



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2011 01152**

(22) Data de depozit: **15.11.2011**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30.01.2014** BOPI nr. 1/2014

(41) Data publicării cererii:
28.09.2012 BOPI nr. 9 /2012

(73) Titular:

• **INSTITUTUL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
POMICULTURĂ PITEȘTI-MĂRĂCINENI,
STR.MĂRULUI NR.402,
COMUNA MĂRĂCINENI, AG, RO**

(72) Inventatori:

• **PLOPA CATIȚA, BL.ICDP, SC.A, ET.1,
AP.10, MĂRĂCINENI, AG, RO;**
• **ISAC MARIA, STR.CALEA BUCUREȘTI
NR.2, BL.2, SC.D, ET.1, AP.2, PITEȘTI, AG,
RO;**
• **ISAC VALENTINA, STR.VIIOR NR.4,
BL.P 14, SC.B, ET.2, AP.9, PITEȘTI, AG,
RO;**
• **BUTAC MĂDĂLINA MARIA, BL.ICDP,
SC.A, AP.4, MĂRĂCINENI, AG, RO;**
• **MILITARU MĂDĂLINA ADRIANA,
BD.PETROCHIMIȘTILOI NR.39, BL.C,
SC.A, AP.50, PITEȘTI, AG, RO;**
• **MAZILU CRĂIȘOR ION, STR.CRINULUI
NR.36, BL.D 7, SC.A, ET.1, AP.3, PITEȘTI,
AG, RO;**
• **ANCU SERGIU IONEL,
SAT PODU DÂMBOVITEI,
COMUNA DÂMBOVICIOARA, AG, RO;**
• **COMAN MIHAIL, STR.POPA ȘAPCĂ
NR.14, PITEȘTI, AG, RO;**

• **SUMEDREA MIHAELA, BD.REPUBLICII,
BL.D 5 A, SC.D, AP.18, PITEȘTI, AG, RO;**
• **SUMEDREA DORIN IOAN,
BD.REPUBLICII, BL.D 5 A, SC.D, AP.18,
PITEȘTI, AG, RO;**
• **CHIȚU EMIL, STR.CRINULUI NR.36,
BL.D 7, SC.A, AP.9, PITEȘTI, AG, RO**

(74) Mandatar:

**BIROU DE PROPRIETATE INDUSTRIALĂ
BROJBOIU DUMITRU ADRIAN FLORINEL,
BD. REPUBLICII, BL. 212, SC. D, AP. 11,
PITEȘTI, JUD. ARGEȘ**

(56) Documente din stadiul tehnicii:

**BORKOWSKA B., "MICROPROPAGATION
OF SOUR CHERRY, CULTIVAR
SCHATTENMORELLE", PUBLICAT IN
ISHS ACTA HORTICULTURAE 169,
AUGUST 1985, INTERNATIONAL
WORKSHOP ON IMPROVEMENT OF
SWEET AND SOUR CHERRY VARIETIES
AND ROOTSTOCKS, GIESSEN, DE, ISBN
978-90-66050-92-1; PLOPA C.ȘI COL.,
"INFLUENȚA MEDIILOR DE CULTURĂ
ASUPRA ÎNMULȚIRII "IN VITRO" A UNOR
PORTALTOI DE CIREȘ ȘI VIȘIN",
SCIENTIFIC PAPERS OF THE R. I. F.G.
PITEȘTI, VOL. XXV, 2009, PP.189-192.**

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI MATERIAL SĂDITOR
LIBER DE VIRUSUL PNRSV PRIN CULTURI IN VITRO LA
SOIUL DE VIȘIN SCHATTENMORELLE**



Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui material săditor liber de virusul *Prunus Necrotic Ring Spot Virus*, prin optimizarea mediului de cultură *in vitro* la soiul de vișin *Schattenmorelle*, destinat a fi utilizat la producerea materialului săditor.

