



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2013 00093

(22) Data de depozit: 25.01.2013

(41) Data publicării cererii:
27.02.2015 BOPI nr. 2/2015

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

(72) Inventatori:
• RADOVEȚ DORINA, STR. TRANSILVANIEI
NR. 33, BL. B 58, ET. 4, AP. 25, ORADEA, BH,
RO;

• CACHIȚĂ DORINA, ALEEA SNAGOV
NR. 2, AP. 72, SC. 4, ET. 3, CLUJ NAPOCA,
CJ, RO;
• TURCUȘ VIOLETA, STR. TÂRGULUI
NR. 5-7, BL. 15, SC. A, ET. 3, AP. 16, ARAD,
AR, RO;
• PETRUȘ ADRIANA, STR. ROȘIORILOR
NR. 19, BL. PB 18, ET. 4, AP. 19, ORADEA,
BH, RO

(54) **PROCEDEU DE SUSȚINERE A FITOINOCULILOR ÎN MEDIUL
DE CULTURĂ LICHID**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de stimulare a creșterii unor fitoinoculi. Procedeu conform invenției constă în înlocuirea agentului gelifiant din medii de cultură *in vitro* cu un suport superabsorbant, alcătuit din microfibre sintetice de poliester, pentru incubarea și crește-

rea fitoinoculilor în camere de creștere a culturilor la temperaturi de maximum 25°C.

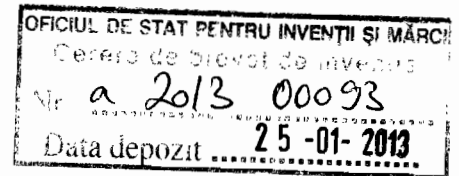
Revendicări: 2



24

PROCEDEU DE SUSȚINERE A FITOINOCULILOR ÎN MEDIUL DE CULTURĂ LICHID

DESCRIERE



Domeniul tehnic

Invenția se referă la o procedură de înlocuire a agar-agarului din mediul de vitrocultură la plante, cu un *suport superabsorbat*, cu scopul optimizării microprogării (fie că este vorba de vitroconservare, fie de stimulare a creșterii biomasei vegetale), cu costuri mici de producție.

Stadiul tehnicii

Utilizarea unor agenți gelificanți este necesară pentru solidificarea mediilor de cultură aseptice, destinate creșterii *in vitro* a variatelor tipuri de inoculi, susținerea fiind indispensabilă pentru anumite categorii de cormofitoinoculi, regimul de submersie –în unele cazuri - cauzând nenumărate implicații fiziologice negative, în ceea ce privește aprovizionarea țesuturilor cu oxigen. În industria de micropropagare și nu numai, agar – agarul se constituie într-un produs principal utilizat în solidificare mediului de cultură. Adeseori, evoluția vitroculturilor, morfogeneza, creșterea și diferențierea, depind de calitatea agar-agarului, acest ingredient influențând nu numai dezvoltarea fitoinoculilor, ci și prețul de producție, respectiv de desfacere a materialului de plantat generat *in vitro*.

De-alungul anilor, la nivel mondial, cercetătorii au raportat numeroase încercări, mai mult sau mai puțin reușite, de a înlocui acest ingredient din compoziția mediilor de cultură *in vitro* la plante, nu numai din cauza faptului că presupune costuri ridicate de achiziție sau pentru a obține temporizare creșterii inoculilor, dar existe suficiente studii care atestă faptul că, metoda de solidificare a mediului de cultură prin *agarizare* se poate constitui într-o cauza principală a apariției *hiperhidriei* (Boxus și Pâques, 1987; Cachiță, 1987; Cachiță și colab., 2008; Constantinovici și Cachiță, 1999 a și b; Franck și colab., 1997; Leonhardt și Kandeler, 1987; Nairn și colab., 1995; Petruș – Vancea și colab., 2004; Petruș – Vancea și colab., 2008; Petruș – Vancea, 2011; Radoveț și Cachiță, 2005; Zimmerman și Swartz, 1994), un proces neoplazic specific vitroculturilor vegetale, unul dintre cele mai dăunătoare fenomene care se poate manifesta în industriile de micropropagare, conducând și la înregistrarea de pagube uriașe în rândul producătorilor de material de plantat rezultat în înmulțire vegetativă practică prin această cale.

