



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2013 00226

(22) Data de depozit: 13.03.2013

(41) Data publicării cererii:
28.02.2014 BOPI nr. 2/2014

(71) Solicitant:
• TONY INVENT SRL,
STR. VASILE ALECSANDRI NR. 1, AP. 6,
ORADEA, BH, RO

(72) Inventatori:
• BLIDAR CRISTIAN - FELIX, BD. DACIA
NR. 10, BL. A5, AP. 32, ORADEA, BH, RO

(74) Mandatar:
INTELECT S.R.L., BD.DACIA NR.48,
BL.D10, AP.3, OP 9-CP 128, ORADEA,
JUDEȚUL BIHOR

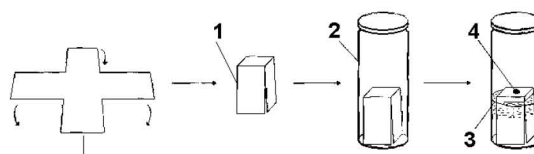
(54) PUNTE DIN HÂRTIE DE FILTRU PENTRU VITROCULTURI
VEGETALE, MICOLOGICE ȘI ALGALE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un suport pentru susținerea vitro-culturilor vegetale, micologice și algale. Suportul conform invenției este o punte (1) sub formă de prismă patrulateră regulată, fiind formată prin plierea a 4 brațe de formă dreptunghiulară la un unghi de 90° față de baza pătrată, situată în imediata vecinătate a pereților interiori ai unui recipient (2) de cultură, partea superioară a punții (1) formând o platformă pătrată, paralelă și situată la o înălțime de 2...3 mm față de suprafața unui mediu (3) de cultură lichid, aflat în recipientul (2) de cultură, în care mediul lichid formează o coloană de lichid cu înălțimea inițială suficientă pentru a hrăni un inocul (4).

Revendicări: 3

Figuri: 1



24



PUNTE DIN HÂRTIE DE FILTRU PENTRU VITROCULTURI VEGETALE, MICOLOGICE ȘI ALGALE

Pentru menținerea la suprafața mediilor lichide a inoculilor, evitând în acest fel starea de hipoxie a vitroculturilor vegetale, au început să fie utilizate cu precădere cartușe / punți de hârtie de filtru (Gautheret, 1959; White, 1963), sau suporturi din poliuretan (Deliu și colab., 1981), ori suporturi de tip lignoskeleton confecționat din burete vegetal (Cachiță și colab., 1995).

Invenția se referă la utilizarea unei punți din hârtie de filtru pentru susținerea vitroculturilor vegetale, micologice și algaie, ca metodă alternativă la folosirea mediilor de cultură agarizate, cu scopul scăderii costurilor de cercetare și producție a vitroculturilor și pentru proliferarea vitroculturilor într-un ritm mai ridicat.

Sunt cunoscute, pentru susținerea culturilor de țesuturi vegetale în mediu lichid, utilizând ca suport hârtie de filtru, două metode mai importante și practice: metoda Heller și metoda White.

Conform metodei Heller, peste un tub de sticlă vertical se pune o rondelă de hârtie de filtru și peste acesta se pune un tub cu marginea ca un gulerăș cu un diametru ușor superior celui dintâi tub de sticlă; se coboară tubul superior, imprimându-i-se o ușoară mișcare rotațională ce îndoaie în jos marginile rundelei; se retrage apoi tubul, antrenând în el vârful de hârtie de filtru; se aplică deschizătura tubului extern peste o sticlă de cultură și cu ajutorul unui tub se împinge și se coboară suportul de hârtie de filtru până la câteva centimetri peste suprafața liberă a lichidului; se retrage tubul folosit pentru împingerea suportului, și apoi se obturează cu folie de polietilenă sterilizată în prealabil; în momentul repicării, se pune un explant pe fața plană a suportului și aceasta se scufundă în soluție în așa manieră încât suprafața lui să fie cu 1-2 mm sub cea a lichidului - această operațiune se realizează la toate tuburile, apoi se sterilizează la autoclav.

