



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2011 00916**

(22) Data de depozit: **19.09.2011**

(41) Data publicării cererii:
30.07.2013 BOPI nr. 7/2013

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE
AGRONOMICE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ
DIN BUCUREȘTI, BD.MĂRĂȘTI NR.59,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• BIOING S.A., STR. PROF. I. BOGDAN
NR. 10, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• DIACONESCU CRISTIANA,
STR. ATELIERELE NOI NR. 43, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;
• TĂNASE DOINA,
STR. MIHĂILESCU VINTILĂ NR. 19, BL. 62,
SC.2, AP. 71, ET.2, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;
• ICHIM MARIA, STR.HUȘI NR.7, BL.PA1,
SC.2, ET.3, AP.26, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;

• URDEȘ LAURA,
STR. OCTAV COCĂRĂSCU NR. 45,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• DINIȚĂ GEORGETA, STR. 6 MARTIE
NR. 1, BL. PR 1, SC. 1, AP. 7, OTOPENI, IF,
RO;
• POPA RĂZVAN, STR. GÎRLANI NR. 2,
BL. C86, AP. 35, SECTOR 6, BUCUREȘTI,
B, RO;
• VIȘAN ADRIANA, STR. FELEACU NR.6,
BL. 10I, SC. 2, ET. 2, AP. 21, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;
• ICHIM LIVIU-IONEL, STR.HUȘI NR.7,
BL.P A 1, SC.2, ET.3, AP.26, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO;
• ENACHE RAMONA, STR. APUSULUI
NR. 26-28, BL. N 29, SC. 2, ET. 4, AP. 37,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(54) **VITROPLANTULE DE DUD INOCULATE CU ENDOMICORIZE
DE TIP VEZICULAR-ARBUSCULAR DESTINATE CULTIVĂRII
SOLURILOR CONTAMINATE CU PLUMB ȘI PROCEDEU DE
OBTINERE**

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la un material săditor, constând din vitroplantule de dud colonizate cu endomicorize de tip vezicular-arbuscular, la minimum 15% din masa radiculară, care păstrează caracteristicile genetice ale formelor parentale, dar prezintă parametri bioproductivi superiori și toleranță fiziologică pe solurile contaminate cu plumb. Invenția se referă, de asemenea, la un procedeu de obținere a materialului săditor constând din multiplicarea *in vitro* a explantelor nodale rezultate din lăstarii stimulați ai mugurilor dorminzi,

utilizând mediul de cultură MS, hormonii de multiplicare BAP și KIN, hormonul de înrădăcinare IBA, după care vitroplantulele sunt inoculate cu inocul brut, provenit din biomasa radiculară a porumbului sau a plantelor de ceapă, sau cu biofertilizanți comerciali, colonizarea este controlată și vitroplantulele colonizate sunt selectate din câmpul de replicare.

Revendicări: 2

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).



VITROPLANTULE DE DUD INOCULATE CU ENDOMICORIZE DE TIP VEZICULAR-ARBUSCULAR DESTINATE CULTIVĂRII SOLURILOR CONTAMINATE CU PLUMB ȘI PROCEDEU DE OBTINERE

AUTORI: Diaconescu Cristiana, Tanase Doina, Ichim Maria, Urdes Laura, Dinita Georgeta, Popa Razvan, Visan Adriana, Ichim Liviu-Ionel, Enache Ramona

Domeniul tehnic la care se refera invenția: *Agricultura*

Invenția se referă la obținerea unui nou material săditor de dud prin metode biotehnologice, acesta urmând a fi utilizat pentru cultivare pe solurilor contaminate cu plumb și pentru practicarea sericiculturii, respectiv pentru obținere gogoșilor de mătase de la specia *Bombyx mori* L. destinate industriei textile.

Stadiul actual al tehnicii:

Plantele de dud aparținând genului *Morus* sunt considerate plante cu importanță economică pentru sericicultură, frunza de dud constituind unica sursă de hrană a viermilor de mătase din specia *Bombyx mori*. Din punct de vedere botanic plantele de dud aparțin diferitelor specii din genul *Morus*, fiind plante unisexuat dioice, înmulțite pe cale vegetativă sau sexuată.