Dintre încercările de înlocuirea *agarului* cu diferite substraturi artificiale, cu scopul prevenirii apariției hiperhidriei, amintim utilizarea de: cuburi din *spumă de plastic* (Hussey,

1980), tampoane din *fibre de polietilenă* (Brochard, 1987), cuburi de *vată hidrofیلă* sau *materiale textile* (Zatyko și Molnar, 1987), *turbă* (Zimmerman și colab., 1987; Nas și Read, 2003), *filtre de țigară* (Brochard, 1991), *gelrite* (Taji și Williams, 1991, 1996), *lignoskeleton de lufa* (Cachiță și colab., 2003), *biogel* în suport de *lignoskeleton de lufa* (Petruș – Vancea și colab., 2004), *amidon* sau *pectină*, sau *agar hidrolizat* (după Cachiță și colab., 2009). De asemenea, s-a încercat creșterea concentrației de *agent gelifiant*, scăderea *temperaturii* ambientale și adăosul în mediul de cultură a unor concentrații sporite de *BA* (Taji, 1994).

Înlocuirea agarului din mediul de vitrocultură cu diferiți compuși comerciali, de exemplu cu „Sorbarods” sau „Florialite”, a condus la creșterea ratei de supraviețuire postacimatizare a exvitroplantulelor de *Trochetiosis ebenus*, o specie de arbori pe cale de dispariție în Insula St. Elena și a cărei micropropagare crea mari dificultăți de înrădăcinare pe mediu de cultură preparat cu agar (Sarasan, 2003).

Majoritatea procedeele de înlocuire a agar-agarului au avut ca scop stimularea creșterii inoculilor, ceea ce este remarcabil pentru micropropagare, dacă obiectivele sunt de această natură. Astfel, produsul numit *sago* (amidonul comestibil prelucrat gelatinizat) a fost cu succes utilizat de către Naik și Sarkar (2001) ca agent de gelificare în mediul de cultură, conducând la o creștere optimă a 10 genotipuri de cartof (*Solanum tuberosum* L.). Arregui și colaboratorii (2003) au înlocuit agar-agarul cu produsul *Phytigel*, care induce mult mai rapid microtuberizarea și stimulează formarea la nivelul vitroplantulelor de cartof a unui număr mult mai mare de minituberculi, comparativ cu lotul martor, cultivat pe mediu solidificat cu agar-agar. Cachiță și colaboratorii săi (1997) au utilizat suport vegetal de *lignoskeleton* (brevet de invenție românesc Nr. 110018 B1) sau diverse *fibre sintetice de poliamidă*. Duong Tan Nhut și colaboratorii (2006) au realizat un sistem hidroponic *in vitro*, în scopul producerii minituberculilor de cartof - de pe sistemul hidroponic triplustrat, alcătuit din *fibre de bumbac* fiind recoltați minituberculi cu dimensiuni mult mai mari, față de sistemul triplu strat din hârtie de filtru. Mohamed și colaboratorii (2010) au experimentat producerea de vitroplantule de cartof de calitate superioară pe mediu de cultură gelificat cu 0,1 sau 2 g/l agar în amestec cu 40, 50 sau 60 g/l *amidon* de porumb sau cartof.

Un procedeu constând în înlocuirea agar-agarului din mediul de cultură destinat culturilor *in vitro* vegetale, cu un agent gelifiant de tip *metilvinileter*, cu scopul temporizării creșterii fitoinoculilor a fost descris de noi și face obiectul unei alte cereri de brevetare, înregistrate la OSIM București.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este înlocuirea agar-agarului din compoziția mediului de vitrocultură, cu un suport superabsorbant, practic pentru inoculii care

nu tolerează regimul de submersare în mediul de cultură lichid. Suportul este confecționat din material inovator realizat din microfibre sintetice de poliester, orientate în straturi, unite între ele mecanic (conferindu-i capacitatea de înglobare a moleculelor de apă), care este un suport excelent pentru fitoinoculi în perioada de vitroconservare, în condiții de temperatură scăzută sau poate induce o creștere normală a inoculilor, în regim normal de micropropagare. Produsul este achiziționat din comerț și este utilizat în practica îngrijirii plantelor de ghiveci, cărora le asigură protecția și dezvoltarea prin reținerea apei, pe care o eliberează, ulterior, treptat, în sol, favorizând o irigare optimă (menținând umezeala), reduce consumul de apă zilnic, reduce drastic prezența buruienilor, optimizează temperatura rădăcinilor, evitând șocurile termice. Produsul se comercializează în discuri cu diametrul cuprins între 15 și 30 cm, din care se pot confecționa, ușor, rondele de dimensiunea dorită. Discul comercializat prezintă o față colorată în culoarea verde (aceasta nu-și modifică culoarea la sterilizarea prin autoclavare), cealaltă față este albă și are capacitatea de a absorbi mediul de cultură lichid, gonflându-se și dublându-și volumul. Indiferent de modalitatea de introducere a rondelii de suport superabsorbant în recipientul de cultură (cu suprafața albă în sus sau în jos) au fost obținute aceleași rezultate favorabile scopului de micropropagare, la toate speciile vegetale testate.