Conform metodei White, în tubul de cultură se introduce o foaie de hârtie de filtru pliată ca un acordeon peste care sunt depuse unul sau mai multe explante; soluția nutritivă se găsește la fundul tubului și hârtia se impregnează prin capilaritate; tuburile nu trebuie puse vertical, ci plasate pe un suport care le menține în poziție oblică; este necesar ca hârtia de filtru să fie manipulată cu precauție, pentru a evita căderea coloniei în soluție.

Aceste metode prezintă următoarele **dezavantaje**:

- la metoda Heller: lipsa contactului dintre circumferința rondelor din hârtie și fundul tubului de sticlă, conduce la imersarea vitroplantulelor atunci când greutatea acestora apasă suficient de puternic pe suprafața punții din hârtie de filtru, provocând instalarea stării de hipoxie, respectiv posibilitatea inducerii necrozei;
- la metoda Heller: aplicarea metodei necesită numeroase proceduri manuale, ceea ce determină durata extensivă;
- la metoda Heller: rădăcina plantulei nu poate trece pe lângă rondela de hârtie, fiind imposibil să intre în contact direct cu mediul fluid, ceea ce determină creșterea numărului de subcultivări într-o perioadă de timp determinată;
- la metoda Heller: inoculul poate să rămână suspendat, fără a mai intra în contact cu mediul fluid, din cauza consumării mediului de cultură până când hârtia de filtru nu mai intră în contact direct cu mediul de cultură;
- metoda White: necesită utilizarea unui spațiu extins pe rafturile iluminate din camerele de vegetație, la un număr redus de recipiente cu vitroculturi;
- metoda White: impune utilizarea unor suporturi de susținere pentru eprubetele / tuburile cu vitroculturi, fiind inefficientă sub aspect economic din cauza costului ridicat;
- metoda White: distanța de la mediu până la inoculul cel mai îndepărtat de mediul de cultură poate provoca adsorbția unor componente din mediul de cultură, acesta ajungând la inocul în mod selectat;
- metoda White: suportul acordeonului este un corp opac care umbrește inoculul;
- metoda White: nutrirea și hidratarea sunt neuniforme, deoarece inoculul aflat mai aproape de mediul de cultură beneficiază de tot aportul de elemente nutritive din compoziția mediului de cultură comparativ cu inoculul aflat mai departe de mediu, la care nutrirea poate fi incompletă;
- metoda White: substanțele eliminate de către un inocul pot interacționa cu anumiți nutrienți organici sau minerali din puntea de hârtie de filtru, ceea ce poate provoca blocarea nedorită a nutrienților, provocând un deficit de nutriție ori chiar intoxicarea inoculilor mai îndepărtați de mediul de cultură;
- metoda White: nu există uniformitate de reactivitate a culturilor *in vitro* – astfel încât metoda nu se pretează la studii de cercetare.



Scopul invenției îl constituie facilitarea germinării în cazul vitroculturilor vegetale și a celor micologice, precum și creșterea mai rapidă a vitroculturilor vegetale, micologice ori algale pentru scurtarea timpului de menținere *in vitro* a acestora, în vederea optimizării eficienței economice a vitroculturilor.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în fabricarea unei punți de hârtie de filtru pentru susținerea vitroculturilor vegetale, micologice și algale care să nu permită imersarea inoculilor sub propria greutate, în condițiile reducerii spațiului ocupat din camerele de vegetație, scurtând perioada de timp până la care vitrocultura ajunge la dimensiune optimă pentru subcultivare ori pentru aclimatizare, cu o economie proporțională de energie; utilizarea unei punți din hârtie de filtru trebuie să reducă la maximum numărul procedurilor manuale necesare, să faciliteze contactul direct al zonei absorbante a fitoinoculului și / sau vitroculturilor cu suprafața punții, să asigure uniformitatea nutririi și hidratării culturilor *in vitro* și să uniformizeze reactivitatea acestora, sporind acuratețea cercetărilor.

