



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2011 01152

(22) Data de depozit: 15.11.2011

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

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL DE CERCETARE-
DEZVOLTARE PENTRU POMICULTURĂ
PITEȘTI-MĂRĂCINENI, STR. MĂRULUI
NR. 402, COMUNA MĂRĂCINENI, AG, RO

(72) Inventatori:
• PLOPA CAȚIȚA, 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. VIILOR NR. 4,
BL. P14, 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. PETROCHIMIȘTILOR NR. 39, BL. C,
SC. A, AP. 50, PITEȘTI, AG, RO;

• MAZILU CRĂIȘOR ION, STR. CRINULUI
NR. 36, BL. D7, SC. A, ET. 1, AP. 3,
PITEȘTI, AG, RO;
• ANCU SERGIU IONEL,
SAT PODUL DĂMBOVIȚEI,
DĂMBOVICIOARA, AG, RO;
• COMAN MIHAIL, STR. POPA ȘAPCĂ
NR. 14, PITEȘTI, AG, RO;
• SUMEDREA MIHAELA, BD. REPUBLICII,
BL. D5A, SC. D, AP. 18, PITEȘTI, AG, RO;
• SUMEDREA DORIN IOAN,
BD. REPUBLICII, BL. D5A, SC. D, AP. 18,
PITEȘTI, AG, RO;
• CHIȚU EMIL, STR. CRINULUI NR. 36,
BL. D7, SC. A, AP. 9, PITEȘTI, AG, RO

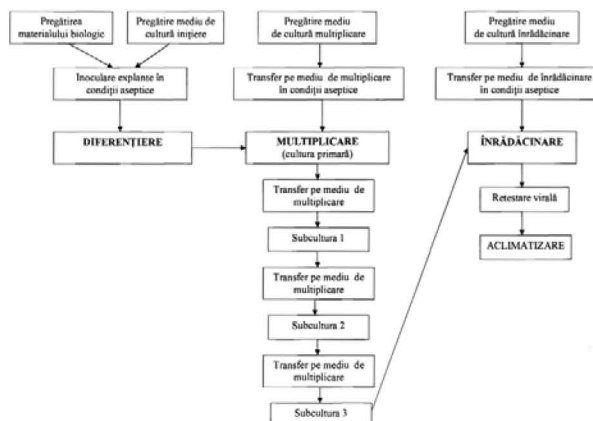
(74) Mandatar:
BIROU DE PROPRIETATE INDUSTRIALĂ
BROJBOIU DUMITRU ADRIAN FLORINEL,
BD. REPUBLICII, BL. 212, SC. D, AP. 11,
PITEȘTI, JUD. ARGEȘ

(54) PROCEDEU PENTRU OBTINEREA MATERIALULUI SĂDITOR
LIBER DE VIRUSUL PNRSV PRIN CULTURI IN VITRO LA
SOIUL DE VIȘIN SCHATTENMORELLE

(57) Rezumat:

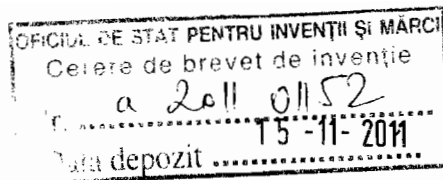
Prezenta invenție se referă la un procedeu pentru obținerea unui material săditor liber de virus PNRSV, obținerea unui material săditor liber de virus PNRSV, prin culturi *in vitro* la soiul de vișin Schattenmorelle, în care un material biologic constând dintr-un meristem cu dimensiunea de 0,1...0,2 mm, obținut din muguri situați pe ramuri anuale, care este cultivat pe un mediu de cultură pentru faza de diferențiere, constituit pe baza componentelor Murashige-Skoog, în următoarele cantități 80-110 ml/l din soluția stoc de macroelemente cu concentrația de 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-benzilaminopurină.

Revendicări: 5
Figuri: 1



Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).





Ex. 1.

