



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2011 00925

(22) Data de depozit: 20.09.2011

(41) Data publicării cererii:
30.05.2014 BOPI nr. 5/2014

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

(72) Inventatori:
• ARDELEAN MIRELA, NR.42A, TĂGĂDĂU,
COMUNA BELIU, AR, RO;
• CACHIȚĂ-COSMA DORINA,
ALEEA SNAGOV NR. 2, SC. 4, AP. 74,
ET. 3, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(54) O NOUĂ MODALITATE DE SOLIDIFICARE A MEDIILOR DE
CULTURĂ ASEPTICE UTILIZATE ÎN VITROCULTURĂ, PRIN
ÎNLOCUIREA AGAR-AGARULUI CU GEL DE
POLIACRILAMIDĂ ÎN AMESTEC CU TĂRÂȚE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un mediu de cultură pentru creșterea *in vitro* a unor fitoinoculi. Mediul conform invenției este constituit din 20g/l poliacrilamidă ca agent de gelificare, și 15...20g/l tărâțe de grâu, având conținut de celuloză, proteine, amidon, inozit fosfat de Ca și Mg,

mediul solid sau semisolid fiind utilizat pentru regimul de creștere lentă a fitoinoculilor.

Revendicări: 1



O nouă modalitate de solidificare a mediilor de cultură aseptice utilizate în vitrocultură prin înlocuirea agar-agarului cu gel de poliacrilamidă în amestec cu tărâțe

Rezumat

Mediile de cultură solide sau semisolide, utilizate în procedurile de vitrocultură (de exemplu a culturilor de organe, țesuturi și de celule vegetale sau de alge) au în compoziție un agent gelifiant. Potrivit invenției de față, această gelificare a fost făcută de noi cu *poliacrilamidă* în amestec cu *tărâțe*, în loc să se utilizeze *agar-agar*, polizaharid extras din algele roșii ce trăiesc în Asia și care are un preț de cost ridicat. *Tărâțele* pe lângă o „afânare”, a mediului de cultură, datorită grăuncioarelor de aleuronă aduc în substrat un supliment de inozit fosfat de Ca și Mg și de proteine (din cristaloidul acestora); totodată, *tărâțele* au aderente pe fața interioară a lor grăuncioare de amidon, care împreună cu apa, la autoclavare, generează un gel ce consolidează mediul de cultură. Aportul de *tărâțe* (mai ales de grâu), în amestec cu poliacrilamida reduce prețul de cost al mediului de cultură. Atunci când *tărâțele* depășesc concentrația de 15/20 g la litru de mediu din cauza sporirii vâscozității substratului, acesta devine optim pentru a temporiza creșterea fitoinoculilor, metodă utilă în păstrarea vitroculturilor vegetale într-un regim de *creștere lentă* procedură utilizată în *băncile de gene*.

Biotehnologia vegetală reprezintă o ramură modernă a biotehnologiilor, care se axează nu numai pe studii teoretice, ci se referă și la o multitudine de bioindustrii, printre care cea a micropropagării plantelor, ce reprezintă -de câteva decenii- calea modernă de producere a materialului de plantat.

În astfel de unități de vitroculturi de organe sau de explante vegetale, mai mult sau mai puțin automatizate (și chiar robotizate), se lucrează în regim aseptice, cu medii de cultură complexe, costisitoare, în care – în mediile solide sau semisolide- se folosește agar-agarul, un polizaharid extras din algele roșii, produs din import (mai ales din China), costisitor, ce ridică mult prețul *răsadurilor* rezultate din fluxul tehnologic.

Prezenta invenție se referă la înlocuirea agar-agarului, utilizat în rețetele de medii de vitrocultură în concentrații de 7-10 g/l, în scopul gelificării acestora, cu un amestec de

poliacrilamidă cu *tărățe*, de exemplu de grâu, adăugate în proporții variate. Gelul de poliacrilamidă este cunoscut ca înlocuitor de agar-agar, dar el nu a mai fost utilizat în amestec cu *tărățele*. De altfel, noutatea invenției noastre constă în utilizarea *tărățelor*, în primul rând, ca supliment în mediile de vitrocultură, solide sau semisolide. Ele sunt cunoscute ca având calități multiple, atât ca aport de „fibre”, celulozice, cu rol de liant (datorită țesutului ce alcătuiește pericarpul- învelișul bobului de grâu, respectiv *tărăță*, care este fructul gramineelor), cât și pentru faptul că aceasta posedă un țesut special denumit stratul cu aleuronă, care conține grăuncioare de aleuronă, un complex constituit din inozit fosfat de Ca și Mg, plus un *cristaloid* care este de natură proteică. Acest complex este cunoscut ca fiind benefic pentru nutriția animalelor, și chiar a omului, fapt care ne-a determinat să introducem *tărățele* în mediul de cultură al fitoinoculilor, ele aducând un plus de valoare substratului conceput pentru asigurarea nutriției vitroculturilor de țesuturi și celulele vegetale. Pe lângă cele arătate, *tărățele* - având aderente de ele grăuncioare de amidon (popular *făină*)- în urma autoclavării mediului, în momentul sterilizării lui, acestea acționează ca un liant, amidonul - fiert fiind cu apă- după răcire, dă naștere la o pastă numită popular *pap* care în cazul de față, ajută la consolidarea compoziției mediului, ca înlocuitor de agar. Cu cât conținutul în amidon (chiar și în *tărățe*) este mai mare în mediu, cu atât substratul respectiv devine mai vâscos și fitoinoculii cresc, dar li se imprimă un regim de *creștere lentă*.

