

MD 847 Z 2015.07.31

REPUBLICA MOLDOVA



**(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală**

(11) **847** (13) **Z**
 (51) Int.Cl: *A01H 4/00* (2006.01)
A01G 17/02 (2006.01)
C12Q 1/70 (2006.01)
C12R 1/94 (2006.01)

**(12) BREVET DE INVENȚIE
DE SCURTĂ DURATĂ**

(21) Nr. depozit: s 2014 0052 (22) Data depozit: 2014.04.18	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2014.12.31, BOPI nr. 12/2014
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE GENETICĂ, FIZIOLOGIE ȘI PROTECȚIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD (72) Inventatori: SMEREA Svetlana, MD; ANDRONIC Larisa, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE GENETICĂ, FIZIOLOGIE ȘI PROTECȚIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	

(54) Procedeu de obținere a plantelor de viță-de-vie libere de virusul răsucirii frunzelor

(57) Rezumat:

Invenția se referă la biotehnologie și poate fi utilizată în agricultură pentru obținerea plantelor de viță-de-vie libere de virusul răsucirii frunzelor.

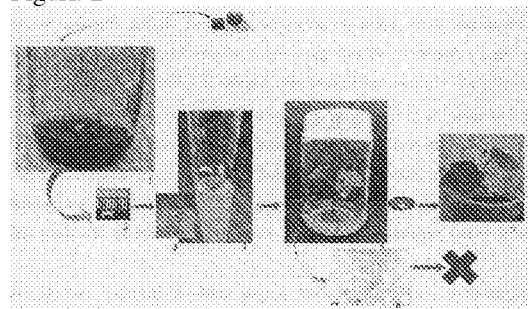
Procedeeul, conform invenției, constă în cultivarea *in vitro* a embrionilor imaturi obținuți de la genitori de viță-de-vie apireni și combinații hibride ale acestora, colectarea ciorchinilor după 30...45 zile de postanteză, pretratarea la temperatura de 4°C, sterilizarea cu alcool etilic și soluție de hipoclorit de sodiu, excizarea semințelor imature și inocularea pe un mediu nutritiv, cultivarea la întuneric la o temperatură de 25±2°C timp de 30 zile, iar ulterior la aceeași temperatură, cu un fotoperiodism de 16 ore lumină, 8 ore întuneric și iluminare de 2000 lx, apoi embrionii viabili se transferă pe un mediu nutritiv, plantulele

2

formate sunt supuse unui control virusologic și cele libere de virus se transferă în substrat de sol și turbă.

Revendicări: 1

Figuri: 2



(54) Process for producing leafroll virus-free grapevine plants

(57) Abstract:

1
The invention relates to biotechnology and can be used in agriculture for producing leafroll virus-free grapevine plants.

The process, according to the invention, comprises *in vitro* cultivation of immature embryos produced from stoneless grapevine parent forms and hybrid combinations thereof, vintage of bunches of grapes in 30...45 days after pollination, treatment at 4°C, sterilization with ethyl alcohol and sodium hypochlorite solution, separation of immature seeds and inoculation into a nutrient medium, cultivation

2
in the dark at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ for 30 days, then at the same temperature, with a photoperiodism of 16 hours light, 8 hours darkness and illumination of 2000 lx, then the viable embryos are transferred to a nutrient medium, the formed plantlets are subjected to a virological control and the virus-free plantlets are transferred to soil and peat substrate.

Claims: 1

Fig.: 2

(54) Способ получения растений винограда свободных от вируса скручивания листьев

(57) Реферат:

1
Изобретение относится к биотехнологии и может быть использовано в сельском хозяйстве для получения растений винограда свободных от вируса скручивания листьев.

Способ, согласно изобретению, включает культивирование *in vitro* незрелых зародышей, полученных от безкосточковых родительских форм винограда и их гибридных комбинаций, сбор гроздей через 30...45 дней после опыления, обработку при температуре 4°C, стерилизацию этиловым спиртом и раствором гипохлорита натрия, извлечение незрелых семян и инокулирование в

2
питательную среду, культивирование в темноте при температуре $25 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 30 дней, затем при той же температуре, с фотопериодизмом 16 часов свет, 8 часов темнота и освещённости в 2000 люкс, затем жизнеспособные зародыши переносят на питательную среду, образовавшиеся ростки подвергают вирусологическому контролю и свободные от вирусов ростки переносят на субстрат из почвы и торфа.