Invenția înlătură dezavantajele soluțiilor cunoscute, **prin aceea că**, o punte pentru susținerea vitroculturilor vegetale, micologice și algale este confecționată din hârtie de filtru, având forma unei prisme drepte cu înălțimea și forma bazei adaptate unui recipient de cultură, astfel încât după introducerea prisme într-un recipient de cultură, toate fețele laterale ale prisme drepte se vor afla în imediata vecinătate a pereților interiori ai recipientului de cultură, iar baza superioară a prisme formează o platformă poligonală paralelă cu suprafața unui mediu de cultură lichid, platforma fiind situată la o înălțime de aproximativ 2-3 mm față de nivelul inițial al mediului de cultură din recipientul de cultură.

Exemple de realizare și aplicare a invenției:

Exemplul 1. Conform Fig.1, o punte 1 de susținere pentru un inocul vegetal este confecționată din hârtie de filtru, decupată în formă de cruce, având brațele de formă dreptunghiulară, care se pliază la unghi de 90 de grade față de baza pătrată, formând o prismă patrulateră regulată; puntea 1 se introduce într-un recipient de cultură 2 astfel încât fețele laterale ale prisme care formează puntea 1 se vor afla în imediata vecinătate a pereților interiori ai recipientului; în recipientul de cultură 2 se introduce o cantitate de mediu nutritiv lichid 3 care trebuie să formeze o coloană de lichid cu înălțimea inițială suficientă pentru a hrăni în bune condiții a unui inocul vegetal 4 și ulterior vitrocultura vegetală pornită de la nivelul acestuia, pe întreaga perioadă experimentală; baza superioară a prisme formează o platformă pătrată, paralelă cu suprafața mediului de cultură lichid, și situată la o înălțime de 2-3 mm față de nivelul acestuia.

Exemplul 2. La o punte de susținere construită în conformitate cu Exemplul 1, platforma poligonală care formează baza superioară a prisme, prezintă - în zona centrului său de greutate - un orificiu în care se introduce un minibutaș.

Exemplul 3. Se inițiază vitroculturi la *Zea mays* L. subs. *mays* hibrid "Kiskun 4255" folosindu-se în acest sens cariopse; materialul vegetal este sterilizat cu soluție de hipoclorit de sodiu 5%, timp de 10 minute, apoi se limpezește de cinci ori cu apă distilată sterilizată în prealabil și răcită la temperatura camerei; mediul de cultură utilizat este Murashige-Skoog (1962) modificat (fără aminoacizi și hormoni de creștere), fie cu agar-agar (7 g/l) – constituind varianta experimentală V₀Z (considerată control), fie lichid, caz în care inoculii sunt susținuți la suprafața mediilor de cultură cu ajutorul unor punți din hârtie de filtru construite conform cu Exemplul 1 – reprezentând varianta probă V₁Z; mediul de cultură este ajustat la pH de 5,7, urmând ca după procedurile de inoculare, recipientele inoculate să fie plasate în camera de vegetație la 23±1 °C, respectând fotoperioada de 16 ore lumină / 24 ore, intensitatea luminoasă fiind de 20 μM m⁻²s⁻¹ PAR, asigurată de lumină albă fluorescentă de tip cald; perioada experimentală este de 21 de zile; experimentul a fost repetat de trei ori; măsurarea parametrilor biometrici și gravimetrici s-a efectuat la un interval de 7 zile; s-au urmărit și comparat valorile parametrilor: lungime rădăcinițe, lungime coleoptile, lungime frunzulițe, număr frunzulițe, greutate proaspătă și uscată a materialului vegetal; pentru analiza statistică a datelor experimentale, s-a utilizat *testul T* aplicat la șiruri cu varianțe inegale și cu două extremități (two tailed), evidențiindu-se semnificația diferențelor față de martor; utilizarea punților din hârtie de filtru în inițierea de vitroculturi *Zea mays* L. subs. *mays* (porumb) s-a dovedit a fi mai eficientă comparativ cu aceea a folosirii mediilor de cultură agarizate, atât în ceea ce privește creșterea în lungime a organelor vegetative ale vitroplantelor formate, cât și sub aspectul acumulării de biomasă proaspătă și uscată; privind organele vegetative, la 21 de zile de culturi *in vitro*, sporurile de creștere ale rădăcinilor aparținând plantulelor inițiate și crescute pe punți din hârtie de filtru, comparativ cu mediile de cultură omoloage, agarizate (de tip clasic), au fost de 290%, privind lungimea frunzulițelor de 356%, iar numărul de frunze de 80,2%. Astfel, s-a dovedit experimental că utilizarea unor punți din hârtie de filtru aflate în contact cu mediile de cultură lichide, în inițierea de vitroculturi vegetale, are o eficiență superioară față de utilizarea substratului nutritiv clasic (agarizat), întrucât facilitează germinarea și ulterior creșterea mai rapidă a vitroplantulelor, conducând la o scurtare proporțională a timpului de menținere *in vitro* a acestora, fapt ce presupune o economie proporțională de energie electrică utilizată în camerele de vegetație.

