



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2013 00094

(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) METODĂ DE ÎNLOCUIRE A MACROELEMENTELOR DIN  
MEDIUL DE CULTURĂ *IN VITRO* LA PLANTE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de micropropagare a unor fitoinoculi. Procedeu conform invenției constă în înlocuirea macroelementelor din compoziția mediului de cultură uzual cu un amestec sub formă de comprimat

conținând azot total, azot amoniacal, anhidridă fosforică și oxid de potasiu.

Revendicări: 1

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



## METODĂ DE ÎNLOCUIRE A MACROELEMENTELOR DIN MEDIUL DE CULTURĂ *IN VITRO* LA PLANTE

### DESCRIERE

**Domeniul tehnic.** Invenția se referă la o procedură de înlocuire a macroelementelor din mediul de cultură *in vitro* la plante, cu comprimate nutritive M, cu scopul diminuării costurilor de producție.

**Stadiul tehnicii.** La nivel mondial, în industria de micropropagare există un deosebit interes în direcția identificării de noi tehnici de cultură care să permită îmbunătățirea calității și uneori a cantității de biomasă vegetală, cu diminuarea prețului de producție. Un obiectiv urmărit de cercetători este și acela de menținere în vitrocultură a biomasei vegetale, pe o perioadă mai lungă de timp, cu costuri cât mai mici, de identificare a unor metode de temporizare a creșterii, implicit de prelungire a intervalelor de subkultură, pentru realizarea așa numitelor *living collections* (Cachiță și colab, 2004 și 2009).

În cazul în care se dorește păstrarea vitroculturilor pe o durată cât mai lungă de timp, cu mărirea intervalelor de subkultură, a resurselor genetice recalcitrante la înmulțirea vegetativă a speciei respective, a produselor biotehnologice, cum ar fi de genotipuri de elită, a unor plante rare și specii aflate pe cale de dispariție, se pot practica modificări în regimul ecofizilogic de creștere a fitoinoculilor, folosind diferite metode de reducere a intensității proceselor vitale, fie prin hipoxie (diminuând aportul de oxigen în incintele de creștere) (Radoveț și Cachiță, 2012), fie prin coborârea presiunii atmosferice, ori prin creșterea presiunii osmotice a substratului de cultură, deshidratând menajat celulele materialului vegetal vitrocultivat, fie prin menținerea culturilor la temperaturi joase, de 4 - 7 °C, în condiții de iluminare scăzută, fie chiar prin păstrarea acestora în azot lichid, la - 196 °C (criostocare).

Pe termen mediu, se realizează și o conservare *in vitro*, prin diferite metode de temporizare a creșterii în vitrocultură, ceea ce conduce la creșterea intervalelor între subculturi, dar, conservarea pe termen lung, se realizează prin crioprezervare în azot lichid la -196 °C (Bajaj, 1990; Halmagyi și colab., 2003; Baciș și colab., 2007; Cachiță și Sand, 2011).

Există numeroase metode de stocare *in vitro* a germoplasmei constând din vitroplantule, minibutași, propaguli, muguri axilari, bulbi florali, calusuri, suspensii celulare, embrioni somatice, a diferitelor specii vegetale având ca obiectiv reducerea costului de producție (Williams, 1993).

Un rol deosebit în tehnicile de vitroculturi vegetale îl au *mediile de cultură* (Skoog și Miller, 1957). Adeseori, recomandările privitoare la compoziția mediilor de cultură variază de

la un autor la altul, în limite relativ restrânse. Există diferite rețete de medii de cultură, unele având un conținut ridicat de săruri, așa cum este mediul Murashige – Skoog (1962); alte rețete prevăd o concentrație moderată de compuși anorganici, precum mediul Nitsch – Nistch (1969), sau cu mai puține săruri - mediul White (1963); dar, toate rețetele de medii dețin componentele esențiale, organice și anorganice de care au dispus celulele explantului atât timp cât s-a aflat în planta donoare intactă (Cachiță, 1987). Alături de componenta minerală, mediile de cultură trebuie să conțină și compuși organici, dintre care vitaminele, facultativ aminoacizi, hidrați de carbon (cu excepția culturilor fotoautotrofe, care se cultivă pe medii lipsite de o sursă de carbon, precum zaharoza, glucoza, fructoza), agar - agar (când se dorește solidificarea mediului) și, adeseori, regulatori de creștere.