П. формулы: 1

Фиг.: 2

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie și poate fi utilizată în agricultură pentru obținerea plantelor de viță-de-vie libere de virusul răsucirii frunzelor.

- 5 Strategia generală de obținere a materialului liber de infecție cuprinde metode ale culturii *in vitro* a meristemelor, aprobate și aplicate pe larg în eradicarea germenilor virali. Un procedeu inovativ în această direcție se propune a fi embriogeneza directă, ce are drept model regenerarea plantelor sănătoase din embrioni proveniți prin încrucișări hibride, autopolenizări sau polenizări libere a genitorilor atacați de viroze. În același timp cultura *in vitro* a embrionilor imaturi este
- 10 unica metodă care permite obținerea formelor noi hibride cu antrenarea genitorilor apireni.

Este cunoscut procedeu de eradicare a virusurilor viței-de-vie, inclusiv virusul răsucirii frunzelor (serotip 1, grapevine leafroll-associated virus 1 - GLRaV-1), pe calea cultivării *in vitro* a meristemelor apicale [1].

- 15 Însă acest procedeu are și dezavantaje. În cazul utilizării meristemelor apicale cu dimensiunile de 0,5 mm, mărime a explantului ce asigură o eradicare mai înaltă (95%) a virusului, se induce și formarea de calus, ceea ce poate genera o variabilitate somaclonală. Prin utilizarea explantelor cu dimensiuni de 1mm se omite inițierea de calus, însă rata de plantule libere de virus este mai redusă (77,5%).

- 20 Problema pe care o rezolvă invenția constă în sporirea numărului de plante libere de germenii virali ai virusului GLRaV-1 complementar salvării embrionilor imaturi și recuperării de plantule sănătoase obținute din combinații hibride, autopolenizări sau polenizări libere a formelor cu diferit grad de apirenție.

- 25 Esența invenției constă în aceea că procedeul include cultivarea *in vitro* a embrionilor imaturi obținuți de la genitori de viță-de-vie apireni și combinații hibride ale acestora, colectarea ciorchinilor după 30...45 zile de postanteză, pretratarea la temperatura de 4°C pentru 10...12 zile, sterilizarea bobîțelor cu alcool etilic de 70% pentru 2...3 s, apoi în soluție de hipoclorit de sodiu de 5,2% timp de 15 min și clătirea în apă distilată sterilă, excizarea semințelor imature și inocularea pe mediul nutritiv Nitsch-Nitsch, suplimentat cu acid indolil acetic 1,5 mg/l, zeatină 1 mg/l, acid giberelic 0,2 mg/l și cărbune activat 2,5 g/l, cultivarea timp de 30 zile la întuneric la o temperatură
- 30 de 25±2°C, iar ulterior la aceeași temperatură, cu un fotoperiodism de 16 ore lumină, 8 ore întuneric și iluminare de 2000 lx, la a 10...15-a zi de la primele germinări embrionii viabili se transferă pe un mediu nutritiv, conținând ? de macro - microelemente, vitamine și un conținut integral de hormoni față de mediul Murashige-Skoog, suplimentat cu zaharoză 15 g/l, mio-inozitol 100 mg/l, glicină 3mg/l, benzilaminopurină 0,45 mg/l și agar 6,8 g/l, apoi plantulele formate se
- 35 transferă pe un mediu nutritiv conținând ? de macro - microelemente și vitamine față de mediul Murashige-Skoog, lipsit de hormoni, după care se efectuează controlul virusologic și transferul plantulelor libere de virus în substrat de sol și turbă în raport de 1:3.

- 40 Noutatea invenției constă în eradicarea virusurilor, în special a virusului răsucirii frunzelor (serotip 1) al viței-de-vie, pe calea cultivării *in vitro* a embrionilor imaturi, rezultați din încrucișări hibride, autopolenizări sau polenizări libere a formelor cu diferit grad de apirenție.

- Rezultatul invenției rezidă în eradicarea GLRaV-1 pe calea salvării embrionilor imaturi prin culturi *in vitro* și conversia acestora în plantule, ceea ce asigură soluționarea concomitentă a două probleme majore asociate producerii materialului inițial pentru ameliorare la genotipurile de tip stenospermocarpic: recuperarea embrionilor și obținerea populațiilor hibride de plante sănătoase
- 45 cu diferit grad de apirenție.