Substratul solidificat cu *tărățe* poate fi combinat și cu agar-agar, ca supliment nutritiv ce poate fi utilizat în vitroculturile de explante vegetale, cel ce este mai *vârtos*, cu mai multe *tărățe* poate fi folosit mai ales la subcultivarea țesuturilor în *băncile de gene* prelungindu-se astfel intervalul lor de subkultură.

În cele ce urmează prezentăm exemple de realizare a invenției.

Pentru vitrocultivarea de explante vegetale am prelevat apexuri caulinare de *Sedum telephium* ssp. *maximum* de la vitroplantulele crescute pe mediu de bază Murashige- Skoog (1962) (MS), lipsit de regulatori de creștere, care a constat din macroelemente și Fe EDTA, microelemente Heller, amestec mineral la care au fost adăugate vitaminele: piridoxină HCl, tiamină HCl și acid nicotinic (câte 1 ml/l fiecare), m – inozitol 100 mg/l, zaharoză 30 g/l și agar-agar 7 g/; pH-ul fiind reglat la valoarea de 5,8, prealabil aseptizării acestuia prin autoclavare. În cadrul cercetărilor noastre, acest tip de mediu a fost considerat ca fiind varianta experimentală martor (V_0); tot pe un astfel de mediu de cultură Murashige-Skoog (MS), lipsit de regulatori de creștere am înlocuit agar-agarul cu granule fine de *poliacrilamidă*

și *tărățe*, în proporție de 20 g *poliacrilamidă* și 15 g de *tărățe* la 1 l mediu de cultură (varianta V₁).

La 7, 14 și la 30 de zile de la inocularea fitoinoculilor (aceștia fiind cultivați în recipiente amplasate în camera de creștere în regim de 16 ore lumină/ 24 ore și o intensitate luminoasă de 1200 lucși, la o temperatură de 24 °C), s-au făcut biometrizări privind: *lungimea medie a întregii plantule*, *numărul mediu de frunzulițe*, *lățimea medie a celei mai mari frunzulițe*, *numărul mediu de ramificații ale tulpiniței*, *lungimea medie a ramificației*, *numărul mediu de rădăcinițe*, *lungimea medie a rădăciniței embrionare* (Fig. 1 A-G).

Datele medii obținute la varianta V₁ cu substitut de agar, au fost raportate la valorile parametrilor similari determinați la explantele de tip apex inoculate și vitrocultivate pe mediu V₀ solidificat cu agar-agar, lotu martor, valori considerate de referință, respectiv ca 100% (Fig.1, pozițiile A-G).

Cu excepția creșterii în lățime a frunzulițelor vitroplantulelor de *Sedum telephium* ssp. *maximum*, regenerate din explantele de tip apex caular, toți parametri urmăriți au depășit cu mult valorile înregistrate la parametri similari biometrizați la lotul martor, respectiv mediu de bază identic cu cel de la variante cu creșterea și organogeneza mult stimulată, cu diferența că la lotul martor (100%), notat cu V₀, solidificarea acestuia s-a făcut cu agar-agar și nu cu poliacrilamidă în amestec cu *tărățe*, în raport de 20/15 g/l.

Revendicare

Mediile de vitrocultură optime pentru creșterea *in vitro* a diferitelor tipuri de explante sau de fitoinoculi sunt complexe, conținând compuși anorganici și organici, la care -potrivit invenției noastre- în mediu am substituit agar-agarul, ca agent gelificant, cu poliacrilamidă în amestec cu *tărâțe*, de exemplu de grâu, ceea ce datorită compoziției acestora (multă celuloză, inozit de fosfat Ca și Mg, proteine și grăuncioare de amidon) asigură o îmbunătățire a calității mediului, aportul de amidon servind și la o creștere a vâscozității substratului realizat după autoclavarea mediului.

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.

Autoarele,

Asist.cerc.drd. Ardelean Mirela

Prof.univ.dr. Cachiță Dorina

Revendicare

Mediile de vitrocultură optime pentru creșterea *in vitro* a diferitelor tipuri de explante sau de fitoinoculi sunt complexe, conținând compuși anorganici și organici, la care -potrivit invenției noastre- în mediu am substituit agar-agarul, ca agent gelificant, cu poliacrilamidă în amestec cu *tărâțe*, de exemplu de grâu, ceea ce datorită compoziției acestora (multă celuloză, inozit de fosfat Ca și Mg, proteine și grăunțioare de amidon) asigură o îmbunătățire a calității mediului, aportul de amidon servind și la o creștere a vâscozității substratului realizat după autoclavarea mediului.