Mediul de cultură Murashige-Skoog (1962) conține, în principal toți ioni minerali esențiali dezvoltării cormofito inoculilor, concentrația ionică totală a mediului fiind cea mai ridicată, dintre toate mediile de cultură utilizate și anume de 93,3 mM.

Indiferent sub ce formă chimică se adaugă elementele în mediu, ele trebuie să fie hidrosolubile, apa fiind compusul de bază al acestora, să dețină un echilibru între cationi ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{NH}_2^+$ ) și anioni ( $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ). Trebuie cunoscut că unele substanțe chimice pot imobiliza chimic unii ioni sau pot provoca precipitarea unor săruri. Unele elemente, pentru, a fi mai ușor asimilate, se administrează sub formă de chelați (FeEDTA) (Cachiță și colab., 2004). Prezența sulfatilor și a clorurilor sub formă de săruri de Ca, K, Mg etc., determină extragerea din mediu a acestor substanțe și ca atare în mediu, se pot acumula, excedentar, ioni de  $\text{Cl}^-$ , și  $\text{SO}_4^{2-}$ , care vor acidifia mediul.

În unele cazuri, modificarea concentrațiilor soluțiilor minerale din compoziția mediilor de cultură conduce la optimizarea micropropagării, prin stimularea proceselor de organogeneză (rizogeneză sau caulogeneză). Utilizarea unor concentrații de  $\frac{1}{2}$  sau chiar  $\frac{1}{4}$  a soluțiilor minerale MS (1962) a determinat o mai bună înrădăcinare *in vitro* a unor clone de cireș negru (*Prunus serotina* Ehrh.) (Fuernkranz, 1987) (după Debergh și colab., 1994).

Debergh (1983) și Debergh și colaboratorii (1994) apreciau că utilizarea unor concentrații mai ridicate de săruri minerale în mediul de cultură este oportună, atunci când se dorește scoaterea mugurilor vitroplantulelor de sub dominanța apicală; dar, această măsură inhibă formarea - de novo – de rădăcini, în momentul transferării *ex vitro* a plantulelor generate în condiții aseptice; dimpotrivă, cu cât mediul de cultură a fost mai sărac în săruri minerale, cu atât înrădăcinarea exvitroplantulelor a fost mai bună.

Williams (1993), la cultura de *Ptilotas exaltatus* a observat că, prin scăderea concentrației de  $Ca^{2+}$  din mediul de vitrocultură umiditatea relativă în vasul de cultură s-a ridicat la 100%. Reducerea umidității relative la 65% a condus la o creștere a concentrației de calciu în țesuturile vitroplantulelor, de la 8 mg/g, la 18 mg/g/greutate proaspătă. La salata verde, aceste efecte au fost atribuite deficienței în localizarea calciului, cauzate de transpirația limitată și de umiditatea ridicată (Collier și Huntington, 1983). Reducerea umidității în vasele de cultură, intensifică evapotranspirația, ceea ce implicit mărește concentrarea sărurilor minerale în mediul de creștere a fitoinoculilor.

La specia *Rosa damascena* Mill, Noodezh și colaboratorii (2012), au identificat un mediu optim pentru proliferarea lăstarilor, prin modificarea mediului lichid Murashige - Skoog cu niveluri mai ridicate de nitrați, calciu, fier și plus suplimentarea cu 4 mg/l 6-benzilaminopurină și 0,25 mg / l acid 3 indolilacetic. Autorii au menționat faptul că un mediu lichid, cu o jumătate din concentrația de macroelemente, suplimentat cu 0,1 mg/l acid 3-indolilbutiric a fost mediul cel mai de succes pentru înrădăcinarea *in vitro*, a acestui cultivar.

**Problema tehnică** pe care o rezolvă invenția este înlocuirea macroelementelor din compoziția mediului de vitrocultură, cu amestec de elemente esențiale pentru dezvoltarea plantelor, fără a fi afectată capacitatea regenerativă a acestora în subkultură. Metoda este utilă atunci când se dorește conservarea *in vitro* a fitoinoculilor, cu scopul măririi intervalelor de subkultură, implicit cu reducere costului de întreținere a vitroculturilor.