Este cunoscut faptul că producerea de fructe de calitate superioară se realizează cu mare dificultate, în principal, datorită impactului economic deosebit pe care îl au unii patogeni virali. Virusurile care infectează culturile perene, cum este și cazul speciilor pomicole, produc adesea pierderi care sunt în creștere progresivă. Astfel de boli cronice pot avea consecințe foarte serioase, ca drept urmare a pierderilor de timp, bani și nu în ultimul rând blocarea terenului cu o cultură care merge în pierdere, datorită impactului negativ produs de virusuri. Pe lângă rezultatele economice scăzute, datorate producțiilor slabe calitativ și cantitativ, se pot adăuga și costurile efectuate cu o nouă cultură care să o înlocuiască pe cea bolnavă. Cercetări efectuate până în prezent de **Ramsdel și colaboratorii, 1992, Effects of Tomato ring spot virus and Prunus necrotic ring spot alone and in combination on the grows and yield of Motmorency sour cherry. Acta Horticulturae, 309, 111-113**, indică faptul că se poate ajunge la pierderi ale producției de până la 54,5% în cazul infecției cu *Prunus Necrotic Ring Spot Virus* (PNRSV), asociat cu *Tomato Ringspot Virus* la soiul de vișin *Motmorency*.

Măsurile de control aplicate bolilor virale vizează o serie de proceduri, printre care:

- tratamentele fitosanitare care să împiedice transmiterea virusurilor cu ajutorul vectorilor (afide, cicade, nematozi etc.);

- ameliorarea rezistenței genetice este de asemenea un obiectiv care este prezent în toate programele de ameliorare și prevede crearea de soiuri rezistente. Importanța unui astfel de obiectiv este mare și finalizarea lui se materializează prin implicații economice și ecologice cu impact extraordinar asupra vieții oamenilor, dar este un proces lung și anevoios;

- transformarea genetică în scopul obținerii de soiuri rezistente, care însă este o procedură controversată în special în Europa și ca urmare utilizarea în scop comercial este în prezent nesigură, în cazul speciilor pomicole, cercetările în această direcție sunt abia la început.

Ca o concluzie la cele enumerate mai sus, lupta împotriva virozelor plantelor pomicole este eficientă atunci când se bazează mai ales pe măsuri preventive, profilactice, care au drept scop să împiedice extinderea infecției și să reducă la minimum pierderile provocate de viroze. O soluție o reprezintă producerea materialului săditor liber de virusuri, care se materializează apoi prin înființarea de plantații sănătoase. Acest lucru însă nu este realizabil cu ușurință, datorită faptului că foarte multe virusuri se transmit prin înmulțirea vegetativă sau prin semințe și polen.

În scopul eliminării acestui neajuns, calea care poate să înlăture riscul transmiterii virozelor este utilizarea culturilor de țesuturi. Condușă în funcție de anumiți parametri specifici, cultura *in vitro* poate să asigure producerea de plante sănătoase. Esențială este însă optimizarea factorilor care influențează acest lucru. Principalii factori de influență sunt reprezentați de genotip, virus, mediul de cultură și tipul de explant. Atât genotipul (soiul), cât și virusul, reprezintă însă factori asupra cărora nu se poate interveni, cele două componente ale „ecuației” reprezentând compoziția genetică a unui organism, iar intervenția asupra lor ar face obiectul unor altor preocupări (transformarea genetică). Componentele asupra cărora se poate interveni sunt reprezentate de tipul de explant și mediul de cultură (macroelemente, microelemente, vitamine, balanță hormonală etc.).

În cadrul balanței hormonale, citochininele au un rol determinant chiar prin modul lor de acțiune: au rol în organogeneza directă în procesele de regenerare adventivă a lăstarilor și creșterea acestora, realizând astfel și creșterea ratei de multiplicare.

Datorită diviziunii intense a celulelor în meristem, există o competiție între aceasta și particula virală pentru folosirea acizilor nucleici sintetizați. Acizii nucleici se pare că sunt puși la dispoziția diviziunii celulare în detrimentul multiplicării virale. Astfel ritmul diviziunii celulare în meristem este mult mai mare, decât ritmul replicării virusului. Meristemul excizat suferă un traumatism puternic, cu atât mai puternic cu cât el este de dimensiuni mai mici. Acest lucru a fost remarcat de **Walkey și colaboratorii la cireș, 1969, The inactivation of virus in cultured shoots tips of Nicotiana rustica, J. Gen. Virol. 5, 237-241**. Alte explicații precizează că, datorită concentrației ridicate de auxine și citochinine din apexurile meristemice, penetrarea particulelor virale în celule este oprită sau chiar are loc inactivarea acestora (**Quak, 1977, Meristem culture and libere de virus plants. In: J. Reinert and Y.P.S. Bajaj (eds.). Applied and fundamental aspects of plant cells, tissue, and organ culture. Springer, Berlin, pp. 598-615**). Cele enumerate mai sus vin să întărească faptul că nu poate exista o tehnologie standard pentru toate soiurile și toate virusurile, însă tehnologia de eliberare a unui soi față de un virus poate fi realizată prin intermediul mărimii explantului și al mediului de cultură.