Valorificând totipotența celulelor și țesuturilor meristemice ale plantelor de dud în scopul clonării *in vitro* s-au obținut rezultate pozitive menționate în lucrări internaționale și naționale.

Pentru îmbunătățirea parametrilor bioproductivi ai vitroplantulelor de dud s-a luat în considerare *biofertilizarea acestora cu endomicorize de tip vezicular arbuscular*, rezultatele experimentale fiind extrem de încurajatoare pentru cultura dudului în România și care permit utilizarea pentru prima dată în țara noastră a acestui tip de material săditor.

Asociațiile de tip vezicular arbuscular sunt cele mai răspândite tipuri de micorize prezente în sistemele agricole, ceea ce explică interesul crescut în manipularea lor pentru a fi incorporate în practicile de producție.

Inocularea cu endomicorize vezicular-arbusculare constituie o metodă de cultivare cu efecte benefice în scopul reducerii aplicării de fertilizanți chimici și de pesticide, ca

element cheie în abordările durabile din agricultură și horticultură; se știe că micorizele sunt capabile să colonizeze diferite habitate, succesul lor ecologic reflectând un grad ridicat de diversitate a capacităților genetice și fiziologice ale fungilor endofiti. Aproape 6.000 de specii de fungi dintre Zygo-, Asco- și Basidiomicete au fost identificate ca micorizale, iar odată cu dezvoltarea tehnicilor moleculare noi specii micorizale și noi tipuri de asociații sunt descrise pe baza amprentării ADN.

Efectul major al simbiozelor micorizale asupra plantelor gazdă constă în creșterea aportului de elemente minerale, în special al celor care în stare ionică prezintă o mobilitate redusă sau care sunt prezente în concentrații suboptimale (fosfor, amoniu, zinc, cupru, inclusiv contaminanți precum plumbul). Micorizele ajută plantele gazdă să reziste la stresul abiotic prin ameliorarea deficienței nutrienților, contribuie la creșterea toleranței la secetă, salinitate și la poluare, inclusiv cu metale grele precum plumbul.

Importanța cercetărilor care fac obiectul invenției:

Potențialul biosintetic al rădăcinilor de la dud este puțin studiat pe plan mondial, fapt ce evidențiază importanța cercetărilor inițiate pe plan național privind stabilirea de clone în condiții “in vitro” și experimentarea biofertilizării cu endorize vezicular-arbusculare a vitroplantulelor și a plantulelor de dud.

Combinarea efectului fungilor de micorize privind ecosistemul plantă – sol, la vitroplantele de dud creează premiza utilizării cu succes a acestora în fitoremediere, adică în procesul de detoxifierea a mediului poluat cu ajutorul acestor plante, abordare biotehnică de mare perspectivă.

Obiectivele invenției :

Principalul obiectiv al invenției a constat în obținerea unui nou material săditor de dud, printr-un procedeu biotehnic, sub formă de vitroplantule de dud inoculate cu endomicorize de tip vezicular arbuscular destinate solurilor contaminate cu plumb.

Avantajele invenției:

-Noul tip de material săditor de dud prezintă o rezistență sporită la agenții patogeni specifici;

-Sistemul radicular al acestui material săditor permite o mobilizare și o absorbție mai bună a macro și micro elementelor din sol, inclusiv a unor metale grele immobilizate în particulele de sol, realizând astfel și decontaminarea solurilor la nivele optime de

conținut.

-Noul tip de material săditor de dud permite valorificarea terenurilor contaminate cu metale grele(zinc, cupru, plumb) necesare agriculturii, respectiv sericiculturii.

-Cercetarile recente au abordat aspecte privind infiintarea unor plantatii de dud cu destinatie sericicola pe terenurile contaminate cu plumb, ce permit valorificarea economica a acestora prin includerea in circuitul agricol;

-Cercetările efectuate de către autorii invenției au condus la obținerea unui material săditor de dud cu toleranță fiziologică totală pe solurile contaminate cu plumb.

