



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2011 01218

(22) Data de depozit: 24.11.2011

(41) Data publicării cererii:
29.06.2012 BOPI nr. 6/2012

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE
DEZVOLTARE PENTRU BIOTEHNOLOGII
ÎN HORTICULTURĂ ȘTEFĂNEȘTI -ARGEȘ,
CALEA BUCUREȘTI NR.37, ȘTEFĂNEȘTI,
AG, RO

(72) Inventatori:
• GUȚĂ IONELA CĂTĂLINA,
CALEA BUCUREȘTI, BL. U4, AP. 22,
PITEȘTI, AG, RO;
• BUCIUMEANU ELENA COCUȚA,
CALEA CRAIOVEI, BL. 40BIS, SC. A, AP. 8,
PITEȘTI, AG, RO

(54) **PROCEDEU DE ELIMINARE A VIRUSULUI FLECK ȘI
VIRUSURILOR ASOCIATE RĂSUCIRII FRUNZEI
SEROTIPURILE 1+3 LA VIȚA DE VIE, PRIN
ELECTROTHERAPIE**

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la un procedeu de obținere de plante de viță de vie libere de virusul fleck și virusurile asociate răsucirii frunzei serotipurile 1+3. Procedeu conform invenției constă în tratamentul în câmp electric uniform de 10...40 V/cm, timp de 5...20 min, al plantelor de viță de vie infectate, prelevarea apexurilor intens regenerative (0,2...0,3 cm), dezinfectia cu

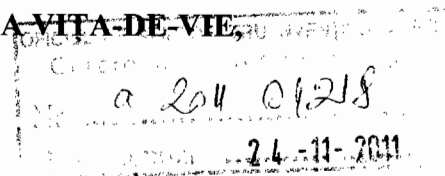
hipoclorit de calciu 6...10% timp de 4...7 min, inocularea pe mediul de cultură specific viței de vie, regenerarea de plante prin culturi *in vitro*, testarea în vederea selecției vițelor libere de virusurile menționate.

Revendicări: 1



6

**PROCEDEU DE ELIMINARE A VIRUSULUI FLECK ȘI VIRUSURILOR
ASOCIATE RĂSUCIRII FRUNZEI SEROTIPURILE 1+3 LA VIȚA-DE-VIE,
PRIN ELECTROTHERAPIE**



DESCRIEREA INVENȚIEI

Invenția se referă la un procedeu de eliminare a virusului fleck și virusurilor asociate răsucirii frunzei serotipurile 1+3 la vița-de-vie, prin utilizarea unui câmp electric uniform aplicat plantelor infectate, care constituie materialul biologic necesar regenerării de plante sănătoase prin culturi *in vitro*.

Metodele clasice de obținere de plante de viță-de-vie libere de virusuri sunt cultura de meristem și/sau termoterapia .

Aceste metode prezintă dezavantajele dificultății izolării meristemului de dimensiuni cât mai mici (0,2–0,3 mm), cerințele multiple necesare pentru asigurarea viabilității explantului, existența de echipamente mari consumatoare de energie, perioadă lungă de obținere a plantelor sănătoase, dependența ratelor de însănătoșire de tipul virusului și mărimea explantului.

Necesitatea obținerii unei cantități suficiente de material horticol sănătos a dus la apariția și dezvoltarea metodelor alternative de devirozare: chimioterapia *in vitro*, electroterapia, crioprezervarea, metode care nu au fost încă elucidate în totalitate. Sunt cunoscute principiile prin care există posibilitatea blocării multiplicării virale, însă parametrii de lucru necesită experimentare (Hormozi-Nejad și colab., 2010; Bayati și colab., 2011).

Problema pe care o rezolvă invenția este aceea de obținere de plante de viță-de-vie libere de virusuri cu largă răspândire și impact economic asupra culturii viței-de-vie (virusul fleck și virusurile asociate răsucirii frunzei serotipurile 1+3), în timp relativ scurt și consum redus de energie.

Obiectivul principal al procedurii este acela de utilizare a curentului electric ca metoda de blocare a multiplicării virale și la stabilirea unui protocol de regenerare de plante libere de virusuri (electroterapie).

Electroterapia, conform invenției constă în utilizarea curentului electric sub forma câmpului electric uniform în vederea inactivării virusului ca urmare a creșterii temperaturii în interiorul celulei vegetale (González, și colab., 2006).

Procedeu de obținere de plante de viță-de-vie libere de virusuri, conform invenției, constă în: tratamentul în câmp electric uniform de 10...40V/cm timp de 5...20 min a plantelor de viță-de-vie infectate, prelevarea apexurilor intens regenerative (0,2–0,3 cm), dezinfectia

acestora cu hipoclorit de calciu 6-10% timp de 4...7 min și inocularea pe mediu de cultură specific viței-de-vie, în condiții sterile la hota cu flux de aer laminar.

Desfășurarea proceselor de organogeneză, de multiplicare a materialului biologic rezultat prin proliferarea lăstarilor, înrădăcinarea *in vitro* au loc în condiții controlate în camere de creștere: temperatura 18...25°C, fotoperioada 16 ore lumină și iluminarea 3000-3500 lx.