În literatura de brevete, se regăsesc date atât despre cultura *in vitro* - cultura de țesuturi, cât și aspecte de obținere a plantelor libere de virus.

Brevetul de invenție **US 5731201** prezintă o metodă de producere de portaltoi libere de virus la hamei prin utilizarea unui mediu de cultură cu un conținut crescut de zaharuri.

Brevetul de invenție **US 5906941** se referă la o invenție cu aplicație în culturile de țesuturi, unde utilizarea unor nutrienți duce la îmbunătățirea rezultatelor în ceea ce privește embriogeneza somatică, reducerea vitrifierii și îmbunătățirea procesului de aclimatizare prin scurtarea timpului necesar acestui proces și ridicând rata de supraviețuire a plantelor în timpul aclimatizării.

În brevetul de invenție **US 6265217** este prezentată o metodă pentru producerea *in vitro* a microbulbilor de usturoi (*Allium sativum*).

În brevetul de invenție **US 7964405 B2**, se face descrierea unei metode de cultivare a plantelor, cu referire la producerea de plante tinere și/sau a unui ministoc de plante mamă la plante ornamentale ierbacee printre care: *Petunia*, *Osteospermum*, *Pelargonium*.

Brevetul de invenție **EP0938840A1** prezintă o metodă pentru producerea materialului săditor liber de virus de ardei roșu cu ajutorul interferonului uman față de virusul mozaicului tutunului.

De asemenea, la nivel internațional, au fost efectuate diverse studii pentru obținerea de plante libere de virus, prin culturi de țesuturi și alte metode. Astfel au fost obținute unele rezultate la soiurile de cireș Noire de Meched, infectat cu Apple Chlorotic Leafspot Virus; Vittoria, infectat cu PNRSV, Van 2D, infectat cu complexul PNRSV și Prune Dwarf Virus (**Deogratias și colaboratorii, 1989, Eradication of prune dwarf virus, primus necrotic ring spotvirus and apple chlorotic leaf spot virus in tissue cultured sweet cherry, Canadian Journal of Plant Pathology, 11: 332-336**).

Eliberarea de infecția cu PNRSV a fost studiată și la soiurile de vișin Ilva și Nana (**Isac M. și colaboratorii, 2005, Utilizarea metodei DAS-ELISA și a culturii *in vitro* în diagnosticarea și devirusarea materialului biologic pomicol, pag. 1271 -1276. Lucr. șt. Iași**).

Tot ca urmare a specificității modului de reacție a complexului soi-virus, au fost făcute încercări prin diferite metode care să ducă la devirusarea materialului infectat. La prun, eliminarea virusului PNRSV din materialul infectat a fost studiată și prin utilizarea terapiei *in vitro* la soiul Earliblue (**Dziedzic, 2008, Elimination of Prunus necrotic ring spot**

virus (PNRSV) from plum 'Earliblue' shoots through thermotherapy *in vitro*. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research., Vol. 16: 101-109, sau termoterapia asociată cu chimioterapie *in vitro* la soiurile Empress și Early Rivers (Cieslinska, 2007, Application of thermo-and chemotherapy *in vitro* for eliminating some viruses infecting Primus sp. fruit trees, Journal of Fruit and Ornamental Plant Research., Vol. 15: 117-124).

Rezultate au fost obținute și în producerea plantelor libere de virus de căpșun (Biswas și colaboratorii, 2007, World Journal of Agricultural Sciences 3(6): 757-763. ISSN 1817- 3047).

Toate aceste soluții prezente în literatură au însă caracteristici care pot reprezenta dezavantaje în anumite situații:

- nu au aplicare universală, ci se referă la alte specii de plante sau genotipuri;
- soluțiile respective vizează alte virusuri;
- unele sunt foarte costisitoare, de exemplu, cea în care se utilizează interferonul;
- se referă la utilizarea culturilor de țesuturi în alte scopuri și nu numai acela de obținere a plantelor libere de virus.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în realizarea unui procedeu pentru obținerea materialului săditor de vișin liber de virusul PNRSV prin culturi *in vitro*, la soiul *Schattenmorelle*, în mai multe faze și etape, având ca efect creșterea calității din punct de vedere fitosanitar a materialului biologic.

