



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2012 00095**

(22) Data de depozit: **14/02/2012**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/12/2016** BOPI nr. **12/2016**

(41) Data publicării cererii:
30/08/2013 BOPI nr. **8/2013**

(73) Titular:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE
DEZVOLTARE PENTRU CARTOF ȘI
SFECLĂ DE ZAHĂR, STR. FUNDĂTURII
NR. 2, BRAȘOV, BV, RO**

(72) Inventatori:
• **CHIRU NICOLETA, STR. I.L.CARAGIALE
NR. 6, BL. 19, SC. A, AP. 11, BRAȘOV, BV,
RO;**

• **NISTOR ANDREEA, STR. HĂRMANULUI
NR. 70B, BL. 135, SC. A, ET. 5, AP. 21,
BRAȘOV, BV, RO;**

• **CHIRU SORIN, STR. I.L.CARAGIALE
NR. 6, BL. 19, SC. A, AP. 11, BRAȘOV, BV,
RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
WO 2010/076954 A2; US 7906703 B2

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A MICROTUBERCULILOR DE
CARTOF *IN VITRO*, MAI MARI DE 10 MM ȘI MAI MARI DE 1 G**

Examinator: **biochimist CREȚU ADINA**



Orice persoană are dreptul să formuleze în scris și
motivată, la OSIM, o cerere de revocare a brevetului de
invenție, în termen de 6 luni de la publicarea mențiunii
hotărârii de acordare a acesteia

RO 128694 B1

1 Invenția se referă la un procedeu de obținere a microtuberculilor de cartof *in vitro*, mai
mari de 10 mm și mai mari de 1 g.

3 În producerea cartofului pentru sămânță, există o problemă destul de dificilă din
cauza presiunii mari de infecție, problemă ce poate fi depășită prin utilizarea înmulțirii *in vitro*.
5 Rezolvarea constă în obținerea unui material inițial corespunzător din punct de vedere fito-
sanitar, în menținerea libere de virusuri a noilor genotipuri create, precum și în micropropa-
7 garea rapidă a celor mai valoroase creații.

9 Soiul, ca resursă biologică, constituie unul dintre cei mai importanți factori în realiza-
rea unor producții mari, constante și economice, dar, ca orice material biologic, se menține
în producție un timp limitat. Degenerarea biologică, uzura morală, apariția și evoluția agen-
11 ților patogeni, modificarea condițiilor tehnice și economice, cerințele pieții, toate constituie
elemente principale în menținerea în producție un timp mai lung sau mai scurt.

13 La cartof, calitatea materialului de plantare este factorul esențial care determină cali-
tatea și cantitatea recoltelor obținute, fiind cunoscut faptul că producția de cartof este deter-
15 minată în valoare de peste 50% de calitatea materialului de plantare. Producerea cartofului
pentru sămânță reprezintă o activitate științifică complexă, laborioasă, care necesită o preo-
17 cupare mai mare decât producerea materialului semincer la culturile cu înmulțire prin
sămânță adevărată, datorită în principal următoarelor cauze:

- 19 - diminuarea progresivă a producției, determinată de degenerarea virotică și fiziologică;
- 21 - coeficientul de înmulțire foarte mic (1:4... 1:10);
- 23 - conținutul ridicat de apă și sensibilitatea la vătămare a tuberculilor impune condiții
speciale pentru păstrare;
- 25 - costurile aferente materialului pentru plantat sunt mari datorită normei de plantare
ridicate.

27 Prin dezvoltarea culturii *in vitro* de producere de microtuberculi, se mărește eficiența
procesului de producere de sămânță atât sub aspect economic, cât și ca durată, această
tehnică determinând o reducere cu 4...5 ani a timpului necesar, și, în același timp, se elimină
o serie de lucrări adiacente, create de necesitatea menținerii unui stoc de material biologic
29 reproductiv sănătos, și care se utilizează în mod obișnuit în sistemul clasic.