Exemplu de realizare a invenției

- Pentru eradicarea *in vitro* a virusului GLRaV-1 pe calea embriogenezei zigotice au fost selectate genotipuri de viță-de-vie de interes ameliorativ aflate în colecția Institutului Științifico-Practic de Horticultură și Tehnologii Alimentare, care au fost stabilite purtătoare de germenii
- 50 patogeni ai acestui virus. Conform rezultatelor testelor de diagnostic virusologic (contrastare negativă, imunoelectronic și imunoenzimatic) au fost selectați următorii genitori materni: Apiren roz Basarabean, Apiren extratimpuriu, Apiren negru de Grozești. În cercetare au fost utilizați embrioni imaturi obținuți din autopolenizări, polenizări libere, precum și din combinații hibride cu utilizarea acestor forme.

- 55 Ținând cont de obiectivele studiului au fost realizate următoarele scheme de încrucișări:

♀ sănătos x ♂ infectat
 ♀ infectat x ♂ sănătos
 ♀ infectat x ♂ infectat

autopolenizări, plantă infectată
polenizări libere, plantă infectată.

Procedeul, conform invenției, include cultivarea *in vitro* a embrionilor imaturi obținuți de la genitori de viță-de-vie apireni și combinații hibride ale acestora, colectarea ciorchinilor după 5 30...45 zile de postanteză, pretratarea la temperatura de 4°C pentru 10...12 zile, sterilizarea bobîțelor cu alcool etilic de 70% pentru 2...3 s, apoi în soluție de hipoclorit de sodiu de 5,2% timp de 15 min și clătirea în apă distilată sterilă, excizarea semințelor imature și inocularea pe mediul nutritiv Nitsch-Nitsch, suplimentat cu acid indolil acetic 1,5 mg/l, zeatină 1 mg/l, acid giberelic 0,2 mg/l și cărbune activat 2,5 g/l, cultivarea timp de 30 zile la întuneric la o temperatură de 25±2°C, 10 iar ulterior la aceeași temperatură, cu un fotoperiodism de 16 ore lumină, 8 ore întuneric și iluminare de 2000 lx, la a 10...15-a zi de la primele germinări embrionii viabili se transferă pe un mediu nutritiv, conținând ? de macro - microelemente, vitamine și un conținut integral de hormoni față de mediul Murashige-Skoog, suplimentat cu zaharoză 15 g/l, mio-inozitol 100 mg/l, glicină 3mg/l, benzilaminopurină 0,45 mg/l și agar 6,8 g/l, apoi plantulele formate se transferă pe un 15 mediu nutritiv conținând ? de macro- microelemente și vitamine față de mediul Murashige-Skoog, lipsit de hormoni, după care se efectuează controlul virusologic și transferul plantulelor libere de virus în substrat de sol și turbă în raport de 1:3.

Schema eradicării germenilor virali la viță-de-vie pe calea embriogenezei zigotice constă din: inocularea semințelor imature (1), desecarea semințelor (2), excizarea și transferul embrionilor 20 viabili pe mediul nutritiv de recuperare (3), obținerea regeneranților (4), subcultivarea regeneranților pe mediul de conversie (5), expertiza virusologică a regeneranților (6), adaptarea *ex vitro* și transferul plantulelor libere de virusuri în substrat de sol (7) (fig. 1).

Pentru identificarea eficienței procedurii propus de eradicare a virusului GLRaV-1 a fost aplicat paralel procedeul cunoscut de eliminare a germenilor virali pe calea cultivării *in vitro* a 25 meristemelor apicale cu dimensiunile de 1 mm. În acest scop de la tufele genitorilor materni și paterni, în perioada creșterii intensive (iunie-iulie), au fost preluați lăstări (6...10 cm), care au fost spălați în apă curgătoare timp de 10 min. Pentru aseptizare, fragmentele de lăstari au fost plasate pentru 10 s în etanol 70% și ulterior trecute în soluție de 1% (v/v) de hipoclorit de sodiu (20% Clorox) cu două picături de 0,1% Tween 20, apoi clătite în 3 băi de apă sterilă, a câte 5 minute 30 fiecare, pentru înlăturarea totală a clorului. Toate operațiunile de sterilizare a lăstarilor, precum și excizarea apexurilor cu mărimea de 1mm și inocularea lor pe medii de cultură s-au desfășurat în condiții aseptice, în interiorul hotei cu flux laminar de aer steril. Vitrocultura a fost inițiată în eprubete, conținând câte 2 ml de mediu nutritiv Murashige & Skoog (1962) suplimentat cu 6-benzilaminopurină (5 μM), acid naftalenacetic (0,5 μM), 3% zaharoză și 0,8% agar. Valoarea pH-ului mediului nutritiv a fost ajustată înainte de autoclavare la 5,7. Pentru inducerea regenerării 35 eprubetele au fost incubate în condiții controlate cu un fotoperiodism de 16 ore-lumină, temperatura de 25±2°C și iluminare de 2000 lx.