13

PROCEDEU PENTRU OBTINEREA MATERIALULUI SĂDITOR LIBER DE VIRUSUL *PNRSV* PRIN CULTURI *IN VITRO* LA SOIUL DE VIȘIN *SCHATTENMORELLE*

Invenția se referă la un procedeu pentru obținerea materialului săditor liber de virusul *Prunus Necrotic Ring Spot Virus* prin culturi *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 pomicele 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 cultura care merge în pierdere datorită impactului negativ produs de virusuri. Pe lângă rezultatele economice scăzute datorate producțiilor slabe calitativ și cantitativ se poate 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), 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 pomicele cercetările în aceasta direcție sunt abia la început.

Ca o concluzie la cele enumerate mai sus, lupta împotriva virozelor plantelor pomicele 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 doua 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). Alte explicații precizează că, datorită concentrației ridicate de auxine și citochinine din apexurile meristematice, penetrarea particulelor virale în celule este oprită sau chiar are loc inactivarea acestora (Quak, 1977). 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 *virus free*.

Brevetul de invenție US 5731201 prezintă o metodă de producere de portaltui *virus free* 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 ministorc de plante mamă la plante ornamentale ierbacee printre care: *Petunia*, *Osteospermum*, *Pelargonium*.

Brevetul de invenție EP 0938840 A1 prezintă o metodă pentru producerea materialului săditor liber de virus de ardei roșu cu ajutorul interferonului uman față de virusul *Tobacco mosaic virus*.

De asemenea la nivel internațional au fost efectuate diverse studii pentru obținerea de plante *virus free* 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).

Eliberarea de infecția cu *PNRSV* a fost studiată și la soiurile de vișin Ilva și Nana (Isac M. și colaboratorii, 2005).

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 termoterapiei *in vitro* la soiul Earliblue (Dziedzic, 2008) sau termoterapia asociată cu chimioterapia *in vitro* la soiurile Empress și Early Rivers (Cieślińska, 2007).

Rezultate au fost obținute și în producerea plantelor *virus free* de căpșun (Biswas și colaboratorii, 2007).

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 *virus free*.

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, procedeu 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 comporta următoarele etape:

- a) pregătirea mediului de cultură pentru multiplicare și transferul lăstarilor obținuți în urma diferențierii pe mediul de multiplicare;
- b) multiplicare cultura 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 ca 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 mărimea explantului în corelație cu condițiile de cultură, la genotipul de vișin luat în studiu, respectiv Schattenmorelle.

Avantajele invenției sunt următoarele:

- permite obținerea de plante *virus free* la un soi cu cerință mare pe piața internațională a cărei producere este limitată de efectul virozelor.
- 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 *in vitro*, pornind de la zeci de plante în etapa de multiplicare la finele subculturilor 3-4 se pot obține zeci de mii de plante;
- nu sunt implicate proceduri care să prezinte risc de poluare.
- costurile sunt mai reduse decât în cazul aplicării mai multor tehnici în același timp: cultură *in vitro* asociată cu chimioterapie sau cultură *in vitro* asociată cu termoterapie, etc..

În continuare se da un exemplu de realizare în legătură cu fig. 1, în care este reprezentat algoritmul de lucru al procedurii conform invenției, fiind reliefate cele trei faze de baza: diferențierea sau inițierea, multiplicarea și înrădăcinarea, fiecare din aceste faze fiind explicitate prin etape, care comportă importante particularități tehnice.

Procedura pentru obținerea materialului săditor liber de virusul *PNRSV* prin culturi *in vitro* la soiul de vișin Schattenmorelle, se bazează pe metoda de înmulțire a plantelor *in vitro*, 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 *virus free* procedeu începe în faza de diferențiere, numită și inițiere.

Mediul de cultură necesar fazei de diferențiere, este cunoscutul mediu Murashige&Skoog (1962), 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.

Pentru inițierea culturilor în componența balanței hormonale este utilizată *giberelina* GA_3 (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 $Na_2FeEDTA$, 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 autoclav la o presiune de 1,2 at, timp de 20 de minute.