31 La ora actuală, pe plan mondial, există tehnici clasice de producere a cartofului
pentru sămânță, prin utilizarea microtuberculilor produși *in vitro*. Aceste tehnici clasice nu
33 rezolvă problema obținerii unor microtuberculi cu dimensiuni și greutate mari și, din acest
motiv, microtuberculii mai mici de 10 mm și mai mici de 1 g prezintă un risc real în procesul
de multiplicare, prin faptul că raportul de multiplicare nu depășește valoarea de 2:1,
35 respectiv, 3:1 [Angel M. Mingo-Castel și colab., "Effect of Carbon Dioxide and Ethylene
on Tuberization of Isolated Potato Stolons Cultured in Vitro", Plant Physiol. (1974) 53,
37 pp. 798-801; A. A. R. Yousef și colab., "In Vitro Culture and Microtuberization of
"Spunta" Potato (*Solanum tuberosum* L.)", Dirasat, Agricultural Sciences, Vol. 24,
39 No. 2, 1997; Evgenij V. Mokshin și colab., "Induction of Microtuberization for One-bud
Potato Cuttings in Vitro", Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology 2,
41 2008 Global Science Books, pp. 118-124].

43 Producerea de microtuberculi *in vitro*

45 Procedeu clasic

47 1. Obținerea materialului inițial liber de virusuri, utilizând culturile de meristeme

Pentru inițierea culturii de meristeme, tuberculii de cartof luați în studiu (câte 10 tuber-
47 culi pentru fiecare soi) sunt puși la încolțit, în condiții de laborator, la temperatura de 18°C,
la lumină. După aproximativ 3 săptămâni, colții au lungimea de circa 2...3 cm, sunt detașați,
49 dezinfecți și utilizați pentru obținerea inoculilor meristematici, prin îndepărtarea micilor

foliole ce înconjoară vârful de creștere, până ce se observă domul meristematic, cu primele primordiile foliare Excizarea meristemelor se face la lupa binoculară, în hota cu flux de aer steril, pe o suprafață ce a fost în prealabil dezinfectată cu alcool 70°. După prelevare, explantul meristematic este introdus într-un mediu de cultură de dezvoltare, folosit la cartof, Murashige-Skoog (MS 1962), cu diverse variante hormonale. Culturile odată înființate, sunt transferate în camera de creștere, fiind expuse unui regim de lumină de 4000 lucși, cu o fotoperioadă de 16 h lumină, 8 h întuneric, la o temperatură de 22°C ± 2°C ziua, și 18...20°C ± 2°C noaptea. În cazul meristemelor viabile, după un timp, inoculii meristematici încep să crească și dezvoltă mici muguri care se transformă în plantule (în funcție de soi, 6...8 luni).

2. *Înmulțirea in vitro a cartofului*

Plantulele de cartof regenerate din meristeme sunt microbutășite, fiecare minibutaș conținând un nod cu frunzulița aferentă. Fiecare minibutaș este inoculat apoi într-un mediu nutritiv de cultură, Murashighe-Skoog (MS 1962), cu un adaos de acid alfa-naftilacetic (ANA) în concentrație de 0,5 mg/l, pentru stimularea creșterii și înrădăcinării. Mediul a fost solidificat cu 0,7% Agar-Agar, iar pH-ul a fost ajustat la 5,8 cu KOH înainte de autoclavare. Sterilizarea recipientelor cu mediu a fost făcută la 120°C, timp de 25 min. După inocularea minibutașilor, operație efectuată în incinta hotei cu flux laminar steril, eprubetele sunt plasate în camera de creștere în aceleași condiții de temperatură și lumină ca la faza de inițiere a culturii din meristeme. După aproximativ 3...4 săptămâni (în funcție de genotip), fiecare genotip s-a dezvoltat și a generat o nouă plantulă de circa 5...7 cm, acestea au fost secționare din nou, nod per nod în minibutași. Fenomenul se repetă ori de câte ori este nevoie. Mediul de cultură utilizat a facilitat de fiecare dată regenerarea din mugurele prezent la nivelul nodului, respectiv, la axila fiecărei frunzulițe (meristeme axilare) o plantulă completă, cu o tulpiniță bine conformată și cu multe rădăcinuțe. Coeficientul de înmulțire este în jur de 4...5 la fiecare 3...4 săptămâni.

3. *Identificarea infecției virale prin testul ELISA*

Prima testare a plantulelor, în vederea depistării prezenței infecției virale în vitroplantulele regenerate din meristeme cu ajutorul testului ELISA, s-a făcut în faza în care plantulele erau dezvoltate, având frunzulițe și rădăcinuțe.