În raport cu stadiul tehnicii, invenția prezintă următoarele avantaje:

- costuri mai reduse ale micropropagării, atât prin prețul mic de achiziție al produsului, dar și prin efectul acestuia, adică reducerea numărului de subculturi – temporizând creșterea inoculilor nu mai este nevoie de operat numeroase subculturi pentru conservarea *in vitro* a diferitor genotipuri;
- eficiență bună în producerea rezultatului scontat, și anume înlocuirea macroelementelor din compoziția mediului de cultură, inducând o încetinire a creșterii fitinoculilor, fără afectarea capacității regenerative și fără efecte remanente de încetinire a creșterii în subkultură;
- produsul testat de noi și care face obiectul prezentei cereri de brevetare prezintă aplicabilitate facilă, atât din punct de vedere al prezentării produsului, cât și a realizării procedurii, este ușor manevrabil.

Asigurarea elementelor esențiale în mediul de cultură agarizat, adecvat pentru inocularea explantului, ieftin și la îndemână, precum și temporizarea creșterii fitoinoculilor, 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 mai multe specii vegetale (atât ierboase, cât și lemnoase, de interes alimentar, cât și ornamental, precum și la specii care se regăsesc și în flora spontană).

Înlocuitorul de macroelemente care face obiectul prezentei cereri de brevetare, denumit de noi *comprimat M* este utilizat pentru prima oară în scopul vitroconservării inoculilor în sistem de creștere lentă, nemaifiind utilizat sau descris de alți autori la nivel național sau internațional. Nu am identificat în literatura de specialitate date referitoare la folosirea acestui tip de suport în vitrocultură.

Procedeul conform invenției noastre are la bază substituirea totală a macroelementelor din mediul de cultură cu *comprimat M*, care este din punct de vedere chimic un amestec de azot total (N): 5%, azot amoniacal (N): 5%, anhidridă fosforică ( $P_2O_5$ ) solubilă în citrat de amoniu și apă: 12%, anhidridă fosforică ( $P_2O_5$ ) solubilă în apă: 12%, oxid de potasiu ( $K_2O$ ) solubil în apă, prezentat sub formă de comprimat de 4 g care se dizolvă la 2 litri de apă. Pentru alcătuirea înlocuitorului de macroelemente am utilizat 100 ml din soluția rezultată din dizolvarea unui comprimat în 2 litri de apă bidistilată.

Necesarul de macroelemente pentru 1 l mediu de cultură cu concentrații medii de macroelemente, precum mediul Murashige – Skoog, costă cca. 1,5 lei, iar utilizarea comprimatelor *nutritive M*, pentru costă 0,08 lei (cu 32 de lei achiziționăm comprimate necesare pentru 400 l de mediu de cultură).

Se dă în continuare câte un exemplu de realizare a invenției, respectiv a procedurii de înlocuire a macroelementelor, având ca efect temporizarea creșterii fitoinoculilor:

În acest scop, în mediul de cultură Murashige – Skoog (MS) (1962) solid, modificat de noi, și anume: 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, 7 g/l Difco Bacto Agar, lipsit de macroelemente ( $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ ,  $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$ ,  $KNP_3$ ,  $NH_4NO_3$ ,  $KH_2PO_4$ ) – cum este specificat în rețeta originală și cu adaos de 100 ml soluție (rezultată din dizolvarea unui *comprimat M* în 2 litri de apă). În vederea testării reacției vitroplantulelor la această nouă compoziție a mediului de cultură au fost utilizate mai multe specii vegetale, pentru a releva generalitatea metodei, precum cartoful (*Solanum tuberosum* var. *Gălănești* -14369, *Solanum tuberosum* var. *Gersa* - 14381) – două soiuri valoroase din punct de vedere ecosanogen, datorită conținutului ridicat de antociani, cât și specii ornamentale, precum orhidea (*Cymbidium* sp.), specii din flora spontană și anume roua cerului (*Drosera rotundifolia*) și o specie lemnoasă, gimnospermă: sequoia (*Sequoia dendron* sp).

După inocularea fitoinoculilor, indiferent de specie, recipientele de cultură 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.

Experimentele s-au derulat pe o perioadă de 24 de săptămâni, la fiecare 4 săptămâni au fost efectuate măsurători biometrice care să reflecte creșterea și dezvoltarea fiecărui tip de inocul.

După 24 de săptămâni în sistem de creștere lentă a fost testată capacitatea de regenerare a fitoinoculilor prin subcultivarea lor pe mediul MS clasic, agarizat, lipsit de regulatori de creștere pentru a evidenția capacitatea nativă de creștere – fără stimulare - neforțată - a acestora.

