



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

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

(22) Data de depozit: **14.02.2012**

(41) Data publicării cererii:

30.08.2013

BOPI nr. **8/2013**

(71) Solicitant:

• 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

(54) **TEHNOLOGIE MODERNIZATĂ, PENTRU OBTINEREA
MICROTUBERCULILOR DE CARTOF *IN VITRO*, MAI MARI DE
10 MM ȘI MAI MARI DE 1 G**

(57) Rezumat:

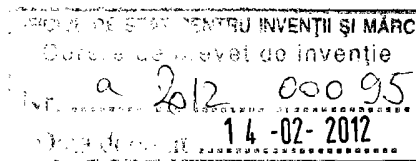
Prezenta invenție se referă la o nouă tehnologie, pentru obținerea *in vitro* a microtubercuilor de cartof pentru sămânță, din colți de cartof sănătoși, inoculați pe mediu nutritiv de creștere și înrădăcinare, MS 1962, din care, în camera de creștere, se obțin, după 3-4 săptămâni, plantule de 5-6 cm, care se supun microbutășirii. Fiecare microbutaș este apoi inoculat în mediu MS 1962, aditivat cu acid alfanafil acetic și solidificat cu agar-agar. După 3-4 săptămâni, din microbutași, se formează o plantulă nouă, de 5-7 cm. Aceasta 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. La 6-8 săptămâni, se recoltează microtuberculi, rezultând cea mai mare cantitate de microtuberculi >10 mm și >1 g.

Revendicări: 3



DESCRIERE



TEHNOLOGIE MODERNIZATĂ PENTRU OBȚINEREA MICROTUBERCULILOR DE CARTOF *IN VITRO* >10mm ȘI >1g

În țara noastră există o problemă destul de dificilă în programul național de producere de cartof pentru sămânță datorită presiunii mari de infecție, problemă ce poate fi depășită prin utilizarea înmulțirii *in vitro* a cartofului. Rezolvarea constă în obținerea unui material inițial corespunzător din punct de vedere fitosanitar, în menținerea libere de virusuri a noilor genotipuri create precum și în micropropagarea rapidă a celor mai valoroase creații.

Soiul, ca resursă biologică, constituie unul din cei mai importanți factori în realizarea 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 agenților patogeni, modificarea condițiilor tehnice și economice, cerințele pieții, constituie elemente principale în menținerea în producție un timp mai lung sau mai scurt.

În România se cultivă peste 200.000 ha cu cartof, fiind considerată cultură de importanță națională. La cartof, calitatea materialului de plantare este factorul esențial care determină calitatea și cantitatea recoltelor obținute, fiind cunoscut faptul că producția de cartof este determinată în procent de peste 50 % de calitatea materialului de plantare. Producerea cartofului pentru sămânță reprezintă o activitate științifică complexă, laborioasă, care necesită o preocupare mai mare decât producerea materialului semincer la culturile cu înmulțire prin sămânță adevărată, datorită în principal următoarelor cauze:

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

ridicate.

Sistemul național pentru producerea și înmulțirea cartofului de sămânță a fost organizat în 1966. Schema aplicată este de 9 - 10 ani. Necesitatea îmbunătățirii cartofului pentru sămânță impune trecerea la o nouă schemă de producere a materialului de plantare prin introducerea culturilor de țesuturi *in vitro* și a tehnicii de diagnosticare ELISA, prin producerea microtubercuilor *in vitro*, institutul fiind singura unitate din țară care poate asigura necesarul cu cartof de sămânță din soiurile românești.

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 față de metoda clasică, și în același timp se elimină o serie de lucrări adiacente, create de necesitatea menținerii unui stoc de material biologic reproductiv sănătos și care se utilizează în mod obișnuit în sistemul clasic.

PRODUCEREA DE MICROTUBERCULI IN VITRO

I. METODA CLASICĂ

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

Pentru inițierea culturii de meristeme, tuberculii de cartof luati în studiu (câte 10 tuberculi 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 cca. 2-3 cm, sunt detașați, dezinfectați 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 ore lumină, 8 ore 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 (funcție de soi 6-8 luni).