Materialul biologic este reprezentat de 90 de clone de cartof (din soiurile analizate), și fiecare clonă este testată pentru fiecare dintre virusurile PVX, PVY, PVM, PVS, PVA și virusul răsucirii frunzelor (PLRV). Pentru testare, se recoltează 5...6 plantule din *in vitro* de la fiecare clonă de cartof din soiurile supuse devirozării, și se extrage suc prin presare la presa automată.

4. *Înființarea culturii in vitro pentru obținerea de microtuberculi in vitro*

Punctul de plecare în producerea microtubercuilor sunt plantulele produse în ultima fază de înmulțire, adică minibutașii care sunt inoculați în mediul de creștere și înrădăcinare MS. După 3...4 săptămâni, se adaugă mediul de microtuberizare care este un mediu lichid, de conține aceleași substanțe ca și mediul MS de creștere și înrădăcinare, dar cantitatea de soluție stoc este redusă la jumătate, fiind completat cu kinetina, cumarină și zaharoză în concentrație de 80...90 g/l.

Mediul de microtuberizare nu conține agar sau alți agenți gelifianti. În fiecare cutie de plastic ce conține câte 20 de minibutași, se toarnă 40 ml de mediu de microtuberizare sterilizat și răcit. Microtuberizarea are loc la întuneric, timp de 6...8 săptămâni, temperatura fiind de 20 ± 2°C.

5. *Recoltarea microtubercuilor*

Recoltarea se face separat, în funcție de soi, clonă, iar microtuberculii din fiecare cutie sunt calibrați cu ajutorul sitelor cu orificii de diferite dimensiuni.

Caracteristicile tehnice ale microtuberculilor obținuți prin procedeul clasic:

- tuberculi mici (3...5...9 mm);
- greutate 0,05...0,2...0,5 g;
- timp de obținere a microtuberculilor pornind de la meristem: aproximativ 16...18 luni;
- repaus vegetativ 6...8 luni, în funcție de soi;
- deshidratare puternică pe timpul perioadei de vegetație, din cauza greutății foarte mici, deci pierderi destul de mari pe timpul păstrării (30%).

WO 2010/076954 A2 se referă la un procedeu pentru producerea materialului săditor liber de virusuri, prin propagarea masivă a microtuberculilor de cartofi, prin dezvoltare sterilă într-un bioreactor de cultură care conține mediu de cultură lichid MS într-o cantitate redusă de la 1/2 la 1/4 din valoarea acestuia, creșterea în mediul MS de cultură lichid folosit, realizându-se de 1...2 ori, și într-un loc întunecos. Între 7 și 20 de microtuberculi de cartofi cu tulpinile cu o lungime de 3...5 cm, fără germeni de cultură tisulară, sunt crescuți la 2...5 cm semănați pe 10 cm³ pe un pat germinativ umplut cu sol la o adâncime de 3...6 cm. Cartofii de 5 g sau mai mari sunt folosiți ca material săditor pentru ferme, și cartofii mai mici de 5 g sunt semănați pe patul de însămânțare, pentru a produce cartofi de sămânță. Cartofii de sămânță obținuți prin prezenta invenție sunt capabili de depozitare convenabilă, și au avantajul de a fi liberi de virusuri.

US 7906703 B2 prezintă un procedeu de producere în masă a răsadurilor de cartofi, care cuprinde colectarea punctelor de creștere de cartofi de sămânță, și cultivarea punctelor de creștere într-un mediu lichid sau solid, introducerea plantulelor obținute din cultura punctelor de creștere în în cultură solidă *in vitro*, și eliminarea plantulelor din cultura solidă *in vitro* și plantare prin tăierea tulpinilor și climatizarea plantulelor *in vitro* în cultură în flux, în care soluția nutritivă se recirculă. Atunci când plantulele cultivate *in vitro* sunt plantate în DSCAC, prin tăierea tulpinilor, iar mugurele terminal și mugurii laterali ai plantulelor sunt căliți prin creștere gradată a nivelului de lumină de la întuneric, până când plantulele au frunze de un verde închis sănătos și o acumulare mare de carbohidrați, se obțin astfel răsaduri de cartofi cu tulpini lungi, la care apar noduri robuste, dar nu prea mari, elastice și scurte. La plantarea în instalațiile hidroponice, aceste răsaduri de cartofi au mare adaptabilitate la mediul extern și, astfel, rapid și uniform pot genera rădăcini într-un timp scurt. Ancorarea rapidă a rădăcinii previne răsadurile de ofilire, ceea ce duce la moarte, creșterea slabă și altele asemenea. Plantarea directă a plantulelor *in vitro*, prin tăierea tulpinilor, fără un proces de aclimatizare separat, scurtează perioada totală de producție de material săditor de cartofi, prin omiterea procesului de aclimatizare.