În consecință, invenția este aplicabilă la nivel industrial și contribuie în mod semnificativ la dezvoltarea practică a bioeconomiei, la scăderea gradului de poluare și a efectelor nefaste pe care aceasta le aduce asupra biosferei, fiind cunoscut că o mare parte din energia electrică utilizată azi, provine din centrale electrice care utilizează combustibili fosili.

Prin aplicarea invenției se obțin următoarele **avantaje**:



- evitarea imersării inoculilor și a vitroculturilor sub propria greutate;
- reducerea spațiului din camerele de vegetație comparativ cu soluțiile de tip punte din hârtie de filtru existente până în prezent;
- aclimatizarea mai facilă a vitroplantulelor la mediul septic de viață;
- germinare mai rapidă și creștere mai rapidă a vitroculturilor comparativ cu mediile de cultură clasice (agarizate);
- reducerea perioadei de timp până la care vitroplantele ajung la dimensiune optimă pentru subcultivare ori pentru aclimatizare;
- posibilitatea inițierii de vitroculturi calusale, calusul format fiind într-o cantitate mai mare față de mediul de cultură clasic, de tip agarizat, calusul fiind predominant de tip friabil;
- păstrarea pe o perioadă de timp mai îndelungată a viabilității culturilor, procesele de senescență și chiar necroză instalându-se mult mai târziu decât în cazul mediilor de cultură agarizate;
- asigurarea unei nutriții mai eficiente a vitroculturilor, comparativ cu cea înregistrată în cazul mediilor de cultură de tip hidrogel;
- prețul de cost mai redus al substratului de cultură, în raport cu mediile agarizate;
- după scoaterea rădăcinilor din substratul nutritiv, îndepărtarea hârtiei se realizează mult mai ușor, evitând considerabil leziunile de la nivel radicular, care sunt inerente în cazul mediilor de cultură clasice, de tip agarizat;
- rădăcinile vitroplantulelor pot fi plasate în substratul de aclimatizare la mediul septic de viață, împreună cu hârtia de filtru, care nu influențează în mod negativ evoluția culturii;
- invenția poate fi aplicată – în funcție de scopul urmărit – în diferite tipuri de vitroculturi utilizând variate tipuri de fitoinoculi, precum și pentru anumite specii de culturi algale care suportă contactul direct cu aerul, sau chiar culturi micologice;
- scade consumul de energie electrică, rezultând scăderea gradului de poluare și a efectelor nocive pe care poluarea le provoacă asupra biosferei;
- simplitatea constructivă determină o fiabilitate sporită.



Revendicări

1. Punte pentru susținerea vitroculturilor vegetale, micologice și algale, confecționată din hârtie de filtru, **caracterizată prin aceea că**, are forma unei prisme drepte, cu înălțimea și forma bazei adaptate unui recipient de cultură, astfel încât după introducerea prisme într-un recipient de cultură, toate fețele laterale ale prisme drepte se vor afla în imediata vecinătate a pereților interiori ai recipientului de cultură, iar baza superioară a prisme formează o platformă poligonală paralelă cu suprafața unui mediu de cultură lichid, platforma fiind situată la o înălțime de aproximativ 2-3 mm față de nivelul inițial al mediului de cultură din recipientul de cultură.