În raport cu stadiul tehnicii, invenția prezintă următoarele avantaje:

- substratul s-a dovedit a fi util, fie în vitroconservare, în cazul micropropagării la temperatura de 3-4 °C, în condiții de întuneric, în camere frigorifice (la cartof), fie la temperaturi de 23-25°C și intensitate luminoasă de 1700 lucsi, cu fotoperioadă de 16/24 lumină, în camera de creștere (la sparanghel și roua cerului), prin oferirea unui suport pentru susținerea inoculilor și accesibilitatea acestora la componentele mediului de cultură lichid;
- suportul superabsorbant nu efectează capacitatea regenerativă și nu are efecte remanente de încetinire a creșterii la trecerea fitoinoculilor din condiții de vitroconservare, în condițiile de iluminare și temperatură specifice ale unei camere de creștere;
- costuri mai reduse de vitrocultură și cu eficiență bună în producerea rezultatului scontat, și anume oferirea unui suport adecvat pentru fitoinoculi, ca înlocuitor al agentului gelifiant; suportul fiind ferm pentru susținerea materialului vegetal, împiedicând scufundarea acestuia în mediul de cultură;

- produsul testat de noi și care face obiectul prezentei cereri de brevetare prezintă aplicabilitate facilă, atât din punct de vedere al prezentării lui, cât și al realizării procedurii, fiind ușor manevrabil; se achiziționează din comerț;
- produsul testat nu produce modificarea compoziției chimice a mediului de cultură sau schimbări de pH, fiind inert din punct de vedere chimic.

Asigurarea unui suport nou, adecvat pentru inocularea explantului, ieftin și la îndemână, precum și eficiența lui prin accesibilitatea mai ridicată a fitoinocului la elementele nutritive din mediul de cultură lichid, fără afectarea vitalității acestora și a capacității regenerative în subkultură a fost demonstrat de noi în urma cercetărilor executate pe variate modele experimentale și la trei specii vegetale (ierboase, de interes alimentar sau ecologic), respectiv cartof (două varietăți), sparanghel și roua cerului.

Utilizarea produsului care face obiectul prezentei cereri de brevetare, denumit de noi *suport superbabsorbant*, s-a efectuat cu scopul identificării unui nou component de înlocuire a agar-agarului din mediul de cultură, fie în sistem de creștere lentă (la temperatură scăzută), fie în condițiile specifice unei camere de creștere. Nu am identificat în literatura de specialitate date referitoare la folosirea acestui tip de suport în vitrocultură.

Se dau în continuare câteva exemple de realizare a invenției, respectiv a procedurii de înlocuire a agar-agarului cu suport superabsorbat, fie în regim de *temperatură scăzută* (procedura conducând la temporizarea creșterii fitoinoculilor, la cartof), fie la *temperaturi ridicate*, de 23-25°C (conducând la stimularea creșterii biomasei, la sparanghel și roua cerului).

În cazul experimentelor proprii, de utilizare a produsului pentru cultivare plantelor în condiții *in vitro*, am procedat la următoarele *manevre* comune celor trei specii:

- Mediul de cultură Murashige – Skoog (MS) (1962), lichid, modificat de noi astfel: lipsit de regulatori de creștere și de glicină, cu adaos de vitamine (tiamină HCl, piridoxină HCl și acid nicotinic, câte 1 mg/l), cu mezo-inozitol 100 mg/l, zaharoză 30 g/l), iar în loc de 7 g/l Difco Bacto Agar – cum indică rețeta originală, am utilizat suportul superabsorbat, câte o rondelă cu diametrul de 2 cm/recipient de cultură, peste care a fost repartizat câte 5 ml.
- Sterilizarea mediului de cultură, împreună cu rondela s-a efectuat prin autoclavare la 121 °C. Nu s-au constatat modificări ale pH-ului mediului de cultură, a culorii acestuia sau a consistenței; după sterilizarea recipientelor s-a constatat faptul că o parte din mediul de cultură a fost absorbit în rondelă, rezultând o platformă poroasă, care a

asigurat un suport ferm, excelent pentru inocularea explantelor, fără ca acestea să se scufunde în mediul de cultură lichid.