Problema tehnică pe care urmărește să o rezolve invenția constă în reducerea timpului de producere a microtuberculilor de cartof *in vitro*, cât și obținerea de microtuberculi mai mari atât ca dimensiune, cât și ca greutate.

Procedeul de obținere a microtuberculilor de cartof *in vitro*, mai mari de 10 mm și mai mari de 1 g, conform invenției, constă în aceea că din colți de cartof sănătoși, inoculați pe mediu nutritiv de creștere și înrădăcinare, MS 1962, în camera de creștere, se obțin, după 3...4 săptămâni, plantule de 5...6 cm, care se supun microbutășirii; fiecare microbutăș este apoi inoculat în mediu MS 1962, aditivat cu acid alfa-naftil acetic și solidificat cu agar-agar; după 3...4 săptămâni, din microbutășii se formează o plantulă nouă, de 5...7 cm, care se secționează în minibutași, operația repetându-se de câte ori este nevoie, cu un coeficient de multiplicare, la fiecare 3...4 săptămâni, de 4...5 ori; minibutașii rezultați se utilizează pentru producerea de microtuberculi, prin cultivarea acestora pe un mediu de bază solid MS1962,

RO 128694 B1

specific fazei de creștere și înrădăcinare; plantulele de 4...5 cm rezultate se inoculează apoi	1
orizontal, câte 4...5/cutie, în același mediu; după 3...4 săptămâni, noilor plantule dezvoltate	3
din fiecare internod li se adaugă mediu de tuberizare, ce conține kinetină, cumarină și	5
zaharoză, în concentrație de 80...90 g/l și, după 6...8 săptămâni, se recoltează microtuberculi	
mai mari de 10 mm și mai mari de 1 g.	5
Avantajele producerii de microtuberculi >10mm și >1 g prin procedeul conform	
invenției sunt următoarele caracteristici tehnice:	7
- tuberculi mari (10...15...20 mm);	
- greutate 0,5...2,6;	9
- timp de obținere a microtubercuilor pornind de la colț de carof sănătos: 6...8 luni;	
- repaus vegetativ 6...8 luni, în funcție de soi;	11
- pierderile pe timpul repausului sunt mult mai mici (2%);	
- plantați în tunel, produc tuberculi normali.	13
Se dă, în continuare, un exemplu de realizare a invenției, în legătură și cu fig. 1...3,	
ce reprezintă:	15
- fig. 1, microtuberculi recoltați și sortați, obținuți prin procedeul clasic;	
- fig. 2, microtuberculi recoltați mai mari de 10 mm, obținuți prin procedeul conform	17
invenției;	
- fig. 3, microtubercul recoltat mai mare de 1 g, obținut prin procedeul conform	19
invenției;	
- fig. 4, schema de obținere a microtubercuilor de cartof <i>in vitro</i> , mai mari de 10 mm	21
și mai mari de 1 g, conform invenției.	23
<i>Procedeul de obținere a microtubercuilor de cartof in vitro, mai mari de 10 mm și mai</i>	
<i>mari de 1 g, conform invenției</i>	25
1. Obținerea materialului inițial liber de virusuri, utilizând colții de cartof	
În noul procedeu de producere de microtuberculi <i>in vitro</i> , punctul de plecare îl	27
constituie colțul de cartof obținut din tuberculi testați inițial prin testul DAS ELISA (Doble	29
Antibody Sandwich ELISA), care sunt detașați, dezinfectați și introduși în mediul de cultură	
de creștere și înrădăcinare, utilizat la cartof, Murashige-Skoog (MS 1962). Culturile sunt apoi	31
transferate în camera de creștere, fiind expuse unui regim de lumină de 4000 lucși, cu o	
fotoperioadă de 16 h lumină, 8 h întuneric, la o temperatură de 22°C ± 2°C ziua, și 18...20°C	33
± 2°C noaptea. După aproximativ 3...4 săptămâni, colții formează plantule bine dezvoltate,	
de 5...6 cm, care sunt supuse microbutășirii.	
Fiecare minibutaș este inoculat apoi într-un mediu nutritiv de cultură, Murashige-Skoog	35
(MS 1962), cu un adaos de acid alfanafilacetic (ANA) în concentrație de 0,5 mg/l, pentru	
stimularea creșterii și înrădăcinării. Mediul a fost solidificat cu 0,7% Agar-Agar, iar pH-ul a	37
fost ajustat la 5,8 cu KOH înainte de autoclavare. Sterilizarea recipientelor cu mediu a fost	39
făcută la 120°C, timp de 25 min. După inocularea minibutașilor, operație efectuată în incinta	
hotei cu flux laminar steril, eprubetele sunt plasate în camera de creștere în aceleași condiții	41
de temperatură și lumină ca la faza de creștere a culturii. După aproximativ 3...4 săptămâni,	
s-a dezvoltat și a generat o nouă plantulă de circa 5...7 cm, care a fost secționată din nou,	43
nod per nod, în minibutași. Fenomenul se repetă ori de câte ori este nevoie. Mediul de cultură	
utilizat a facilitat, de fiecare dată, regenerarea din mugurele prezent la nivelul nodului, respectiv,	45
la axila fiecărei frunzulițe (meristeme axilare), o plantulă completă, cu o tulpiniță bine conformată	
și cu multe rădăcinuțe. Coeficientul de multiplicare este în jur de 4...5 la fiecare 3...4 săptămâni.	