La 25...35 zile de la inoculare s-a atestat proliferarea și dezvoltarea regeneranților, care ulterior au fost transferați pe medii nutritive pentru multiplicare în vase Magenta ce conțineau 10...12 ml 40 mediu. Plantulele cu 3...4 internoduri rezultate din fiecare ciclu de subcultivare au fost transferate pe mediul pentru rizogeneză Murashige & Skoog (1962) suplimentat cu acid indolilbutiric (0,2 μM). La 6...7 zile după pasaj pe acest substrat regeneranții care prezentau un sistem radicular cu perișori absorbanți bine dezvoltați au fost transferați în vase de plastic de 500 ml cu amestec de sol:turbă (1:3). Vasele cu regeneranți au fost acoperite cu peliculă de polietilenă și transferate în 45 camera de cultivare la 25±2°C și cu un fotoperiodism de 16 ore-lumină.

Meristemele celor 3 genotipuri de viță-de-vie analizate au prezentat un potențial înalt de răspuns la condițiile *in vitro* de cultivare (tab.). În pofida cotei înalte a explantelor cu răspuns pozitiv și eficienței de inducere a regeneranților, numărul plantulelor stabilite libere de germeni virali a fost destul de redus, variind între 39,1% pentru Apiren extratimpuriu și 68,4% pentru 50 Apiren roz Basarabean. Totodată, s-a constatat că toți cei 23 de regeneranți derivați de la Apiren negru de Grozești s-au dovedit a fi purtători ai serotipului 1 al virusului GLRaV. Nereușita eradicării virale la genotipul dat poate fi cauzată atât de particularitățile soiului, cât și de starea fitosanitară gravă stabilită la plantele donatoare de explant (infecții mixte).

Rata de regenerare și cota de eradicare a GLRaV-1 prin culturi *in vitro* a meristemelor și embrionilor imaturi de viță-de-vie

Nr	Genotip	Numărul de explante inoculate	Numărul de explante cu răspuns pozitiv	Numărul de regeneranți obținuți	Numărul de plante libere de virus	Cota de plante libere de virus, %
Cultura <i>in vitro</i> a meristemelor						
1	Apiren roz Basarabean	32	28	19	13	68,42
2	Apiren negru de Grozești	44	38	23	-	-
3	Apiren extratimpuriu	47	46	23	9	39,13
	Total	123	112	65	22	35,85
Cultura <i>in vitro</i> a embrionilor imaturi						
	Genotipul formei materne	Numărul de embrioni inoculați	Numărul de embrioni viabili	Numărul de regeneranți obținuți	Numărul de plante libere de virus	Cota de plante libere de virus
1	Apiren roz Basarabean	688	162	181	181	100
2	Apiren negru de Grozești	1054	83	12	10	83,33
3	Apiren extratimpuriu	152	77	83	83	100
	Total	1894	322	276	274	94,44

5

Conform algoritmului invenției propuse au fost inoculați 1894 de embrioni imaturi pe medii de recuperare Nitsch-Nitsch (1969). La momentul desecării s-a determinat că cota embrionilor viabili a variat de la 7,9% (Apiren negru de Grozești) până la 50,7% (Apiren extratimpuriu) în funcție de genotip și starea lor fitosanitară. Gradul înalt de infectare a genotipului Apiren negru de Grozești cu agenți virali ai complexului degenerativ (în special infecții mixte) a contribuit la diminuarea viabilității embrionilor.