Minilăstarii înrădăcinați sunt aclimatizați conform tehnologiei de regenerare a viței de vie prin cultură *in vitro*.

Plantele regenerare sunt testate în vederea alcătuirii loturilor de plante libere de virusul fleck și virusurile asociate răsucirii frunzei serotipurile 1+3.

Invenția prezintă următoarele avantaje:

- utilizează un procedeu simplu, economic și eficient, destinat eradicării virusului fleck și virusurilor asociate răsucirii frunzei serotipurile 1+3, prin tratament în câmp electric uniform al plantelor infectate;

- reduce timpul de regenerare a plantelor de viță-de-vie libere de virusurile menționate cu 40...50%;

- utilizează minim de echipamente pentru tratamentul în câmp electric uniform și cultura *in vitro* și înlătură procesele tehnologice energofage care utilizează un număr mare de aparate și instalații;

- prin folosirea apexurilor intens regenerative elimină inconvenientul ratei mici de viabilitate a explantelor de dimensiuni reduse;

- este o metodă prietenoasă mediului, protocolul de lucru se desfășoară în condiții controlate oferite de cultura *in vitro*, fără utilizarea de substanțe poluante.

Se dă în continuare un exemplu de realizare a invenției:

Electroterapia constă în tratamentul în câmp electric uniform de 10...40V/cm, timp de 5...20 min a plantelor de viță-de-vie infectate.

Vârfuri de lăstari prelevate de la plantele tratate electric se fasonează și se dezinfectează cu hipoclorit de calciu 6-10%, timp de 4...7 min, după o imersare în alcool etilic 80%.

Spălarea materialului biologic de agentul sterilizant se realizează prin 3-4 clătiri succesive cu apă distilată sterilă.

După dezinfecția materialului vegetal, se prelevează în condiții sterile la hota cu flux de aer laminar apexuri intens regenerative de 0,2-0,3 cm și se inoculează pe mediu de cultură M&S (Murashige și Skoog, 1962) suplimentat cu hormoni și vitamine specific viței-de-vie,

după ce în prealabil a fost distribuit în vase de cultură, autoclavat la 120⁰C și 1 atm. timp de 10 min.

Vasele de cultură se incubează în camere de creștere la temperatura 18...25°C, fotoperioada 16 ore lumină și iluminarea 3000-3500 lx, o perioadă de 1...3 subculturi pe mediu de multiplicare specific viței de vie urmate de o subkultură pe mediu de înrădăcinare.

Lăstarii înrădăcinați sunt aclimatizați conform tehnologiei de regenerare a viței-de-vie prin cultură *in vitro*: se spală de resturile de agar și se plantează în ghivece pe substrat de turbă îmbogățită cu substanțe nutritive.

Plantele regenerate sunt testate în vederea alcătuirii loturilor de plante libere de virusul fleck și virusurile asociate răsucirii frunzei serotipurile 1+3.

Plantele regenerate, libere de virusul fleck și virusurile asociate răsucirii frunzei serotipurile 1+3 constituie sursa de material de înmulțire viticol certificat.

BIBLIOGRAFIE

1. Bayati, SH., Shams-Bakhsh, M., Moieni, A. (2011): *Elimination of grapevine virus A (GVA) by cryotherapy and electrotherapy*. J. Agr. Sci. Tech. Vol. 13: 443-450.
2. Gonzáles, J.E., Sánchez, R., Sánchez, A. (2006): *Biophysical analysis of electric current mediated nucleoprotein inactivation process*. Centro Agrícola Vol. 2: 42-47.
3. Hormozi-Nejad, M.H., Mozafari, J., Rakhshandehroo, F. (2010): *Elimination of Bean common mosaic virus using an electrotherapy technique*. J. Plant Dis. Prot. Vol. 117, (5): 201-205.
4. Murashige T. and Skoog F. (1962): *A revised medium for rapid grow and bioassays with Tabacco tissue culture*, Physiol. Plant. Vol. 15, 473-49.

REVENDICĂRI

1. Procedul de obținere de plante de viță de vie libere de virusuri, caracterizat prin aceea că, protocolul de lucru constă în: tratamentul în câmp electric uniform de 10...40 V/cm timp de 5...20 min a plantelor infectate, prelevarea apexurilor intens regenerative (0,2-0,3 cm), dezinfectia cu hipoclorit de calciu 6-10% timp de 4...7 min, inocularea pe mediul de cultură specific, în condiții sterile la hota cu flux de aer laminar. Desfășurarea proceselor de organogeneză, de multiplicare a materialului biologic rezultat prin proliferarea lăstarilor, înrădăcinare *in vitro* au loc în condiții controlate în camere de creștere: temperatura 18...25°C, fotoperioada 16 ore lumină și iluminarea 3000-3500 lx. Perioada de incubare pe mediu de cultură este de 1...3 subculturi. Lăstarii înrădăcinați sunt aclimatizați conform tehnologiei de regenerare a viței de vie prin cultură *in vitro*. Plantele regenerate sunt testate în vederea alcătuirii loturilor de plante libere de virusul fleck și virusurile asociate răsucirii frunzei serotipurile 1+3.