Etapele invenției:

Realizarea inventiei consta în parcurgerea urmatoarelor etape de execuție:

- ^ Realizarea vitroplantulelor de dud ;
- ^ Obținerea inocului endomicorizal de tip vezicular arbuscular sub formă de inocul brut provenit din biomasa radiculara a plantelor de Zea mays sau Allium cepa, sau sub forma de inocul comercial;
- ^ Realizarea de vitroplantule de dud inoculate cu endomicorize de tip vezicular arbuscular si repicarea acestora;
- ^ Controlul colonizării prin metoda de colorare cu Tryphan blue , selecția vitroplantulelor de dud inoculate cu endomicirize vezicular arbusculare din câmpul de repicare și suprainocularea materialului săditor de dud necolonizat..

Prezentarea detaliată a modului de realizare a invenției:

Realizare vitroplantulelor de dud cuprinde parcurgerea unui procedeu de lucru laborios.

Biotehnologiile de multiplicare a plantelor de dud fac referire la obținerea de vitroplantule prin culturi de țesuturi, meristeme și in ultima perioadă de timp prin culturi de celule. Formule nutritive pentru mediile de cultură au fost standardizate ,fiind stabilite pe baza unor testări privind tipul și concentrațiile diferitelor substanțe constitutive în funcție de procesul morfogenetic ce urmează să fie indus.

Pentru multiplicare *in vitro* a plantelor de dud este utilizat mediul bazal Murashige – Skoog (1962), bogat in azot, care s-a dovedit a asigura la nivel optim elementele nutritive pentru dezvoltarea explantelor cultivate. Acest mediu bazal constituie formula nutritivă

optimă pentru inițierea culturilor de meristeme și de apexuri.

Multiplicare în *vitro* a plantelor de dud se face având drept sursă de explante lăstari vegetativi obținuți din muguri dorminzi de iarnă, stimulați să intre în vegetație.

Procedeul de lucru parcurge următoarele etape:

-Obținerea sursei de explante se realizează prin forțarea lăstarilor lignificați recoltați în perioada noiembrie-decembrie din colecția sau plantația de dud, perioadă de repaos vegetativ. Forțarea se realizează prin simularea condițiilor de dezmușurire, prin amplasarea acestor lăstari în vase cu apă de robinet și asigurarea unei temperaturi ambientale de 24-25°C. După 60 de zile din mugurii dorminzi se vor dezvolta apical lăstarii erbacei care vor constitui sursa de explante;

-Sterilizarea materialului vegetal constă într-o operație de spălare cu apă normală de robinet (presterilizare) a lăstarilor, necesară pentru eliminarea mecanică a unor contaminanți; Lăstarii erbacei sunt tăiați în bucăți de cca. 1,5-2,0cm fiecare conținând un mugure axilar care va deveni un explant nodal, rezultând totodată și explante apicale. Sterilizarea efectivă se realizează cu HgCl_2 în concentrație de 0,03 % timp de 30 de minute, explantele nodale fiind amestecate în continuu în această soluție, după care sunt spălate cu apă distilată timp de 10 min a câte 3 reprize. Sterilizarea poate fi realizată și prin utilizarea unei soluții de 3-5 % de hipoclorit de potasiu (produsul comercial Domestos).

-Inițierea culturii primare (inocularea) are loc în condiții aseptice la hota de flux laminat. Mediul de cultură utilizat este de tip Murashige – Skoog cu 0,8 % agar, distribuit în vase de cultură tip “baby food”, mediul de cultură fiind suplimentat cu hormoni de multiplicare (benzinaminopurina BAP și kinetina KIN) în următoarea combinație de dozaj:

1mg/l BAP + 1 mg/l KIN pentru soiurile de dud ce emit ușor rădăcini adventive

1mg/l BAP + 2 mg/l KIN pentru soiurile de dud reticente

Vasele de cultură precum și mediul de cultură sunt sterilizate prin autoclavare realizată la 121 °C și la o presiune de 1,1-1,2 atm

Înainte de autoclavare mediului bazal trebuie să i se corecteze pH-ul la valori de 5.6-5.8.

După inoculare (asezarea explantelor nodale în vasele de cultură sterilizate pe mediul de cultură cu respectarea polarității normale) vasele de cultură sunt sterilizate prin flacără și opturate cu rola parafilm, fiind trecute în camera de creștere.

-Incubația culturii inițiale-multiplicarea constă în transferarea în camera de incubare (de creștere) a vaselor de cultură pentru o perioadă de 15 zile la o temperatură de 25-28°C, iluminată artificial, cu o fotoperioadă de 16 : 8, la o intensitate de 3000 lux, utilizând un temporizator; incubația culturii durează 15-21 zile.

