

I. Raportul Științific și Tehnic 2022

(sinteză)

- Contract nr. 21 PTE/2020

Etapa nr. 3/2022, perioada de derulare 01.01.2022 – 27.05.2022

Cod proiect: PN-III-P2-2.1-PTE-2019-0670

Titlu proiect: Tehnologie și sistem cu imersie temporară în bioreactoare cu comandă digitală, destinate micropropagării plantelor

Etapa III: Implementarea unor sisteme de micropropagare în bioreactoare în laboratorul de culturi in vitro al SC Renard Olunden SRL.

- Rezumatul etapei:

Obiectivul general al proiectului vizează dezvoltarea și experimentarea de la nivel TRL 4 la TRL 6 a unui prototip pentru un nou sistem de imersie temporară în bioreactoare cu unitate de decizie și control digitalizată (TIBS-D) destinat micropropagării plantelor, testarea și validarea prototipului în condiții reale de funcționare în laboratorul de micropropagare al SC Renard Olunden SRL și brevetarea acestuia pentru exploatarea comercială pe piața internă și internațională.

Pentru realizarea acestui obiectiv, în etapa a III-a a proiectului principalele activități au vizat implementarea unor sisteme de micropropagare în bioreactoare în laboratorul de micropropagare al SC Renard Olunden SRL, elaborarea unei cereri de brevet OSIM pentru sistem cu imersie temporară în bioreactoare cu comandă digitală pentru micropropagarea plantelor (TIBS-D) și diseminarea rezultatelor. În laboratorul de micropropagare al SC Renard Olunden SRL au fost înființate culturi in vitro în bioreactoarele SETIS, RITA și PlantForm precum și în prototipul TIBS-D. A fost elaborată și înregistrată la OSIM cererea de brevet cu titlul *Bioreactor cu unitate de decizie și control digitalizată destinat micropropagării plantelor*. Astfel, cercetările au atins nivelul de maturitate tehnologică TLR6, respectiv prototipul a fost testat în condițiile reale, în laboratorul de micropropagare al agentului economic.

- Descrierea științifică și tehnică, cu punerea în evidență a rezultatelor etapei și a gradului de realizare a obiectivelor – se vor indica rezultatele și modul de diseminare a rezultatelor.

În etapa III 2022 proiectul a avut două obiective majore, respectiv implementarea unor sisteme de micropropagare în bioreactoare în laboratorul de micropropagare al SC Renard Olunden SRL și elaborarea și înregistrarea la OSIM România a unei cereri de brevet cu titlul *Bioreactor cu unitate de decizie și control digitalizată destinat micropropagării plantelor* precum și activități de diseminare a rezultatelor. Obiectivele au fost realizate în totalitate după cum urmează:

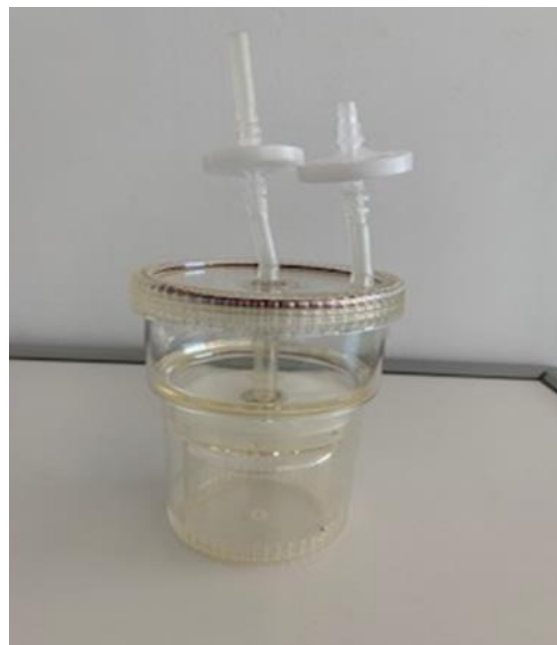
I. Implementarea sistemului de micropagare în bioreactorul digitalizat la SC Renard Olunden SRL

Primul obiectiv al etapei III 2022 a fost de a implementa în laboratorul de culturi in vitro al SC Renard Olunden SRL culturi in vitro în bioreactoare și de a testa prototipul în condiții reale de funcționare.