Un *prim exemplu* îl semnalăm la *fitoinoculii de cartof*, care la lotul martor (MS clasic, agarizat), atât în cazul varietății 14369, cât și 14381, au putut fi menținute în vitro cultură 12 săptămâni, având o tulpiniță în medie de 12 cm, cu 11 noduri, 5 ramificații valori semnalate în cazul varietății 14369, și respectiv 11,6 cm, 11 noduri, 4 ramificații – valori medii înregistrate în cazul varietății 14381; la această vârstă plantulele ocupau întreg spațiul din recipientul de cultură, iar partea superioară a acesteia era cantonată la nivelul foliei care acoperă recipientul de cultură, motiv pentru care am fost nevoiți să subcultivăm lotul martor. La finalul celor 24 de săptămâni de la inoculare, vitroplantulele aparținând varietății 14369 cultivate pe varianta de mediu în care macroelementele au fost înlocuite cu soluție de *comprimat M*, au prezentat o tulpiniță în medie de doar 2,4 cm (valoare medie de 5 ori inferioară lotului martor), doar 5 noduri la tulpinița principală (medie de 2,2 ori mai mică față de lotul martor), doar 4 ramificații (cu 1 exemplar mai puțin decât la lotul martor). Și fitoinoculii de cartof din varietatea 14381 amplasați pe mediu în care macroelementele au fost înlocuite cu soluție de *comprimat M* au prezentat un ritm de creștere mult mai scăzut față de lotul martor: o tulpiniță cu talia de doar 2,2 cm (valoare medie inferioară celei de la martor de 5,27 ori), doar 5 noduri la tulpinița principală (medie de 2,2 ori mai mică față de martor), 4 ramificații valoare egală cu a lotului martor – care la vârsta de 24 de săptămâni a necesitat o nouă subkultură. Chiar dacă vitroplantulele de cartof, la ambele varietăți, au prezentat o creștere mult încetinită față de lotul martor și nici după o perioadă de timp dublă - 24 de săptămâni de creștere lentă, nu au atins valorile parametrilor de creștere semnalate la lotul martor marcate la 12 săptămâni, totuși și-au păstrat culoarea verde intensă și vitalitatea – manifestând procese de caulogeneză și respectiv rizogeneză, iar în subcultura realizată după

15

24 de săptămâni de creștere lentă, au generat vitroplantule viabile, fără efecte remanente de încetinire a creșterii.

**Un al doilea exemplu** de creștere lentă s-a marcat la *fitoinoculii de Cymbidium* care au reacționat pozitiv la sistemul propus de noi, identic cu cel descris anterior, manifestând o încetinire de creștere considerabilă față de lotul martor, amplasat pe mediul de cultură ce conține macroelemente conform rețetei MS. În cazul orhideei, mediul de cultură solid este utilizat pentru inducerea procesului de organogeneză. Astfel, după 24 de săptămâni de vitrocultivare, s-a constatat un număr de 30 de protocormi/glomerul la lotul martor și un număr mediu de 6 plantule regenerate/recipient, rădăcinițele lor fiind acoperite de velamen – ceea ce demonstrează atingerea maximului din capacitatea de diferențiere a protocormilor, în schimb, la nivelul inoculilor din lotul cultivat pe varianta de mediu în care am înlocuit macroelementele cu soluție de *comprimat M*, după 24 de săptămâni de vitrocultivare s-a constatat un număr mediu de doar 8 protocormi/glomerul (o diferență inferioară lotului martor de 3,75 ori). De asemenea, diametrul protocormilor la lotul martor a fost mult mai mare: cuprins între 0,34 – 0,52 cm în timp ce la lotul de pe varianta de mediu în care am înlocuit macroelementele cu soluție de *comprimat M*, protocormii formați aveau doar 0,2 – 0,36 cm, la ambele variante culoarea protocormilor a fost verde intens – dovadă a vitalității lor. Lotul cultivat pe varianta de mediu în care am înlocuit macroelementele cu soluție de *comprimat M*, abia în a 24-a de săptămână de vitrocultivare, a manifestat declanșarea procesului de organogeneză – prezentând în medie patru plantule/recipient de dimensiuni foarte mici de doar 0,6 cm – dovadă clară a încetinerii dezvoltării lor. În schimb, odată cu subcultivarea inoculilor de pe varianta de mediu în care am înlocuit macroelementele cu soluție de *comprimat M* pe mediu de cultură proaspăt, agarizat conform rețetei MS, au prezentat fenomenul de organogeneză începând cu a 8-a săptămână de la subcultivare, exact ca și subcultura provenită din protocormi din lotul martor.