2. Conform Fig.1, o punte (1) confecționată din hârtie de filtru pentru a susține un inocul vegetal (4), **caracterizată prin aceea că**, hârtia de filtru este decupată în formă de cruce, având brațele de formă dreptunghiulară, care se pliază la unghi de 90 de grade față de baza pătrată, formând o prismă patrulateră regulată; puntea (1) se introduce într-un recipient de cultură (2) astfel încât fețele laterale ale prisme care formează puntea (1) se vor afla în imediata vecinătate a pereților interiori ai recipientului de cultură (2); în recipientul de cultură (2) se introduce o cantitate de mediu nutritiv lichid (3) care formează o coloană de lichid cu înălțimea inițială suficientă pentru a hrăni în bune condiții un inocul vegetal (4) și ulterior vitrocultura vegetală pornită de la nivelul acestuia, pe întreaga perioadă experimentală; partea superioară a punții (1) formează o platformă pătrată, paralelă cu suprafața mediului de cultură lichid (3) și situată la o înălțime de 2-3 mm față de nivelul mediului de cultură lichid (3).

3. Punte pentru susținerea vitroculturilor vegetale având un minibutaș ca inocul, confecționată din hârtie de filtru, construită în conformitate cu **Revendicarea 1**, **caracterizată prin aceea că**, platforma poligonală care formează baza superioară a prisme, prezintă în zona centrului său de greutate - un orificiu în care se introduce un minibutaș.



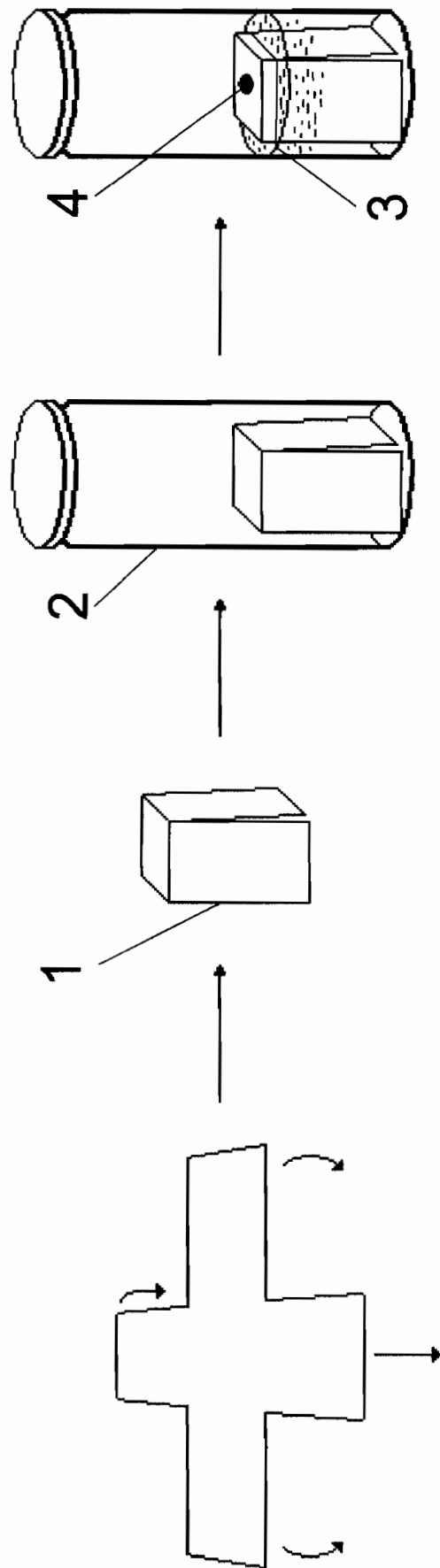



Fig. 1

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]