Astfel, procedeul pentru obținerea materialului săditor liber de virusul Prunus Necrotic Ring Spot Virus prin culturi *in vitro* la soiul de vișin *Schattenmorelle* se desfășoară în trei faze: I. Faza de diferențiere, pentru derularea căreia sunt necesare etapele:

- a) - pregătirea mediului de cultură pentru inițiere;
 - b) - pregătirea materialului biologic;
 - c) - inocularea explantelor în condiții aseptice;
 - d) - diferențierea materialului biologic inoculat.
- II. Faza de multiplicare, care comportă următoarele etape:
- a) pregătirea mediului de cultură pentru multiplicare și transferul lăstarilor obținuți în urma diferențierii pe mediul de multiplicare;
 - b) multiplicare cultură primară;
 - c) pregătirea mediului de cultură pentru multiplicare și transferul lăstarilor obținuți în cultura primară pe mediul de multiplicare;
 - d) multiplicare subcultura 1;
 - e) pregătirea mediului de cultură pentru multiplicare și transferul lăstarilor obținuți în subcultura 1, pe mediul de multiplicare;
 - f) multiplicare subcultura 2;
 - g) pregătirea mediului de cultură pentru multiplicare și transferul lăstarilor obținuți în subcultura 2, pe mediul de multiplicare;
 - h) multiplicare subcultura 3.

III. Faza de înrădăcinare, pentru derularea căreia sunt necesare etapele:

- a) pregătirea mediului de cultură pentru înrădăcinare și transferul lăstarilor de pe mediul de multiplicare pe mediul de înrădăcinare;
- b) înrădăcinarea, precedată de retestarea virală și aclimatizarea plantelor sănătoase.

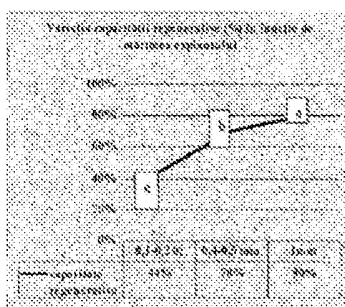
Invenția de față înlătură dezavantajele prezentate în literatura amintită și prin aceea că nu este necesară aplicarea culturilor *in vitro* în același timp cu alte proceduri, ca termoterapie, chimioterapie, în cazul de față, soluția optimă fiind reprezentată de mărirea explantului în corelație cu condițiile de cultură, la genotipul de vișin luat în studiu, respectiv, *Schattenmorelle*.