Cele trei tipuri de bioreactoare care au fost testate pentru cultura in vitro a afinului, afinul fiind specia de bază înmulțită în epinieră, au fost: SETIS (Fig. 1a), RITA (Fig. 1b), PLANTFORM (Fig. 1c) și prototipul TIBS-D (Fig. 1d).



a



b



c



d

Figura 1. Sistemele de bioreactoare testate: a - SETIS, b - RITA, c - PLANTFORM, d – TIBS-D

Mediul de cultură utilizat în toate cele patru tipuri de bioreactoare a fost McCown's Woody Plant (WPM) (Lloyd and McCown, 1981) suplimentat cu 100 mg/l Sequestrene 138, 0.5 mg/l zeatină (Z) și 30 g/l zahăr. Ajustarea pH-ului la 5 s-a făcut înainte de autoclavare care s-a făcut la 0.11 MPa la 121°C timp de 20 min. Toate componentele utilizate au provenit de la Duchefa Biochemie B.V., Netherlands. Cantitatea de mediu de cultură repartizat în vasele bioreactoarelor a fost (Figura 2):

SETIS – 1500 ml

RITA - 200 ml

PLANTFORM – 300 ml

TIBS-D – 700 ml



a



b



c



d

Figura 2. Distribuția mediilor de cultură în bioreactoare: a- Bioreactorul SETIS 1500 ml; b – Bioreactorul PlantForm – 300 ml; c – Bioreactorul Rita – 200 ml; d – Bioreactorul TIBS – D – 700 ml.

În toate tipurile de bioreactoare s-a inoculat (Figura 3) soiul de afin Duke, un soi mai recalcitrant la cultura in vitro iar Inoculii au constat în minibuțași de circa 1.5 cm proveniți din culturi in vitro pe medii solide cu aceeași componență descrisă mai sus.

Numărul de inoculi/ bioreactor a fost următorul:

SETIS – 100 inoculi

RITA - 25 inoculi

PLANTFORM – 40 inoculi

TIBS-D – 50 inoculi

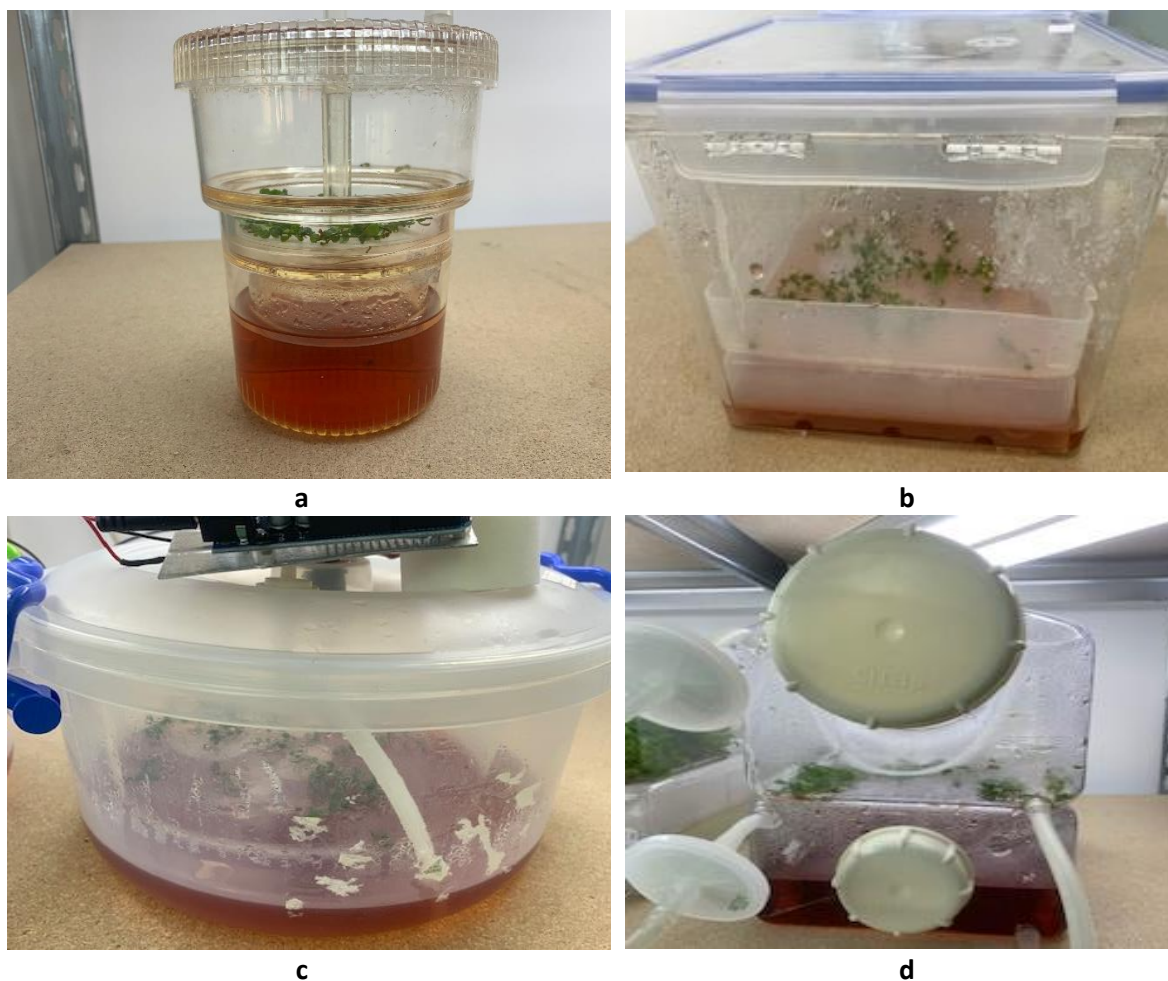


Figura 3. Inocularea minibutașilor în bioreactoare: a- Bioreactorul SETIS 100 inoculi; b – Bioreactorul PlantForm – 40 inoculi; c – Bioreactorul Rita – 25 inoculi; d – Bioreactorul TIBS – D – 50 inoculi

II. Teste de performanță – testarea fidelității genetice a materialului săditor de mur obținut în bioreactoare

Un aspect important al materialului săditor obținut prin micropropagare este fidelitatea genetică cu planta mamă de la care au provenit explantele utilizate pentru inițierea culturilor in vitro. Pentru a verifica acest aspect s-au efectuat teste privind fidelitatea genetică a materialului săditor de mur (*Rubus fruticosus* L.) multiplicat in vitro în bioreactor folosind două sisteme de markeri moleculari: ScoT (Start Codon Targeted marker) și SRAP (Sequence-Related Amplified Polymorphism).

Soiurile de mur luate în studiu au fost: 'Čačanska Bestrna', 'Chester Thornless' și 'Loch Ness'. Cultura in vitro s-a făcut timp de 10 săptămâni pe mediul de cultură Murashige and Skoog (1962) (MS) suplimentat cu 0.5 mg /l 6-Benzyladenine (BA), pH 5,8. S-a utilizat bioreactorul Plantform cu 400 ml mediu/bioreactor, timpul de imersie a fost de un minut la patru ore și aerarea a fost o dată/oră timp de 4 minute. Mediile de cultură au fost autoclavate timp de 20 min la 0.11 MPa și 121° C. Toate componentele au fost adăugate în mediul de cultură înainte de autoclavare și au fost achiziționate de la Duchefa Biochemie B.V, Netherlands. În fiecare bioreactor au fost inoculate 10 fragmente de lăstari cu lungimea de 2-3 cm.