2. *Înființarea culturii in vitro pentru obținerea de microtuberculi in vitro*

Punctul de plecare în producerea microtuberculilor sunt plantulele crescute *in vitro* din segmente uninodale (microbutași) de cartof, ce sunt cultivate într-un mediu de bază solid M&S (Murashige-Skoog, 1962), specific fazei de creștere și înrădăcinare. Aceste plantule dezvoltate, de 4...5 cm înălțime, se inoculează apoi orizontal, câte 4...5/cutie, în același mediul MS de creștere și înrădăcinare. După 3...4 săptămâni, din fiecare internod se vor dezvolta noi plantule, peste care se adaugă 40 ml mediu de microtuberizare lichid, ce conține aceleași substanțe ca și mediul MS de creștere și înrădăcinare, dar cantitatea de soluție stoc este redusă la jumătate, fiind completată cu kinetină, cumarină și zaharoză în concentrație de 80...90 g/l. Microtuberizarea are loc la întuneric, temperatura fiind de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

3. *Recoltarea microtuberculilor*

După aproximativ 6...8 săptămâni, în funcție de genotip, se recoltează microtuberculii și se calibrează (>10; 7,1; 5 mm) și se cântăresc. Noua metodă produce cea mai mare cantitate de microtuberculi >10 mm (fig. 2) și >1 g (fig. 3).

RO 128694 B1

Revendicare

1

Procedeu de obținere a microtuberculilor de cartof *in vitro*, mai mari de 10 mm și mai mari de 1 g, **caracterizat prin aceea că** din colți de cartofi sănătoși, inoculați pe mediu nutritiv de creștere și înrădăcinare, MS 1962, în camera de creștere, se obțin, după 3...4 săptămâni, plantule de 5...6 cm, care se supun microbutășirii; fiecare microbutaș este apoi inoculat în mediu MS 1962, aditivat cu acid alfanaftil acetic și solidificat cu agar-agar; după 3...4 săptămâni, din microbutași se formează o plantulă nouă, de 5...7 cm, care se secționează în minibutași, operația repetându-se de câte ori este nevoie, cu un coeficient de multiplicare, la fiecare 3...4 săptămâni, de 4...5 ori; minibutașii rezultați se utilizează pentru producerea de microtuberculi, prin cultivarea acestora pe un mediu de bază solid MS1962, specific fazei de creștere și înrădăcinare; plantulele de 4...5 cm rezultate se inoculează apoi orizontal, câte 4...5/cutie, în același mediu; după 3...4 săptămâni, noilor plantule dezvoltate din fiecare internod li se adaugă mediu de tuberizare, ce conține kinetină, cumarină și zaharoză, în concentrație de 80...90 g/l, și, după 6...8 săptămâni, se recoltează microtuberculi mai mari de 10 mm și mai mari de 1 g.

(51) Int.Cl.