Avantajele invenției sunt următoarele:	1
- permite obținerea de plante libere de virus la un soi cu cerință mare pe piața internațională a cărui producere este limitată de efectul virozelor;	3
- pe lângă scopul în sine, obținerea de material săditor liber de virusuri se realizează și o sporire a cantității de material prin multiplicarea acestuia în cultură <i>in vitro</i> , pornind de la zeci de plante în etapa de multiplicare, la finele subculturilor 3-4, se pot obține zeci de mii de plante;	5
- nu sunt implicate proceduri care să prezinte risc de poluare;	7
- costurile sunt mai reduse decât în cazul aplicării mai multor tehnici în același timp: cultură <i>in vitro</i> asociată cu chimioterapie sau cultură <i>in vitro</i> asociată cu termoterapie etc.	9
În continuare, se dă un exemplu de realizare în legătură cu figura, în care este reprezentat algoritmul de lucru al procedurii conform invenției, fiind reliefate cele trei faze de bază: diferențierea sau inițierea, multiplicarea și înrădăcinarea, fiecare dintre aceste faze fiind explicitate prin etape, care comportă importante particularități tehnice.	11
Procedeul pentru obținerea materialului săditor liber de virusul PNRSV prin culturi <i>in vitro</i> la soiul de vișin <i>Schattenmorelle</i> se bazează pe metoda de înmulțire a plantelor <i>in vitro</i> , procedeu în urma căruia, prin utilizarea unui substrat de cultură cu componente în concentrații optimizate și a materialului biologic (explantul) la dimensiuni de asemenea optimizate, numărul de plante obținut este într-un anumit procent și liber de virus. Pentru obținerea plantelor libere de virus, procedeul începe în faza de diferențiere, numită și inițiere.	15
Mediul de cultură necesar fazei de diferențiere este cunoscutul mediu (Murashige&Skoog, 1962- A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, <i>Physiol. Plant</i> 15: 473-497), obținut prin combinarea anumitor cantități din soluțiile stoc, după cum urmează: 80-100 ml/l din soluția stoc de macroelemente cu concentrația 10X, 8-12 ml/l din soluția stoc de microelemente cu concentrația de 100X, 8-12 ml/l din soluția stoc de vitamine cu concentrația de 100X.	17
Pentru inițierea culturilor, în componența balanței hormonale este utilizată giberelina GA3 (acid giberelic) în cantități de 0,05...0,2 mg/l; în asociere cu auxina IBA (acid indolil butiric) în cantități de 0,01...0,03 mg/l, și în asociere cu citochinina BAP (6-benzilaminopurina) în cantități de 0,1...0,5 mg/l. Pentru ca fierul să fie accesibil plantelor, administrarea în mediul de cultură se face sub forma de chelat de fier Na ₂ FeEDTA, în cantitate de 32 mg/l. Drept sursă de carbon organic, este folosită zaharoza, 20...30 g/l, iar pentru solidificare, este folosit agar, 6...8 g/l. Mediul astfel obținut este distribuit în eprubete în vederea sterilizării, care se face în autoclavă la o presiune de 1,2 atm timp de 20 min.	19
Materialul biologic este recoltat în perioada februarie-martie și este reprezentat de ramuri cu vârsta de un an, de la plantele depistate pozitiv în urma testului DAS-ELISA (Clark și Adams, 1977, <i>Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol.</i> , 34: 475-483), utilizând un kit PNRSV și/sau TAS- ELISA (Cambra și colaboratorii, 1994, <i>Detection of plum pox potyvirus using monoclonal antibodies to structural and non-structural proteins, EPPO Bull.</i> 24, 569-577). Explantele cu care se înființează culturile <i>in vitro</i> sunt obținute din mugurii acestor ramuri din care se extrage, la binocular, țesutul meristematic. Dezinfecția materialului biologic se face prin spălarea mugurilor în apă cu detergent lichid 3:1, urmată de imersie în alcool etilic 96 vol%, timp de 10...15 min; imersie în hipoclorit de calciu cu o concentrație de 6 % (w/v) timp de 15...20 min, 3 spălări a câte 2...3 min fiecare, în apă bidistilată și sterilă.	21
Prelevarea explantelor se efectuează în spațiu aseptice, sub hota cu flux de aer laminar. Instrumentarul, reprezentat de pensete, anse, bisturie, este sterilizat în timpul lucrului prin flambare. Mărimea explantelor este cuprinsă între 0,1 și 1 mm. Explantele se pun în eprubetă, după care sunt trecute în scop de diferențiere în camera de creștere.	23

Diferențierea, numită și inițierea sau regenerarea explantelor, se derulează în condiții controlate, și anume: expunere 16 h la lumină cu o intensitate luminoasă de 2.500...3.000 lucși și 8 întuneric, la temperatură de 21...23° C. Timpul necesar regenerării explantelor pentru a putea fi trecute în faza de multiplicare este de 28...32 zile.

Ca urmare a condițiilor descrise mai sus, respectiv, mărime explant, mediu de cultură, balanță hormonală, factori de mediu, capacitatea de regenerare a materialului biologic în faza de diferențiere este influențată de mărimea explantului. Explantele cu mărimi de 0,1...0,2 mm, asigură o capacitate regenerativă de 44% a explantelor față de 70% explante regenerate la dimensiunea explantului de 0,4...0,5 mm și 80% explante regenerate în cazul explantelor de 1 mm, așa cum este ilustrat în graficul de mai jos.

Graficul 1



Test Duncan ($P \leq 0,05$)

După perioada de diferențiere, lăstarii astfel obținuți sunt transferați, în aceleași condiții de asepsie, din camera sterilă, pe mediul de cultură specific celei de-a doua faze de cultură *in vitro*, respectiv, faza de multiplicare.

La mediul de bază Murashige&Skoog, conținând 80...110 ml/l din soluția stoc de macroelemente cu concentrația 10X, 8...12 ml/l din soluția stoc de microelemente cu concentrația de 100X, 8...12 ml/l din soluția stoc de vitamine cu concentrația de 100X, este adăugată balanța hormonală reprezentată de 0,8...1,2 mg/l BAP și auxină 0,1...0,3 mg/l ANA (acid alfa naftil acetic).