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.

Autoarele,

Asist.cerc.drd. Ardelean Mirela

Prof.univ.dr. Cachiță Dorina

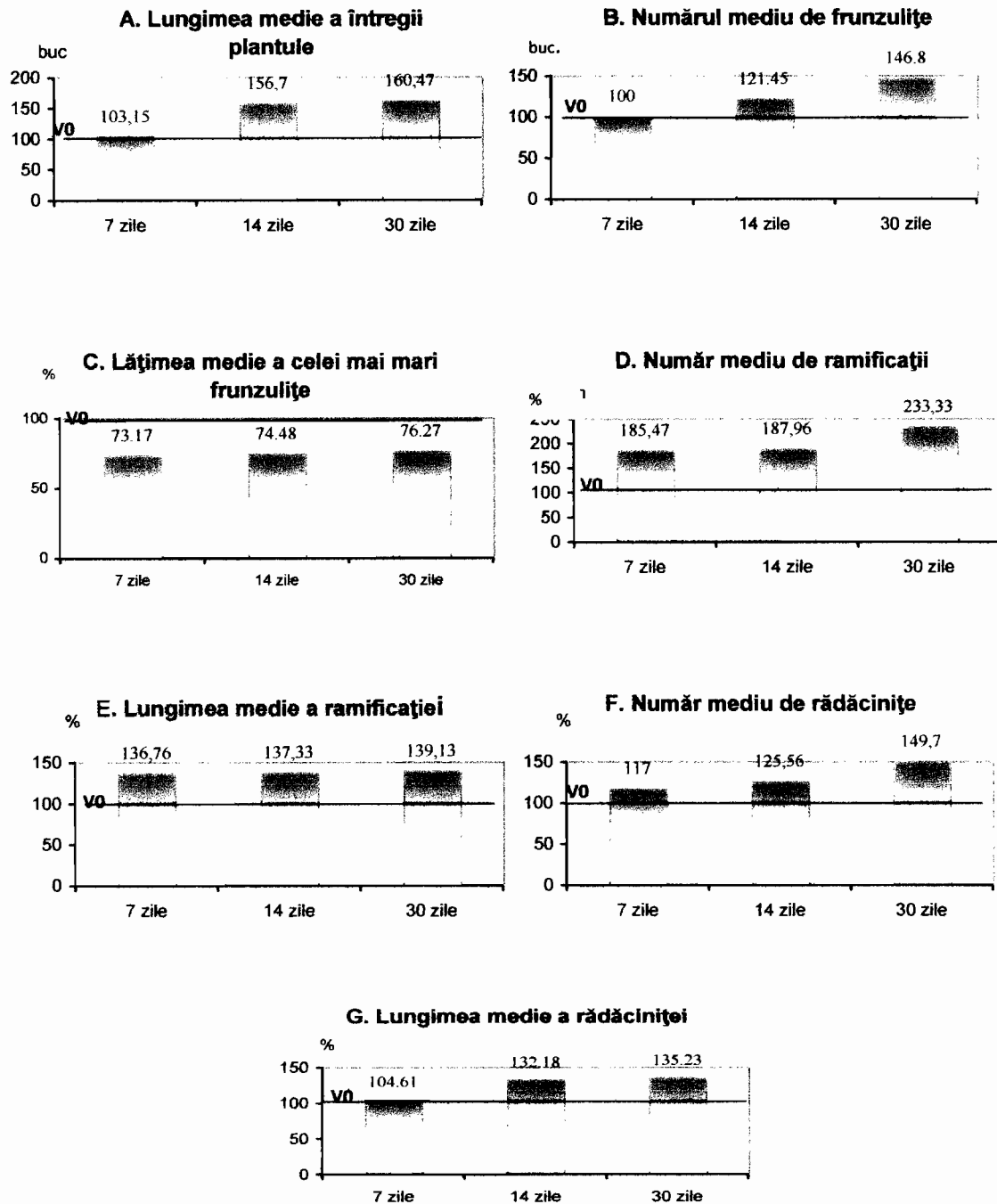


Fig. 1- Prezentarea grafică a valorilor medii corespunzătoare parametrilor biometrizați la nivelul vitroculturilor *Sedum telephium* ssp. *maximum*, la 7, 14 și 30 de zile, de la inocularea de apexuri caulinare pe variantele de mediu de cultură: V₀ - (lot control) mediu gelificat cu agar-agar, lipsit de regulatori de creștere; V₁ - mediu similar celui de la varianta precedentă, dar lipsit de agar-agar și gelificat cu 20 g/l poliacrilamidă și 15 g/l tărâțe; datele biometrice sunt exprimate în valori procentuale (unde: A-lungimea medie a întregii plantule; B-număr mediu de frunzulițe; C-lățimea medie a celei mai mari frunzulițe; D-număr mediu de ramificații; E-lungimea medie a ramificației; F-numărul de rădăcinițe; G-lungimea medie a rădăciniței), 100% fiind valori considerate de referință, înregistrate la măsurătorile biometrice făcute la vitroculturile de la varianta martor V₀.