A01H 4/00 (2006.01),

A01H 5/06 (2006.01)

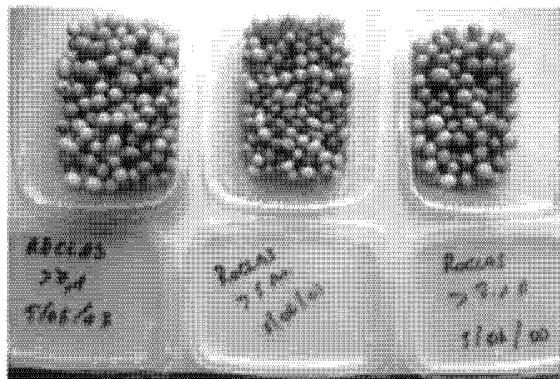


Fig. 1

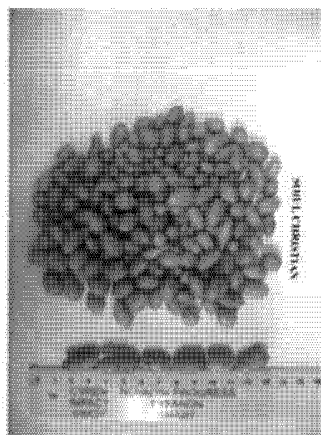


Fig. 2



Fig. 3

(51) Int.Cl.

A01H 4/00 (2006.01),

A01H 5/06 (2006.01)

Tehnologia producerii microtuberculilor *in vitro* > 10 mm și > 1 g

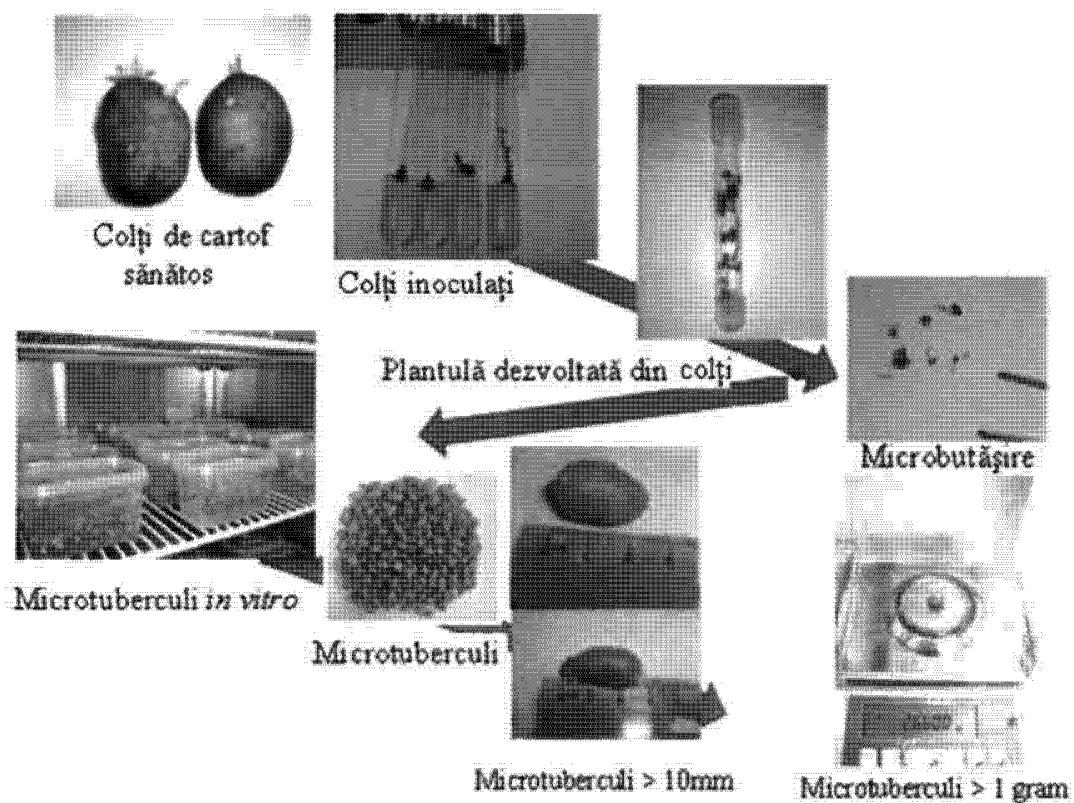


Fig. 4



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
 Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
 sub comanda nr. 580/2016