă distilată (AD) (martor);
- $V_1$  - apă Pi (APi);
- $V_2$  - soluție de glucoză 1,5 %, preparată în apă distilată (G);
- $V_3$  - soluție de glucoză 1,5 %, preparată în apă Pi (G - APi).

- ✦ la *Petunia*: V<sub>0</sub> - apă distilată (AD) (martor);  
V<sub>1</sub> - apă Pi (APi).

La 30 zile de la administrarea celui de al doilea strat, cu conținut de apă Pi sau/și glucoză, reacția vitroplantulelor de *Coleus* rezultate în subkultură din vitroculturi hiperhidrice tratate cu diferite ape, a fost în dependență de tipul de supernatant administrat - cel de al doilea strat din sistemul de cultură dublu strat. Astfel, vitroculturile potrivit variantelor V<sub>0</sub> - AD (martor), V<sub>1</sub> - APi, V<sub>2</sub> - G (soluție de glucoză 1,5 %) au rămas într-o stare avansată de hiperhidrie, neputând fi aclimatizate (s-au ofilit în procent de 100%). La *Coleus* unica variantă, și anume V<sub>3</sub> - G-APi (adică soluție de glucoză 1,5 %, preparată în apă Pi) a condus la neoformarea - la nivel apical - a două noduri care prezentau tulpinița și frunzulițele cu un aspect foarte apropiat de cel normal - fiind lipsite de hiperhidrie

Deoarece partea bazală a vitroplantulelor astfel tratate și-au menținut starea de hiperhidrie, nodurile apicale, neoformate, nehiperhidrice, dezvoltate peste supernatant, au fost excizate și subcultivate pe medii de cultură proaspete MB - MS (1962), lipsite de regulatori de creștere și de apă Pi. După alte 4 săptămâni, din apexurile subcultivate au rezultat și vitroplantule normale, apte de a fi transferate în mediul septic de viață, într-un amestec de tip turbă cu perlită, în raport de 3:1, în incubatoare de 5/22/35 cm, acestea supraviețuind în procent de 88% (Petruș și colab., 2008). Reușita aclimatizării acestor vitroplantule de *Coleus* indică faptul că a avut loc o normalizare a funcțiilor celulare, a proceselor proliferative și a proceselor metabolice, cele mai ridicate procente de supraviețuire fiind înregistrate la plantulele provenite din culturile cu supernatant constând din amestec de G și APi.

Plantulele hiperhidrice de *Petunia* au fost regenerate pe medii de cultură MS - MB solidificate cu biogel, pe suport de lignoskeleton de lufă având un aspect firav, tulpinițele fiind ușor contorsionate, frunzulițele mici, translucide, răsucite, unele fiind chiar necrozate (Petruș - Vancea și colab., 2008).

După 30 de zile de la administrarea celui de al doilea strat de apă, peste mediu solid, bazal, la loturile ale căror vitroplantule hiperhidrice au fost tratate cu APi, comparativ cu lotul martor, submersat în apă distilată, la care procentul de hiperhidrie era 130%, cu 30% mai ridicat, față de situația prealabilă aplicării celui de al doilea strat, s-a observat regenerarea în medie a trei noduri pe tulpinița principală, iar fenomenul de hiperhidrie nu a mai fost pus în evidență. Aceste vitroplantule, în întregimea lor, au revenit la starea de normalitate, iar partea vegetală aeriană

neoformată după aplicarea supernatantului constând din APi, care s-a înălțat deasupra acestuia, a prezentat aspecte morfologice normale, tulpinițele și frunzulițele dobândindu-și opacitatea, hiperhidria fiind anihilată considerabil în regim de cultură „dublu strat” cu APi - lipsit de alte adaosuri – în calitate de supernatant.

Dacă la *Coleus*, apa Pi a avut efecte benefice numai în amestec cu glucoza, la *Petunia*, acest tip de apă, aplicat individual, a condus la eradicarea 100% a hiperhidriei, de menționat fiind faptul că vitroplantulele de *Coleus* se aflau într-o stare mai avansată de hiperhidrie decât cele de *Petunia*.

La 30 de zile de la transferarea *ex vitro* a plantulelor de *Petunia* sp. tratate de hiperhidrie, menținute în regim de dublu strat, sub un supernatant constând din apă Pi, procentul de supraviețuire a exvitroplantulelor a fost de 95%, în timp ce vitroplantulele de pe mediu martor, submersate parțial în apă distilată s-au ofilit, în totalitate.



**BIBLIOGRAFIE:**

1. Aittken – christie, J., Thorpe, T.A., 1985, Clonal propagation: Gymnosperms. In: Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Vol 1. Vasil, I.K. (ed.). Academic Press, New York, pp. 82-95.
2. Cachiță, C.D., Ardelean, A., 2009, Tratat de biotehnologie vegetală. Vol 2. Editura Dacia, Cluj – Napoca.
3. Cachiță, C.D., Petruș - Vancea, A., Radoveț, D., 2009, Proceduri de prevenire sau de anihilare a hiperhidriei la fitoinoculi, prin utilizarea apei sărăcite în deuteriu, Cerere de brevet de invenție Nr. A/00154/18.02.2009, OSIM București.
4. Cachiță, C.D., Deliu, C., Rakosy T.L., Ardelean, A., 2004, Tratat de biotehnologie vegetală. Vol. 1. Editura Dacia, Cluj – Napoca.
5. Gautheret, R.J., 1977, La culture des tissus et des cellules des végétaux. Résultats généraux et réalisations pratiques. Travaux dédiés à la mémoire de George Morel, Mason, Paris.
6. George, E.F., 1996, Plant Propagation by Tissue Culture. Part. 2. In Practice 2nd Ed. Cap. 13. Exegetics Limited, Edington, pp. 630-669.
7. Murashige T, Skoog F, 1962, A revised medium for rapid growth bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant.*, 15, pp. 473–497.
8. Petruș - Vancea, A., Radoveț – Salinschi, D., Cachiță, C.D., 2008, Hiperhydricity annihilation out of vitrocultures with deuterium depleted water and Pi water, using a double layer system. Proceeding of the International Symposium “New Research in Biotechnology”, USAMV Bucharest, Romania. Publicat in: *Lucrări Științifice. Serie F, Special Volume, Biotechnology*, p. 20 – 30. <http://bioteh.usab.ro/site/Noutati/proceedings.pdf> (citată cu rezumat în *Agricell Report*, vol. 53, no. 4, October 2009, p. 1-2).

## REVENDICĂRI

- Procedură de prevenire a apariției hiperhidriei la nivelul fitoinoculilor, **caracterizată prin aceea că** utilizează apa Pi, în prepararea mediul de cultură destinat creșterii culturilor *in vitro* vegetale.
- Procedură de anihilare a hiperhidriei deja instalate la nivelul fitoinoculilor, respectiv de salvare a vitroculturilor suferinde de hiperhidrie, **caracterizată prin aceea că** utilizează un sistem de culturi în dublu strat, cel bazal solidificat cu un agent solidificant, iar cel de al doilea strat, lichid, aplicat ca și supernatant, conținând în compoziția sa apă Pi sau glucoză.