10

S-a stabilit că reacția embrionilor imaturi la cultivarea *in vitro* este determinată în mare măsură de genotip, de aceea reușita procedurii de convertire a embrionilor în plantule este direct dependentă de particularitățile genotipurilor antrenate. O altă trăsătură specifică atribuită genotipului este poliembrionia, fapt ce a dus la creșterea numărului de regeneranți comparativ cu numărul de embrioni viabili cultivați (de exemplu la soiurile Apiren extratimpuriu și Apiren roz Basarabean). Asemenea plantule reprezintă clone, iar inducerea lor sporește cota de recuperare și conversie în plantule.

15

Plantulele recuperate după aspect nu prezentau simptome vizuale specifice virozelor. De asemenea prin metode de diagnostic virologic a fost confirmată lipsa agenților virali. Eficiența eradicării virusului GLRaV-1 a fost identificată prin tehnica imunoenzimatică DAS-ELISA: A – aplicarea probelor biologice, B și C – rezultatul reacției cromatice de identificare a germenilor GLRV-1 în regeneranți obținuți prin cultura de meristeme (B) și a embrionilor imaturi (C) (fig.2).

20

A fost stabilită influența stării fitosanitare și particularităților combinației hibride de viță-de-vie asupra eficienței procedurii de salvare, recuperare și conversie a embrionilor imaturi în plantule. Infectarea formelor parentale cu serotipul 1 al GLRaV influențează mai puțin viabilitatea embrionilor.

25

Conform rezultatelor obținute, procedeul propus conform invenției permite eradicarea germenilor virali chiar și în cazul unor infecții duble sau triple, fapt constatat la genotipul Apiren negru de Grozești.

30

Expertiza virologică în baza testului DAS-ELISA a dovedit că salvarea embrionilor imaturi prin culturi *in vitro* și conversia acestora în plantule constituie un procedeu eficient ce asigură eradicarea GLRaV-1. Totodată procedeul propus permite soluționarea concomitentă a două probleme majore asociate producerii materialului inițial pentru ameliorare la genotipurile de tip

35

- 5 stenospermocarpic: recuperarea embrionilor și obținerea populațiilor hibride de plante sănătoase cu diferit grad de apirenție.

Plantele clone, stabilite sănătoase, urmează a fi multiplicare, pentru crearea plantelor-mamă sănătoase, precum și a formelor hibride de interes ameliorativ.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Fayek M.A., Jomaa A.H., Shalaby Abdel-Baset A., Al-Dhaheer Mohammad-Morshed A. Meristem tip culture for in vitro eradication of grapevine leafroll-associated virus-1 (GLRaV-1) and grapevine fan leaf virus (GFLV) from infected flame seedless grapevine plantlets. Ini. Inv., 2009, 4, p. 1-11

(57) Revendicări:

Procedeu de obținere a plantelor de viță-de-vie libere de virusul răsucirii frunzelor serotip 1, care include cultivarea *in vitro* a embrionilor imaturi obținuți de la genitori de viță-de-vie apireni și combinații hibride ale acestora, colectarea ciorchinilor după 30...45 zile de postanteză, pretratarea la temperatura de 4°C pentru 10...12 zile, sterilizarea bobitelor cu alcool etilic de 70% pentru 2...3 s, apoi în soluție de hipoclorit de sodiu de 5,2% timp de 15 min și clătirea în apă distilată sterilă, excizarea semințelor imature și inocularea pe mediul nutritiv Nitsch-Nitsch, suplimentat cu acid indolil acetic 1,5 mg/l, zeatină 1 mg/l, acid giberelic 0,2 mg/l și cărbune activat 2,5 g/l, cultivarea timp de 30 zile la întuneric la o temperatură de 25±2°C, iar ulterior la aceeași temperatură, cu un fotoperiodism de 16 ore lumină, 8 ore întuneric și iluminare de 2000 lx, la a 10...15-a zi de la primele germinări embrionii viabili se transferă pe un mediu nutritiv, conținând ? de macro - microelemente și vitamine și un conținut integral de hormoni față de mediul Murashige-Skoog, suplimentat cu zaharoză 15 g/l, mio-inozitol 100 mg/l, glicină 3mg/l, benzilaminopurină 0,45 mg/l și agar 6,8 g/l, apoi plantulele formate se transferă pe un mediu nutritiv conținând ? de macro - microelemente și vitamine față de mediul Murashige-Skoog, lipsit de hormoni, după care se efectuează controlul virusologic și transferul plantulelor libere de virus în substrat de sol și turbă în raport de 1:3.