- În vederea testării reacției diferitelor tipuri de fitoinoculi, pe astfel de medii de cultură au fost inoculate trei specii vegetale, pentru a releva generalitatea metodei, și anume: minituberculi de cartof (*Solanum tuberosum* var. *Gălănești* -14369 și *Solanum tuberosum* var. *Gersa* - 14381) – două varietăți valoroase din punct de vedere ecosanogen, datorită conținutului ridicat de antociani (au fost utilizați minituberculi pentru că se pretează la stocarea la temperatură scăzută, în vederea vitroconservării), precum și propaguli de sparanghel (*Asparagus officinalis* L.), specie de interes agricol și propaguli de roua cerului (*Drosera rotundifolia*), specie din flora spontană, toți fitoinoculii necesitând, în mod obișnuit, mediu de cultură agarizat.
- După inoculare recipientele cu minituberculi de cartof au fost introduse în camera frigorifică, la temperatura de 3-4 °C, în condiții de întuneric, în vederea vitroconservării acestora în condiții aseptice, totodată urmărind evitarea încolțirii acestora, iar recipientele cu sparanghel și roua cerului au fost amplasate 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. Pentru incubare și creștere, culturile au fost menținute în aceste condiții timp de 24 de săptămâni (6 luni).
- Pentru toate experimentele, lotul martor a fost cultivat pe mediu de cultură MS agarizat, lipsit de regulatori de creștere, iar condițiile de vitrocultură au fost identice cu acelea în care au fost menținute loturile testate.
- La fiecare 4 săptămâni au fost efectuate măsurători biometrice care să reflecte creșterea și dezvoltarea fiecărui lot experimental de plantule.
- La 6 luni de vitrocultură a fost testată capacitatea de regenerare a fitoinoculilor de cartof prin transferarea lor în camera de creștere, iar la sparanghel și roua cerului am procedat la subcultivarea lor pe mediul MS clasic, agarizat, lipsit de regulatori de creștere, pentru a evidenția capacitatea nativă de creștere, fără stimulare forțată a acestora.

Rezultate înregistrate la fitoinoculii de cartof violet (*Solanum tuberosum* var. *Gălănești* -14369):

La 6 luni de vitroconservare la temperatura scăzută de 3-4 °C, în condiții de întuneric, lotul amplasat pe *substrat superabsorbat* nu a prezentat mugurași, nici schimbare a culorii sau vreun semn de necroză, comparativ cu lotul martor – minituberculul inoculat pe mediul de

cultură agarizat – la nivelul căroră, începând cu luna a 5-a am semnalat procese morfogenetice de formare de mugurași, iar în luna a 6-a de vitroconservare s-a remarcat regenerarea unui număr mediu de $1,27 \pm 0,14$ tulpinițe/minitubercul cu lungimea medie de $5,4 \pm 0,003$ cm.

După cele 6 luni de vitroconservare, minibutașii inoculați pe mediu de cultură lichid, în care a fost introdus suportul superabsorbant, au fost transferați 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, pentru a testa capacitatea regenerativă. După primele 2 săptămâni de la transferarea culturilor în camera de creștere s-a observat formarea de mugurași, la nivelul ochiurilor minituberculilor, iar la 4 săptămâni de la transfer, aceștia prezentau un număr mediu de $0,9 \pm 0,37$ tulpinițe/minitubercul, având lungimea medie de $1,8 \pm 0,001$ cm, ceea ce demonstrează faptul că minituberculii menținuți la rece, pe suport superabsorbant și-au păstrat capacitatea regenerativă de-a lungul perioadei de vitroconservare, datorită faptului că acest suport a înglobat parțial mediul de cultură lichid – acesta fiindu-i disponibil inoculului la nivelul de contact a minituberculului cu suportul.

Rezultate înregistrate la fitoinoculii de cartof albastru (*Solanum tuberosum* var. Gersa - 14381):

Timp de 6 luni și minituberculii acestei varietăți de cartof, la fel ca și cei descriși anterior, inoculați fiind în mediu de cultură lichid, pe suport superabsorbant, și-au păstrat aspectul din momentul inoculării, nu au prezentat mugurași sau fenomenul de necroză, în timp ce la lotul martor – amplasat pe mediu de cultură agarizat – după primele 5 luni de la inițierea experimentului, minituberculii au prezentat mugurași, iar la 6 luni de la startarea experimentului, ei au prezentat un număr mediu de $1,77 \pm 0,18$ lăstari/minitubercul, cu lungimea medie de $3,04 \pm 0,01$ cm.