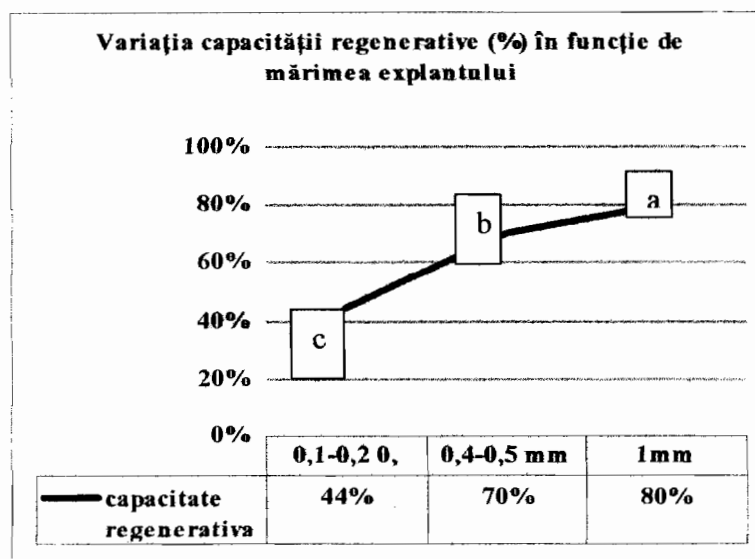
Materialul biologic este recoltat în perioada februarie-martie și este reprezentat de ramuri cu vârsta de un an, de la plantele depistate pozitiv în urma testului DAS-ELISA (Clark și Adams, 1977) și/sau TAS-ELISA (Cambra M. și colaboratorii, 1994). Explantele cu care se înființează culturile *in vitro* 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 minute fiecare, în apă bidistilată și sterilă.

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 0,1-1 mm. Explantele se pun în eprubetă, după care sunt trecute în scop de diferențiere în camera de creștere.

Diferențierea, numita și inițierea sau regenerarea explantelor, se derulează în condiții controlate și anume: expunere 16 ore la lumină cu o intensitate luminoasă de 2.500-3.000 lucși și 8 ore întuneric, temperatură 21-23⁰ 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 α . naftil acetic).

Vasele de cultură utilizate au capacitatea de 150 ml cu un conținut de mediu de cultură de aprox. 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 ore la lumină cu o intensitate luminoasă de 2.500-3.000 lucși și 8 ore 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 critica 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 subculturii:

Tab. 1

| 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 asepsie 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.

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

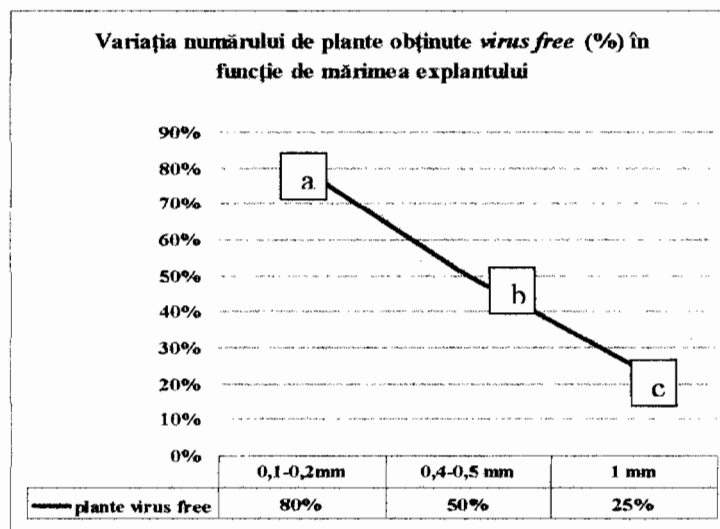
Mediul de cultură este reprezentat de componentele Murashige&Skoog. în următoarele cantități: 40-60 ml/l din soluția stoc de macroelemente cu concentrația 10X, 4-6 ml/l din soluția stoc de microelemente cu concentrația de 100X, 8-12 ml/l din soluția stoc de vitamine cu concentrația de 100X. și balanța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

Succesul procedurii este măsurat prin randamentul de plante *virus free* obținute. Procentul de plante *virus free* este determinat în urma retestării virotice prin metode serologice DAS-ELISA (Clark și Adams, 1977) și /sau TAS-ELISA (Cambra și colaboratorii, 1994), 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 25 %, în ceea ce privește numărul de plante *virus free*. 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 *virus free* 80%.