Director Departament:

GUȘAN Ala

Șef Secție:

IUSTIN Viorel

Examinator:

LUPAȘCU Lucian

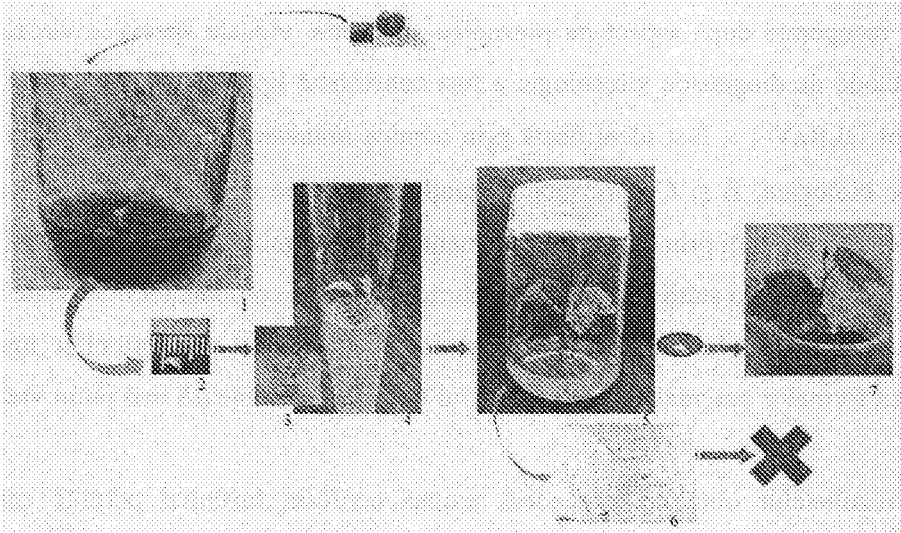


Fig. 1

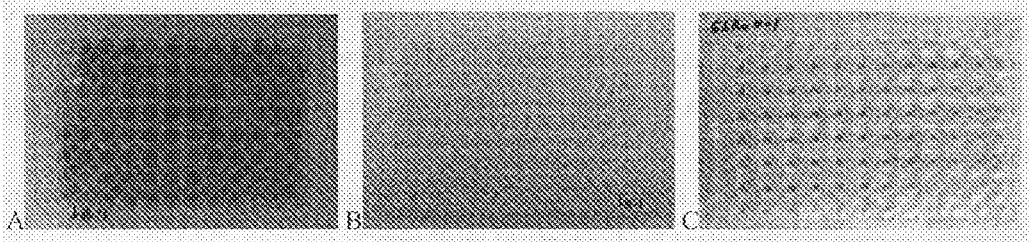


Fig. 2

RAPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii

(21) Nr. depozit: s 2014 0052

(22) Data depozit: 2014.04.18

(71) Solicitant: **INSTITUTUL DE GENETICĂ, FIZIOLOGIE ȘI PROTECȚIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD**

(54) **Titlul: Procedeu de eradicare a virusului răsucirii frunzelor (serotip 1) la vița- de-vie**

II. Clasificarea obiectului invenției:

(51) **Int.Cl:** *A01H 4/00* (2006.01)
A01G 17/02 (2006.01)
C12Q 1/70 (2006.01)
C12R 1/94 (2006.01)

III. Colecții și Baze de date de brevete cercetate (denumirea, termeni caracteristici, ecuații de căutare reprezentative)

MD - Intern « Documentare Invenții » (inclusiv cereri nepublicate; trunchiere automată stanga/dreapta) : **”virusul răsucirii frunzelor”**

Int. Cl: *A01H 1/04* (2006.01), *A01G 17/02* (2006.01), *C12Q 1/70* (2006.01), *C12R 1/94* (2006.01)

EA, CIS (Еаратис): ”вирус скручивания листьев”

Int. Cl: *A01H 1/04* (2006.01), *A01G 17/02* (2006.01), *C12Q 1/70* (2006.01), *C12R 1/94* (2006.01)

SU (nonpublic): ”вирус скручивания листьев”

Int. Cl: *A01H 1/04* (2006.01), *A01G 17/02* (2006.01), *C12Q 1/70* (2006.01), *C12R 1/94* (2006.01)

IV. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate

Andronic L., Smerea S., Grigorov T. Direct somatic embryogenesis as possible way of virus elimination from seedless grapevine. Proceeding materials of International Conference “A New Approach of the Academic Research in Biology”. December 2012, Bucharest, p.127-128.