2. Multiplicarea "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, Murashige-Skoog (MS 1962) cu un adăug 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' minute. 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 (funcție de genotip) fiecare genotip s-a dezvoltat și a generat o nouă plantulă de cca. 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 multiplicare 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 vitro plantele 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 din virusurile PVX, PVY, PVM, PVS, PVA și virusul FORM. B 01 - cititi Ghidul de completare

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 multiplicare, adică minibutașii ce sunt inoculați în mediul de creștere și înradacinare 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 înradacinare, dar cantitatea de soluție stoc este redusă la jumătate, fiind completat cu Kinetină, Cumarină și zaharoză în concentrație de 80-90 g/l.

Mediul de microtuberizare nu conține agar sau alți agenți gelifianți. 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 $20 \pm 2^\circ\text{C}$.

5.Recoltarea microtubercuilor

Recoltarea se face separat, în funcție de soi, clonă iar microtubercuilii din fiecare cutie sunt calibrați cu ajutorul a patru site cu orificiile de diferite dimensiuni (10; 7,1; 5; 3,15 mm) (Fig.1).

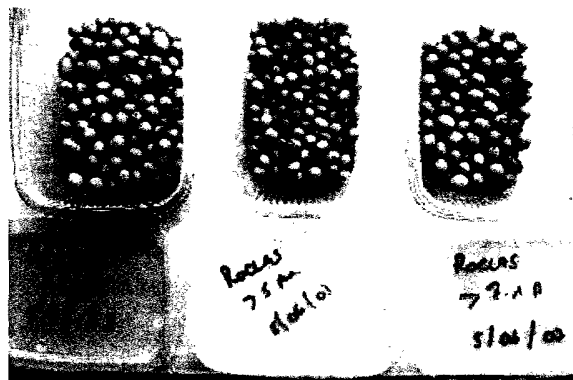


Fig.1 Microtuberculi recoltați și sortați

II. METODA MODERNIZATĂ DE PRODUCERE MICROTUBERCULI IN VITRO >10mm ȘI >1g

III.

1. Obținerea materialului inițial liber de virusuri utilizând coltii de cartof

În noua metodă de producere de microtuberculi *in vitro*, punctul de plecare îl constituie colțul de cartof obținut din tuberculi testați inițial prin testul DAS ELISA (Doble Antibody Sandwich ELISA), care sunt detașați, dezinfectați și introduși în mediul de cultură de creștere și înradacinare, utilizat la cartof, Murashige-Skoog (MS 1962). Culturile sunt apoi transferate în camera de creștere, fiind expuse unui regim de lumină de 4000 lux, cu o fotoperioadă de 16 ore lumină, 8 ore întuneric, la o temperatură de $22^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ ziua, și $18-20^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ noaptea. După aproximativ 3-4 săptămâni, colții formează plantule bine dezvoltate de 5-6 cm care sunt supuse

microbutasirii.

Fiecare minibutașii este inoculat apoi într-un mediu nutritiv de cultură, Murashighe–Skoog (MS 1962) cu un adaus de acid alfanaftilacetic (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' minute. 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 creștere a culturii. După aproximativ 3-4 săptămâni s-a dezvoltat și a generat o nouă plantulă de cca. 5-7 cm, care au fost secționată 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 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 microtubercuilor în aceasta noua metoda sunt plantulele crescute *in vitro* din segmente uninodale (microbutași) de cartof ce sunt cultivate într-un mediu de bază solid M&S (Murashighe-Skoog, 1962), specific fazei de creștere și înrădăcinare. Aceste plantule dezvoltate, de 4-5 cm înaltime se inoculează apoi orizontal, câte 4-5/cutie, în același mediu MS de creștere și înradăcinare. După 3-4 săptămâni din fiecare internod se vor dezvolta noi plantule, peste care se adaugă 40 ml mediul de microtuberizare lichid, ce conține aceleași substanțe ca și mediul MS de creștere și înradăcinare, dar cantitatea de soluție stoc este redusă la jumătate, fiind completat cu Kinetină, Cumarină și zaharoză în concentrație de 80-90 g/l. Microtuberizarea are loc la întuneric, temperatura fiind de 20±2°C.