Culturile in vitro au fost incubate în camera de creștere la o fotoperioadă de 16 ore, 32,4 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ intensitate luminoasă (Philips CorePro LEDtube 1200 mm 16W865 CG, 1600lm Cool Daylight) la $23 \pm 3^\circ\text{C}$.

Pentru a verifica fidelitatea genetică a plantelor micropropagate de mur cu planta mamă, ADN-ul a fost izolat atât din planta mamă, cât și din plantele obținute in vitro în bioreactoare care au fost selectate aleatoriu după 10 săptămâni de cultură. Acești lăstari au fost utilizați pentru izolarea ADN-ului fiind uscați și măcinați în pulbere fină (TissueLyser II, Qiagen, Germania) și păstrați la 4°C până la efectuarea analizelor genetice.

Izolarea ADN-ului genomic total (gDNA) a fost realizată folosind metoda CTAB (bromură de cetil trimetilamoniu) conform protocolului publicat de Lodhi și colab. (1994) și îmbunătățit de Pop și colab. (2003) și Bodea și colab. (2016). Puritatea și concentrația ADN-ului au fost determinate cu un spectrofotometru NanoDrop-1000 (Thermo Fisher Scientific, SUA). Înainte de analiza markerului molecular genetic, probele de ADN au fost diluate la $50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ folosind apă dublu distilată sterilă.

Analiza SRAP și SCoT PCR:

Două seturi de 8 primeri SRAP, respectiv 7 primeri SCoT au fost utilizate pentru fcele două tehnici bazată pe PCR pentru a evalua fidelitatea genetică a plantulelor in vitro cu planta mamă. Acești primeri au generat fragmente marcabile în toate probele analizate. Pentru a asigura reproductibilitatea rezultatelor, toate amplificările PCR au fost repetate de trei ori.

Pentru analiza SRAP, reacțiile PCR au fost efectuate urmând protocolul descris de Li și Quiros (2001). Pentru analiza SCoT, reacțiile PCR au fost efectuate cu un volum total de $15 \mu\text{L}$ constând din $3 \mu\text{L}$ gADN, $5,6 \mu\text{L}$ H_2O distilat pentru reacțiile PCR, $2,5 \mu\text{L}$ GoTaq Flexi Green tampon (Promega, SUA), $2,5 \mu\text{L}$ MgCl_2 (Promega, SUA), $0,25 \mu\text{L}$ amestec dNTP (Promega, SUA), $1 \mu\text{L}$ primer SCoT (GeneriBiotech, Cehia) și $0,15 \mu\text{L}$ polimerază GoTaq (Promega, SUA). Condițiile de ciclizare a temperaturii PCR au fost: (a) denaturare inițială la 94°C timp de 5 minute, (b) 35 de cicluri de denaturare la 94°C timp de 1 min, recoacere la 50°C timp de 1 minut și alungire la 72°C pentru 2 min și (c) etapa finală de alungire de 5 min la 72°C .

Separarea produselor amplificate pentru ambele tehnici a fost efectuată prin electroforeză pe geluri de agaroză 1,6 % (Promega, SUA) colorate cu soluție de colorare cu acid nucleic RedSafeTM (iNtRON Biotech, Coreea de Sud) în 1X TAE (tampon Tris-acetat-EDTA), la 100V și 176mA timp de 2,5-3 ore. Profilurile electroforetice au fost vizualizate în UV Transilluminator large, 26 x 21 cm, 254/365 nm.

Rezultate:

Cei 8 primeri SRAP au generat un număr de benzi distincte și marcabile, în funcție de soi astfel: 'Čačanska Bestrna' – 95 (cu o medie de 11,8 benzi/primer), 'Chester Thornless' – 93 (cu o medie de 11,6 benzi/primer), 'Loch Ness' – 90 (cu o medie de 11,2 benzi/primer) și nu a fost observat niciun polimorfism între plantele micropropagate în bioreactor și plantat mamă.