Smerea S. The contribution of biotechnological processes in the zygotic progeny obtaining from immature embryos of seedless grapevine varieties in Moldova: present and perspectives. Second Balkan Symposium on Fruit Growing September 2011, Pitesti, Romania, p.26-27.

Smerea S., Andronic L. Application of thermotherapy and meristem culture for eliminating of the harmful viruses in grapevine. Second Balkan Symposium on Fruit Growing September 2011, Pitesti, Romania, p.60-61.

Andronic L. Virus free grapevine plantlets production. 2011.

http://www.stcu.int/documents/reports/distribution/tpf/Bio/Virus_free_grapevine_plantlets_products_on_EN.pdf

Smerea S., Andronic L., Grigorov T., Bujoreanu V. In vitro regenerative genotypic specificity of meristems from virus infected grapevine cultivars. Rom. Biotech. Let., 2010, 15(2), 19-25.

Chiriac Gh., Smerea S., Savin Gh. The ways of conversion of immature embryos into plants for seedless stenospermocarpic grapevine. *Lucrări Științifice, seria Horticultură, Anul LII (52), 2009*, Editura "Ion Ionescu de la Brad", Iași. p.43-48.

Chiriac Gh., Smerea S., Savin Gh. Cultivarea *in vitro* a embrionilor a embrionilor imaturi la vița de vie apirenă. Probleme actuale ale geneticii, fiziologiei și ameliorării plantelor, Tipografia Centrală, Chișinău, p. 46-51

Chiriac Gh., Smerea S., Bujoreanu V., Terteac D. Identificarea virusului scurt-nodării în plantele obținute din embrionii imaturi a soiului Apiren alb. *Lucrări științifice "Realizări inovative în domeniul vitivinicol"*. Ediție special a Conferinței Internaționale consacrate m.c. AȘM. P.Ungurean, Chișinău, 18-19 decembrie 2008, p. 20-22

Alexandru Fira. Optimizarea tehnicilor de micropropagare *in vitro* a unor soiuri de arbuști fructiferi și ornamental. Universitatea „Babeș-Bolyai”, facultatea de biologie și geologie școala doctorală biologie integrativă, rezumatul tezei de doctorat, Cluj-Napoca, 2013

<http://www.vinmoldova.md/index.php?mod=content&id=629>

<http://www.incda-fundulea.ro/anale/75/75.2.pdf>

<http://ro.scribd.com/doc/91622135/biotehnologii-vegetale>

<http://www.dissercat.com/content/vyrashchivanie-bezvirusnogo-posadochnogo-materiala-yabloni-v-usloviyakh-tschr>

V. Documente considerate a fi relevante

Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate și, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	UA 97981 C2 2012.04.10	1
A	UA 19847 U 2007.01.15	1
A	SU 1682388 A1 1991.10.07	1
A, D, C	Fayek M.A., Jomaa A.H., Shalaby Abdel-Baset A., Al-Dhaher Mohammad-Morshed A. Meristem tip culture for <i>in vitro</i> eradication of grapevine leaf roll associated virus-1 (GLRaV-1) and grapevine fan leaf virus (GFLV) from infected flame seedless grapevine plantlets. <i>Ini. Inv.</i> , 2009, 4, p. 1-11	1

* categoriile speciale ale documentelor citate:

A – document care definește stadiul anterior general	T – document publicat după data depozitului sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidență principiul sau teoria pe care se bazează invenția
X – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă când documentul este luat în considerație de unul	E – document anterior dar publicat la data depozit național reglementar sau după aceasta dată

singur	
Y – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe documente de aceeași categorie	D – document menționat în descrierea cererii de brevet
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expoziție sau la orice alte mijloace de divulgare	C – document considerat ca cea mai apropiată soluție
	& – document, care face parte din aceeași familie de brevete
P - document publicat înainte de data de depozit, dar după data priorității invocate	L – document citat cu alte scopuri
Data finalizării documentării	
20.10.2014	
Examinator	
LUPĂȘCU Lucian	