3.Recoltarea microtubercuilor

Dupa aproximativ 6-8 saptamani, functie de genotip se recolteaza microtubercuii si se calibreaza (>10; 7,1; 5 mm) si se cantaresc. Noua metoda produce cea mai mare cantitate de microtuberculi >10mm (Fig.2) si >1g. (Fig.3).

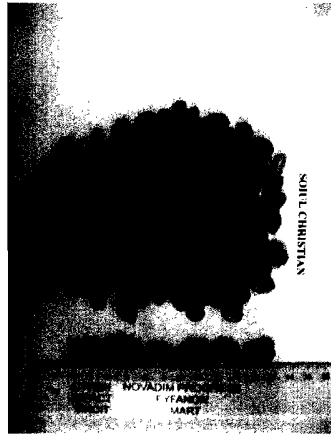


Fig.2 Microtuberculi >10mm



Fig.3 Microtuberculi >1g

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

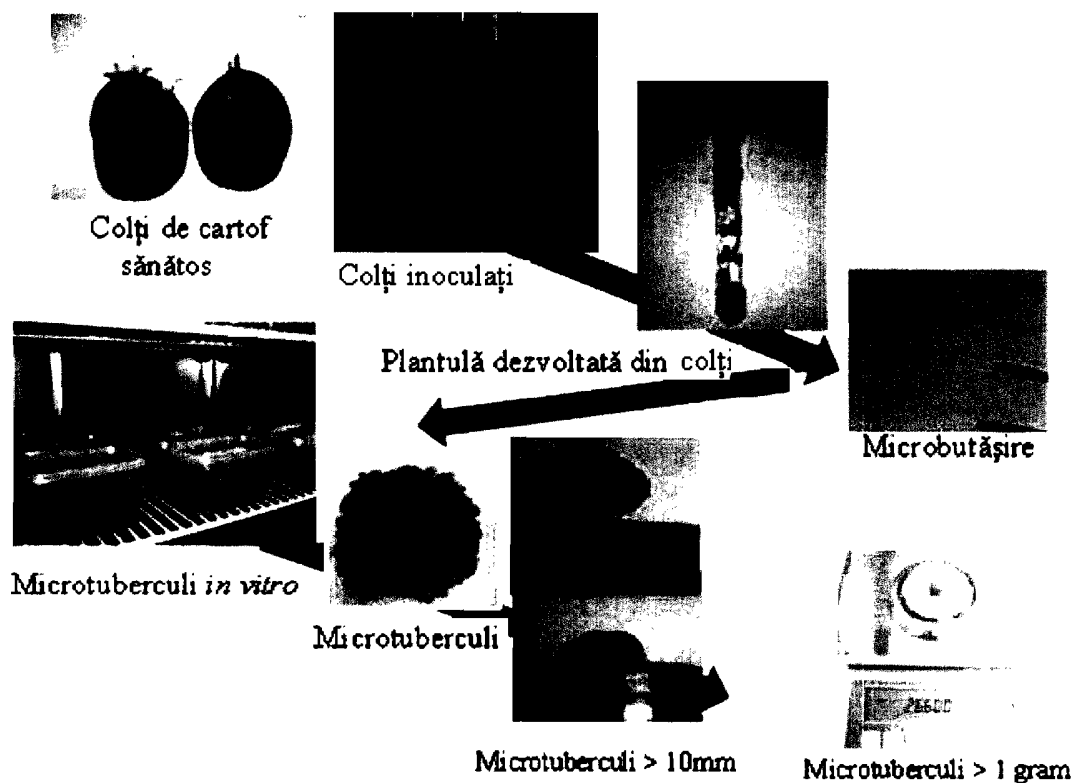


Fig.4 Schema modificata de producere microtubercuilor *in vitro* >10mm si >1g

III. Avantajele producerii de microtuberculi >10mm si >1g prin noua metoda

Caracteristicile tehnice ale microtubercuilor:

Metoda clasica

- tuberculi mici(3-5-9 mm);
- greutate 0,05-0,2-0,5 g;
- **timp de obtinere a microtubercuilor pornind de la meristem: aproximativ 16-18 luni**
- repaus vegetativ 6-8 luni funcție de soi;
- deshidratare puternica pe timpul perioadei de vegetatie datorita greutatii foarte mici, deci pierderi destul de mari pe timpul pastrarii (30%).