Vasele de cultură utilizate au capacitatea de 150 ml, cu un conținut de mediu de cultură de aproximativ 20 ml. În fiecare vas, sunt transferate câte 5 plante. Ca urmare a corelării acțiunii citochininelor cu cantitatea de auxine și cu proporțiile de macroelemente, microelemente și vitamine din mediului de cultură Murashige&Skoog în condiții de mediu reprezentate de expunere 16 la lumină cu o intensitate luminoasă de 2.500...3.000 lucși și 8 întuneric la temperatură de 21...24°C, se obțin creșteri însemnate ale numărului de lăstari adventivi. După o perioadă de 4...6 săptămâni, asigurarea necesarului nutrițional de către mediul de cultură devine critică, datorită consumului componentelor mediului de cultură, în scopul apariției de muguri adventivi din care se dezvoltă apoi lăstari. După o perioadă de 4...6 săptămâni, lăstarii obținuți se separă între ei și sunt transferați pe un mediu de cultură proaspăt, realizat după aceeași rețetă, ca la cultura primară de multiplicare.

Repetarea subculturilor poate fi eficientă până la subcultura 3 inclusiv, după care se înregistrează o scădere a ratei de multiplicare. În tabelul de mai jos, este prezentată evoluția ratei de multiplicare pe parcursul culturii primare și a încă trei subculturi.

SUBCULTURA	RATA DE MULTIPLICARE
Cultura primară	1:3
Subcultura 1	1:5
Subcultura 2	1:6
Subcultura 3	1:6
Subcultura 4	1:5

În subcultura 1, numărul de lăstari adventivi crește față de cultura primară, de la 3 lăstari adventivi pe lăstarul inițial, la 5 lăstari adventivi pe lăstarul inițial, în subcultura 1 și la 6 lăstari adventivi, în subculturile 2 și 3. În subcultura 4, se constată deja o scădere a randamentului la multiplicare. Lăstarii obținuți sunt trecuți în continuare la înrădăcinare.

Ca urmare a procedurii descris mai sus, se obțin creșteri substanțiale în ceea ce privește numărul de lăstari, care vor fi trecuți la înrădăcinare.

În faza de înrădăcinare, componenta mediului de cultură este identică cu cea de la fazele precedente. Vasele de cultură au o capacitate de 780 ml, cu un conținut de mediu de cultură de 80...100 ml. În fiecare vas, sunt puse un număr de 10 plante. Transferul plantelor se realizează în condiții de aseptie la hota cu flux de aer laminar. Vasele cu culturi sunt trecute în scop de înrădăcinare în camera de creștere, unde li se asigură condiții de mediu ca la fazele precedente.

Rizogeneză lăstarilor obținuți în faza de multiplicare a fost evaluată în funcție de componentele mediilor de cultură și balanța hormonală.

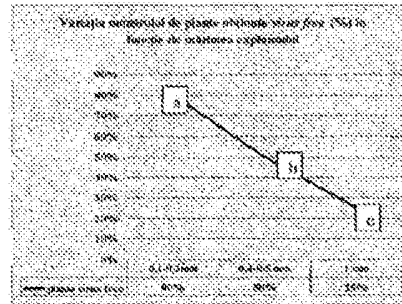
Mediul de cultură este reprezentat de componentele Murashige&Skoog, în următoarele cantități: 40...60 ml/l din soluția stoc de macroelemente cu concentrația 10X, 4...6 ml/l din soluția stoc de microelemente cu concentrația de 100X, 8...12 ml/l din soluția stoc de vitamine cu concentrația de 100X și balanța hormonală 0,1...0,3 mg/l GA₃ în asociere cu 0,5...1,5 mg/l IBA.

Succesul procedurii este măsurat prin randamentul de plante libere de virus obținute. Procentul de plante libere de virus este determinat în urma retestării virotice prin metode serologice DAS-ELISA (*Clark și Adams, 1977, Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses, J. Gen. Virol., 34: 475-483*) și/sau TAS-ELISA (*Cambra și colaboratorii, 1994, Detection of plum pox potyvirus using monoclonal antibodies to structural and non-structural proteins, EPPO Bull. 24, 569-577*), utilizând un kit PNRSV.

În urma testării virotice, poate fi apreciat răspunsul materialului biologic în ceea ce privește eliberarea de virus în condițiile prezentate în graficul 2.