Graficul 2



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

Materialul *virus free* 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 (KNO₃, KH₂PO₄, Ca(NO₃)₂, MgSO₄).

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 alții (1972), 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 procedurii 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.

Bibliografie

- 1.US 6265217
- 2.US 7964405 B2
- 3.US 5906941
- 4.EP 0938840 A1
- 5.US 5731201
6. Biswas, M.K., Hossain M., Islam, R – 2007 – World Journal of Agricultural Sciences 3(6): 757-763. ISSN 1817-3047.
7. Cambra, M., Asensio, M., Gorris, M.T., Pérez, E., Camarasa, E., García, J.A., Moya, J.J., López-Abella, D., Vela, C., Sanz, A., 1994. Detection of *plum pox* potyvirus using monoclonal antibodies to structural and non-structural proteins. EPPO Bull. 24, 569–577.
8. Cieślińska Mirosława – 2007 – Application of thermo—and chemotherapy *in vitro* for eliminating some viruses infecting *Prunus sp.* fruit trees. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research. Vol. 15: 117-124.
9. Clark, M.F. and A.N. Adams, 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol., 34: 475-483.
10. Deogratias J.M., Dosba, F., Lutz, A. – 1989 – Eradication of *prune dwarf virus*, *prunus necrotic ring spot virus* and *apple chlorotic leaf spot virus* in tissue cultured sweet cherry. Canadian Journal of Plant Pathology, 11: 332-336.
11. Dziejdzic Ewa – 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.
12. Kegler, H., Spaar, D., Otto H. -1972- Effect of viruse son the yield and growth of the sour cherry variety Schattenmorelle. Arch. Gartenbau. 20:479-487.
13. Isac Maria 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.
14. Quak, F. -1977- Meristem culture and *virus free* 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.
15. Murashige, T., Skoog F., 1962- A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant 15: 473-497.
16. Ramsdel și colab.-1992 – Effects of *Tomato ring spot virus* and *Prunus necrotic ring spot* alone and in combination on the grows and yeld of Motmorency sour cherry. Acta Horticulturae, 309, 111-113.
17. Walkey, D.G.A., Fitzpatrick, J., Woolfitt, J.M.G. – 1969-The inactivation of virus in cultured shoots tips of *Nicotiana rustica*, J. Gen. Virol. 5, 237-241.

REVENDICĂRI

1. Procedeul pentru obținerea materialului săditor liber de virusul *PNRSV* prin culturi *in vitro* la soiul de vișin Schattenmorelle, **caracterizat prin aceea că** mediul de cultură pentru *faza de diferențiere* 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 GA₃, 0,01-0,03 mg/l acid indolil butiric IBA și 0,1-0,5 mg/l 6-benzilaminopurina BAP.