Cei 7 primeri SCoT au generat un număr de benzi distincte și marcabile, în funcție de soi astfel: 'Chester Thornless' – 78 (cu o medie de 11, 2 benzi/primer), 'Čačanska Bestrna' – 74 (cu o medie de 10,5 benzi/primer), 'Loch Ness' – 71 (cu o medie de 10,14 benzi/primer) și nu a fost observat niciun polimorfism între plantele micropropagate în bioreactor și planta mamă.

III. Elaborare cerere de brevet OSIM pentru sistem cu imersie temporară în bioreactoare cu comandă digitală pentru micropropagarea plantelor

Al doilea obiectiv al etapei III a fost elaborarea cererii de brevet cu titlul **Bioreactor cu unitate de decizie și control digitalizată destinat micropropagării plantelor** și depunerea la OSIM.

Cererea de brevet cuprinde următoarele capitole:

1. *Descrierea invenției*: în acest capitol s-a trecut în revistă bibliografia în domeniu, problema tehnică pe care o rezolvă invenția, avantajele care se obțin în raport cu stadiul tehnicii prin aplicarea acestei invenții, prezentarea pe larg a invenției prin descriere și figuri, cazurile în care se poate folosi invenția, exemple de culturi in vitro care s-au obținut în prototip, importanța practică a invenției și, în încheiere literatura citată.
2. Revendicări.
3. Rezumat.
4. Figuri.

IV. Diseminarea rezultatelor prin publicarea națională și internațională de articole științifice

1. Lucrări publicate:

A. În reviste ISI cu factor de impact:

1. Molnar S, Clapa D*, Mitre V. Response of the Five Highbush Blueberry Cultivars to In Vitro Induced Drought Stress by Polyethylene Glycol. *Agronomy*. 2022; 12(3):732.. **IF=3.417**
<https://doi.org/10.3390/agronomy12030732>
2. Doina Clapa, Amalia Nemeș, Floricuța Ranga, Dan-Cristian Vodnar, Monica Hârța, Lavinia-Florina Călinoiu. *Vaccinium corymbosum* L tissue culture: an innovative alternative source for the production of secondary metabolites. *Horticulturae*. 2022, acceptat, **IF=2.331**

B. În reviste indexate ISI:

1. Doina CLAPA, Monica HÂRȚA, Evaluation of genetic fidelity of in vitro growth plants of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) cultivars using SCoT molecular markers, *Scientific Papers. Series B. Horticulture Vol. LXVI, No. 2, 2022*, acceptat.
2. Monica HÂRȚA, Doina CLAPA, Micropropagation of Ornamental Gesneriaceae Species and Genetic Uniformity Assessment of In vitro Plants using SCoT Markers, *Scientific Papers. Series B. Horticulture Vol. LXVI, No. 2, 2022*, acceptat.

- Concluzii:

Obiectivele propuse în etapa III/2022 au fost realizate după cum sunt descrise în prezentul raport și anume:

- S-a implementat sistemul de micropagare în bioreactorul digitalizat la SC Renard Olunden SRL;
- Teste de performanță – s-a testat fidelitatea genetică a materialului săditor de mur obținut în bioreactoare;
- S-a elaborat cererea de brevet cu titlul *Bioreactor cu unitate de decizie și control digitalizată destinat micropagării plantelor* ;
- Cererea de brevet a fost înregistrată la OSIM cu numărul A00245/09.05.2022.
- Diseminarea rezultatelor s-a realizat prin publicarea a două articole științifice cu factor de impact și două articole indexate ISI, cu acknowledgment-ul proiectului (Planificat: 1 articol BDI; Realizat: 2 articole ISI cu factor de impact și 2 articole indexate ISI).