Metoda noua:

- tuberculi mari (10-15-20 mm);
- greutate 0,5- 2,6 ;
- **timp de obtinere a microtubercuilor pornind de la colt de carof sanatos: 6-8 luni**
- repaus vegetativ 6-8 luni funcție de soi;
- pierderile pe timpul repausului sunt mult mai mici (2%)
- plantați în tunel produc tuberculi normali.

Dr.ing. Nicoleta CHIRU

Dr.ing. Andreea Marinela NISTOR

Dr.ing. Sorin Claudiu CHIRU

Director General INCDCSZ Brasov

Dr.ing. Sorin Claudiu CHIRU

REVENDICARE DE METODĂ

METODA DE OBTINERE A MCROTUBERCULILOR DE CARTOF *IN VITRO* >10mm SI >1G

ETAPELE METODEI

Etapele metodei sunt identice cu cele folosite pentru producerea microtubercuilor *in vitro*. Elementul de noutate îl constituie:

- înlocuirea explantelor meristematice folosite până în prezent cu prelevarea de colți din tuberculi de cartof sanatosi, testati si păstrați în anumite condiții;
- inocularea de plantule bine dezvoltate, de 4-5 cm , in pozitie orizontala in mediul MS de crestere și înradacinare.

Principalele etape ale metodei sunt:

1. Obținerea materialului inițial liber de virusuri utilizând coltii de cartof

În noua metoda de producere de microtuberculi *in vitro*, punctul de plecare îl constituie colțul de cartof obținut din tuberculi testati initial prin testul DAS ELISA (Double Antibody Sandwich ELISA), care sunt detașați, dezinfectați și introdusi în mediul de cultură de crestere și înradacinare, utilizat la cartof, Murashige-Skoog (MS 1962). Culturile, sunt apoi transferate în camera de creștere , fiind expuse unui regim de lumină de 4000 lucși, cu o fotoperioadă de 16 ore lumină, 8 ore întuneric, la o temperatură de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ziua, și $18-20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ noaptea. După aproximativ 3-4 săptămâni, colții formează plantule bine dezvoltate de 5-6 cm care sunt supuse microbutasirii (multiplicării).

Fiecare minibutașii este inoculat apoi într-un mediu nutritiv de cultură, Murashige-Skoog (MS 1962) cu un adaus 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' minute. 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 crestere a culturii. După aproximativ 3-4 săptămâni s-a dezvoltat și a generat o nouă plantulă de cca. 5-7 cm, care 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 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 în această nouă metodă 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 mediu MS de creștere și înrădăcinare. După 3-4 săptămâni din fiecare internod se vor dezvolta noi plantule, peste care se adaugă 40 ml mediul 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 completat 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, 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 $>10\text{mm}$ și $>1\text{g}$.

REZULTATE OBȚINUTE

Noutatea propunerii se concretizează prin adaptarea unei metode mai rentabile din punct de vedere economic comparativ cu cea folosită datorită producerii într-un timp mai scurt de microtuberculi $>10\text{mm}$ și $>1\text{g}$.

Utilizarea noii metode a determinat o reducere cu 50% a timpului de producere a microtuberculilor *in vitro*, a obținerii de microtuberculi mai mari atât ca dimensiune cât și ca greutate și deci pierderile pe timpul repausului sunt mult mai mici (2%) comparativ cu metoda clasică unde pierderile pot ajunge până la 30% datorită deshidratării.

Dr.ing. Nicoleta CHIRU

Dr.ing. Andreea Marinela NISTOR

Dr.ing. Sorin Claudiu CHIRU

Director General INCDCSZ Brasov

Dr.ing. Sorin Claudiu CHIRU