Se constată că explantele cu dimensiunea de 1 mm au avut un randament foarte scăzut, de 25%, în ceea ce privește numărul de plante libere de virus. Din explantele cu dimensiunea de 0,4...0,5 mm, la sfârșitul fazei de înrădăcinare, sunt libere de virus un procent de 50% din plante. Explantele cu dimensiuni de 0,1...0,2 mm, deși în faza de diferențiere au arătat că nu au avut o capacitate regenerativă bună, în schimb au înregistrat cel mai mare procent de plante libere de virus, 80%.

Graficul 2



TestDuncan($P \leq 0,05$)

Materialul liber de virus a fost trecute ulterior în seră, pe un substrat de perlit pentru aclimatizare. Condițiile asigurate pe perioada aclimatizării au constat în asigurarea umidității și a nutriției prin aplicarea de diferiți fertilizanți foliari pentru plante, recomandată fiind soluția KNOP (KNO_3 , KH_2PO_4 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, MgSO_4).

Procedeul conform invenției a fost orientat asupra soiului de vișin *Schattenmorelle*, deoarece este un soi de bază în Europa, cu cerere foarte mare pe piața de fructe, alături și de alte clone provenite din acest soi. Producțiile sigure sunt însă limitate, deoarece în caz de infecție cu PNRSV, după **Kegler și colaboratorii, 1972, Effect of virase son the yield and growth of the sour cherry variety Schattenmorelle, Arch. Gartenbau, 20:479-487**, pierderile la soiul *Schattenmorelle* sunt foarte mari, putând ajunge până la 76...93%.

Acest soi de vișin are o bună preabilitate la cultura *in vitro*, de unde derivă avantajele specifice acestui tip de cultură:

- asigură multiplicarea clonală rapidă, pornind de la cantități mici de material vegetal;
- necesită spații mici de cultură, valorificând astfel bine spațiul din camera de creștere;
- se evită efectul sezonier din pepinieristică;
- asigură conservarea materialului obținut în faza de plantulă până la primirea unor comenzi de multiplicare.

În urma aplicării procedeului, s-a ajuns la concluzia că nu au existat diferențe în evoluția materialului biologic cu care s-au înființat culturile *in vitro* de la soiul *Schattenmorelle* infectat cu PNRSV față de martor, care a fost reprezentat de material biologic sănătos de la soiul *Schattenmorelle*.

	1
1. Procedeu de obținere a unui material săditor liber de virusul PNRSV prin optimizarea mediului de cultură <i>in vitro</i> la soiul de vișin <i>Schattenmorelle</i> , caracterizat prin aceea că , în faza de diferențiere, mediul de cultură este constituit pe baza componentelor Murashige&Skoog, în următoarele cantități: 80...110 ml/l din soluția stoc de macroelemente cu concentrația 10X, 8...12 ml/l din soluția stoc de microelemente cu concentrația de 100X, 8...12 ml/l din soluția stoc de vitamine cu concentrația de 100X și o balanță hormonală reprezentată din 0,05...0,2 mg/l acid giberelic 0,01...0,03 mg/l acid indolil butiric și 0,1...0,5 mg/l 6-benzilaminopurina;	3
- în faza de multiplicare, mediul de cultură este constituit pe baza componentelor Murashige&Skoog, în următoarele cantități: 80...110 ml/l din soluția stoc de macroelemente cu concentrația 10X, 8...12 ml/l din soluția stoc de microelemente cu concentrația de 100X, 8...12 ml/l din soluția stoc de vitamine cu concentrația de 100X și o balanță hormonală reprezentată din 0,5...1,5 mg/l 6-benzilaminopurina și 0,1...0,5 mg/l acid alfa naftil acetic, repetat pe parcursul a trei subculturi;	5
- în faza de înrădăcinare, mediul de cultură este constituit pe baza componentelor Murashige&Skoog, în următoarele cantități: 40...60 ml/l din soluția stoc de macroelemente cu concentrația 10X, 4...6 ml/l din soluția stoc de microelemente cu concentrația de 100X, 8...12 ml/l din soluția stoc de vitamine cu concentrația de 100X și o balanță hormonală reprezentată din 0,1...0,3 mg/l acid giberelic și 0,5...1,5 mg/l acid indolil butiric.	7
2. Procedeu definit la revendicarea 1, caracterizat prin aceea că materialul biologic inițial este constituit dintr-un meristem cu dimensiunea de 0,1...0,2 mm, obținut din muguri situați pe ramuri anuale.	9
	11
	13
	15
	17
	19
	21
	23