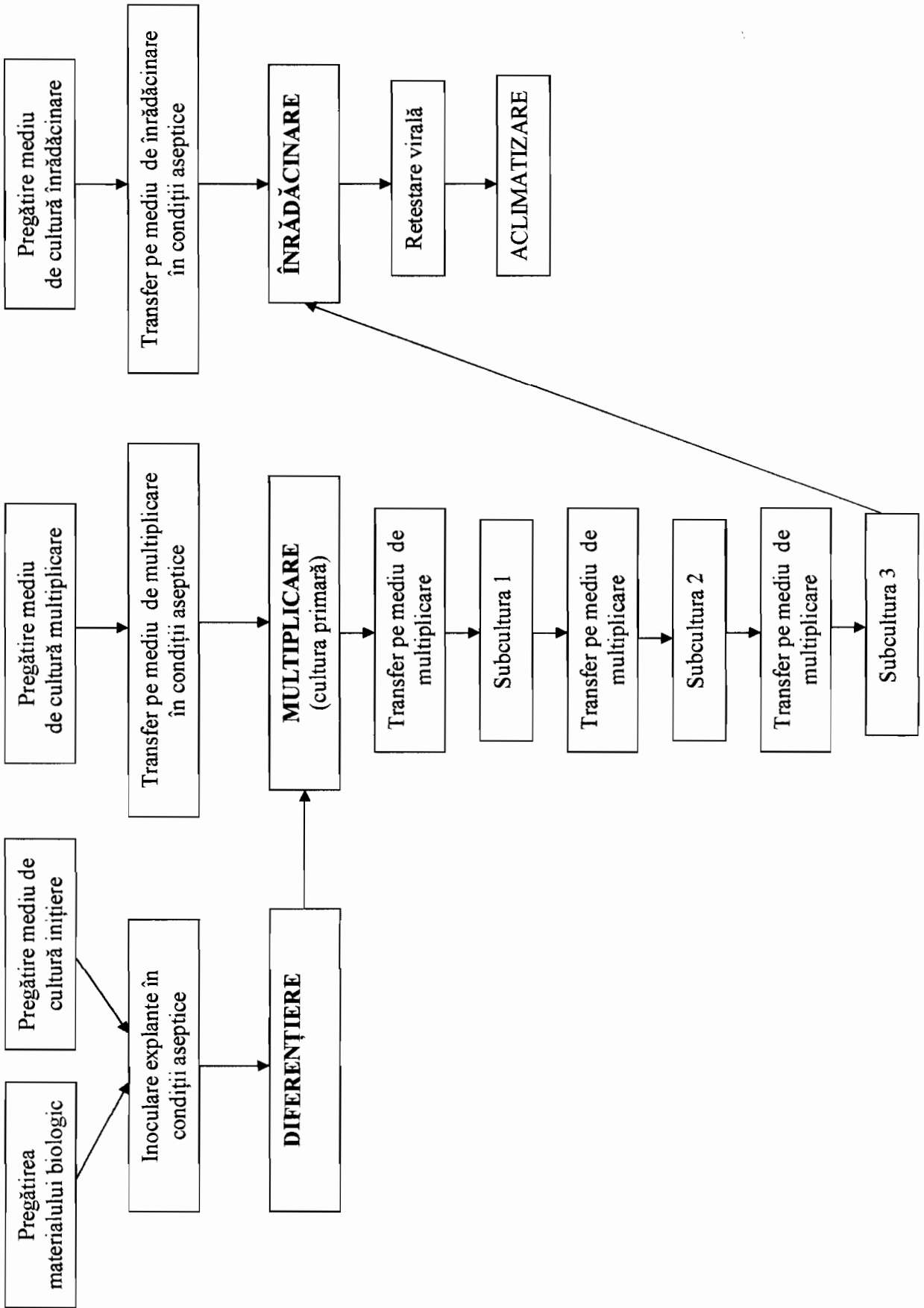
2. Procedeul pentru obținerea materialului săditor liber de virusul *PNRSV* prin culturi *in vitro* la soiul de vișin Schattenmorelle, **caracterizat prin aceea că** materialul biologic inițial este constituit dintr-un meristem cu dimensiunea de 0,1-0,2 mm, obținut din muguri situați pe ramuri anuale.

3. Procedeul pentru obținerea materialului săditor liber de virusul *PNRSV* prin culturi *in vitro* la soiul de vișin Schattenmorelle, **caracterizat prin aceea că** mediul de cultură pentru *faza de multiplicare* 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 BAP și 0,1-0,5 mg/l acid α . naftil acetic ANA.

4. Procedeul pentru obținerea materialului săditor liber de virusul *PNRSV* prin culturi *in vitro* la soiul de vișin Schattenmorelle, **caracterizat prin aceea că** numărul de multiplicări este reprezentat de cultura primară și încă trei subculturi.

5. Procedeul pentru obținerea materialului săditor liber de virusul *PNRSV* prin culturi *in vitro* la soiul de vișin Schattenmorelle, **caracterizat prin aceea că** mediul de cultură pentru *faza de înrădăcinare* 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 GA₃ și 0,5-1,5 mg/l acid indolil butiric IBA.

Figura 1.



C. Ploșe