La 6 luni de vitroconservare a fost testată viabilitatea fitoinoculilor, prin transferarea lor în camera de creștere, în condițiile descrise anterior. După primele 3 săptămâni de la transfer a fost remarcată regenerarea de numeroși mugurași la nivelul minituberculilor, iar la 5 săptămâni s-au biometrizat un număr mediu de $0,82 \pm 0,25$ lăstari/ minitubercul, aceștia având lungimea medie de $1,81 \pm 0,003$ cm.

Rezultate înregistrate la fitoinoculii de roua cerului (*Drosera rotundifolia*) – plantă carnivoră, întâlnită în flora spontană din România):

La 6 luni de vitrocultivare, la lotul martor (amplasat pe mediu de cultură agarizat) au fost biometrizate, în medie $36,04 \pm 0,14$ rozete/recipient, acestea având diametrul cuprins între 0,50 – 2,2 cm, în timp ce la lotul cultivat în mediu de cultură lichid, pe suport superabsorbant

s-a remarcat un număr mediu de $68 \pm 0,09$ rozete/recipient (o medie de 1,89 de ori mai mare decât la lotul martor), având diametrul de 0,50 – 2,2 cm, la ambele variante, rozetele aveau culoarea verde intens – dovadă a vitalității lor. La nivelul lotului martor, după 6 luni de vitrocultivare s-a constatat un număr de 6 tije florale, în timp ce la inoculii cultivați pe suport superabsorbant au format în medie câte 8 tije florale – dovadă a influenței pozitive a metodei de micropropagare, asupra creșterii inoculilor de *Drosera*.

Rezultate înregistrate la fitoinoculii de sparanghel (*Asparagus officinalis*) – plantă de interes alimentar:

La 6 luni de micropropagare inoculii lotului martor (cultivați pe mediu agarizat) au prezentat calus verde-măsliniu și în medie câte $12,04 \pm 0,33$ lăstari de culoare verde intens, cu lungimea cuprinsă între 1-5,5 cm, având o greutate proaspătă medie a inoculului de 1,9531 g, în timp ce inoculii cultivați în mediul de cultură lichid, amplasați fiind pe suport superabsorbant, au prezentat în medie câte $15,86 \pm 0,12$ lăstari/inocul, având o lungime cuprinsă între 1-5,5 cm, având o greutate proaspătă medie a inoculului de 2,4815 g.

Procedura de temporizare a creșterii – sau de micropropagare în sistem de creștere lentă la temperatură scăzută – poate fi deosebit de utilă tuturor băncilor de gene sau centrelor de cercetare care urmăresc păstrarea germoplasmei în vitrocultură, prin prelungirea subculturilor, reducându-se astfel costurile micropropagării; totodată este imperativ necesar ca în momentul în care este nevoie ca acel material vegetal să fie rapid multiplicat, să nu existe efecte remanente de inhibare a creșterii în subkultură, ambele cerințe fiind asigurate de suportul superabsorbat testat de noi.

Eficientizarea micropropagării prin utilizarea produsului superabsorbant, care asigură un suport de susținere a fitoinoculilor în mediul de cultură lichid, înlocuind tradiționalul agar-agar, este o tehnică nouă, care poate fi utilizată de producătorii din domeniu.

Concluzie: Suportul superabsorbat poate fi utilizat ca înlocuitor al agar-agarului, în mediile de vitrocultură, fie în condiții de creștere lentă, la temperaturi scăzute, în camere frigorifice (exemplu la cartof), cu păstrarea capacității regenerative a fitoinoculilor, fie în condiții normale de temperatură, în camera de creștere și incubare a culturilor *in vitro*, conducând la stimularea creșterii biomasei vegetale (exemplu la sparanghel și roua cerului).

BIBLIOGRAFIE:

1. Arregui, L.M., Veramendi, J, Mingo-Castel, A.M., 2003, Effect of gelling agents on in vitro tuberization of six potato cultivars. American Journal of Potato Research, 97, pp. 325-343.

REVENDICĂRI

- Procedură de înlocuire a agentului gelifiant din mediile de cultură *in vitro* la plante, cu un suport superabsorbat, alcătuit din microfibre sintetice de poliester, **caracterizată prin aceea că** se pretează la utilizarea în vitroconservare, prin incubarea și creșterea fitoinoculilor pe astfel de medii, în camere frigorifice, la temperaturi scăzute.
- Procedură de înlocuire a agentului gelifiant din mediile de cultură *in vitro* la plante, cu un suport superabsorbat, alcătuit din microfibre sintetice de poliester, **caracterizată prin aceea că** se pretează la incubarea și creșterea fitoinoculilor pe astfel de medii, în camere de creștere a culturilor, la temperaturi de până la 25 grade Celsius.