Un al **treilea exemplu** de încetinire a creșterii a fost remarcată în cazul inoculilor de *roua cerului* (*Drosera rotundifolia* – plantă carnivoră, specie protejată, care se regăsește și în flora spontană), la care după 24 de săptămâni de vitrocultivare, la lotul martor au fost numărate în medie 36 de rozete/recipient, acestea având diametrul cuprins între 0,50 – 2,2 cm acestea aveau culoarea verde intensă a frunzelor și a perișorilor glandulari de pe marginea limbului; în timp ce la lotul cultivat pe varianta de mediu în care am înlocuit macroelementele cu soluție de *comprimat M* s-au remarcat 20 rozete/recipient (medie de 1,8 ori mai puțin decât lotul martor) cu diametrul de 1,1 cm, frunzele vând o culoare verde intens cu perișori glandulari de culoare roșu intens. La nivelul lotului martor, după 24 de săptămâni de

vitrocultivare s-a constatat un număr de 6 tije florale de culoare verde intens, în timp ce la inoculii cultivați pe varianta de mediu în care am înlocuit macroelementele cu soluție de *comprimat M* s-au format câte 18 tije florale/flacon, acestea având o culoare roșu intens, la fel ca și perișorii glandulari de pe marginea limbului foliar. După 24 săptămâni de creștere lentă, odată ce inoculii de pe varianta de mediu în care am înlocuit macroelementele cu soluție de *comprimat M* au fost transferați pe mediu MS agarizat, aceștia au manifestat o creștere similară cu lotul martor, fără efecte remanente de încetinire a creșterii.

Un al *patrulea exemplu* de sistem de creștere lentă descris anterior l-am demonstrat și în cazul speciilor lemnoase, inoculii de *sequoia* cultivați pe varianta de mediu în care am înlocuit macroelementele cu soluție de *comprimat M* manifestând o creștere mult mai lentă față de lotul martor. Astfel, ambele variante au manifestat fenomene de caulogeneză – după 24 de săptămâni de vitrocultivare talia lotul martor a atins valoarea medie de 11,6 cm, în timp ce talia lotului de vitroplantule cultivate pe varianta de mediu în care am înlocuit macroelementele cu soluție de *comprimat M* a fost de doar 1,3 cm (medie de 8,9 ori mai mică decât cea de la lotul martor). Și în ceea ce privește numărul mediu de lăstari generați/inocul, lotul martor a marcat 18 lăstari/inocul, în timp ce lotul de pe varianta de mediu în care am înlocuit macroelementele cu soluție de *comprimat M* a format doar 2 lăstari (medie de 9 ori mai mică comparativ cu valorile înregistrate la vitroplantulele cultivate pe mediu MS), lăstarii generați au fost de culoare verde intensă, care după subcultivarea acestora pe mediu proaspăt agarizat au generat plantule cu o capacitate de creștere similară cu cea de la lotul martor.

Subiectul încetinerii creșterii – sau micropropagare în sistem de creștere lentă – este deosebit de util tuturor băncilor de gene sau centrelor de cercetare care urmăresc păstrarea germoplasmei în vitrocultură, prin reducerea numărului de subculturi – reducându-se costurile micropropagării, totodată este imperativ necesar ca odată ce este nevoie ca acel material vegetal să fie rapid multiplicat, să nu existe efecte remanente de inhibare a creșterii în subkultură.

### **Bibliografie**

- 1) Baciu A., Petruș V.A., Zehan R., Mike L., Prodan M., 2007b, The results in the field of the in vitro conservation of the cultivars when using classic and modern conservation methods. Analele Universității din Oradea, Fascicula Biologie, Tom, XIV, 23-26.
- 2) Bajaj Y.P.S., 1990, Cryoconservation of germplasm of vegetatively propagated crops. Bull. Soc. Bot Fr., 137: 99-114.
- 3) Cachiță, C.D., 1987, Metode “in vitro” la plantele de cultură. Editura Ceres, București.



## REVENDICĂRI

1. Procedeu de micropropagare a fitoinoculilor, **caracterizat prin aceea că** acesta utilizează comprimate nutritive M, ca înlocuitoare a macroelementelor, în prepararea mediul de cultură destinat culturilor *in vitro* vegetale.