-Subcultivarea : este necesară pentru obținerea clonelor de la același apex în condițiile utilizării apexurilor caulinare și constă în transferarea de la cultura inițială a unor explante în vase de cultură cu mediu proaspăt.

-Înrădăcinarea și regenerarea plantelor autonome se realizează atunci când lăstarii dezvoltați în vasele de cultură ating lungimea de 2,5-3,0 cm și are drept scop obținerea radicelelor prin schimbarea mediului de cultură la care formula rămâne neschimbată (cu excepția agarului care nu se mai adaugă), mediul de cultura fiind lichid. Menținerea vitroplantulelor în mediul de cultură lichid se realizează prin utilizarea unor punți mici de hîrtie de filtru, înrădăcinarea fiind asigurată prin suplimentarea mediului de cultură cu hormonul IBA (acidul indolilbutiric) în concentrație de 1 mg / l. Condițiile de mediu, de temperatură și lumină se pastrează la aceași parametri. Primele proimordii radiculare apar la un interval de 10-15 zile de la trecerea pe mediul de cultură lichid.

-Aclimatizarea este stadiul în care plantele sunt transferate în vase de cultură cu apă de robinet după ce în prealabil au fost bine spălate de resturile mediului de cultură; Acest stadiu *ex situ* este necesar pentru fortificarea sistemului radicular și adaptarea sistemului foliar al plantulelor la un conținut de umiditate scăzut al mediului ambiant, pentru depășirea așa numitului ”șoc de aclimatizare”. După o perioadă de 15 zile plantulele sunt transferate în ghivece care conțin un substrat de cultură solid format din pamânt de țelină, mranită și nisip în proporție de 1:1:1 cu un pH de 5,8; Substratul solid folosit pentru transferul vitroplantulelor trebuie autoclavat (tratament profilactic). În condiții de microclimat optim vitroplantulele de dud se vor lignifica, în vederea repicării, după o

perioadă minimă de 90 de zile.

Obținerea inoculilor endomicorizali de tip vezicular-arbuscular se realizează procedând astfel pentru inoculul brut:

Din parcelele cultivate cu porumb sau ceapă, se recoltează biomasa radiculară a plantelor, pe o adâncime a solului de 20 - 30 cm. urmînd a fi condiționată prin mărunțirea materialului vegetal, cu ajutorul unei mori cu ciocănele, inclusiv a particulelor de sol aderente, urmată de omogenizarea cu ajutorul unui melc transportor. Perioada optimă pentru recoltarea biomasei radiculare este în fenofaza de postrecoltare a producției principale. Inoculul brut astfel obținut se păstrează în condiții de depozitare cu umiditate relativă a aerului de maximum 60%, fără pericol de mucegai sau de rozătoare. Forma de prezentare poate fi vrac sau în saci de 50 kg.

Utilizarea biomasei radiculare de porumb sau ceapă asigură un inocul brut de endomicorize de tip vezicular-arbuscular sigur, dar pentru siguranță, înainte de utilizare, se procedează la controlul acestuia, prin metoda de colorare Trypan blue.

Biofertilizarea vitroplantulelor de dud cu endomicorize se poate realiza și prin folosirea unor biofertilizanți comerciali, specializați pentru tipul vezicular-arbuscular.

Realizarea vitroplantulelor de dud inoculate cu endomicorize de tip vezicular – arbuscular și repicarea acestora cuprinde lucrările de obținere a substratului de repicare format din pământ de țelină, mranită și nisip, în proporții egale, ce se sterilizează prin autoclavare la temperatura de 110°C, timp de 60 de minute. După răcire substratul de repicare este amestecat cu inoculul brut în doză de 50 grame/ 1000 grame amestec de substrat sau în doză de 30 mg inocul comercial/ 1000 grame de substrat. Biofertilizantii comerciali conțin flora activă și linii selectate ale funghiilor de *Glomus mosseae*, *G. fasciculatum* și *Sclerocystis* sp.

Substratul de repicare inoculat se pune în cutii de repicare sau se modelează în brazde de repicare, cu o înălțime minimă de 40 cm. Plantulele de dud se repică în substratul biofertilizat, asigurînd o densitate de 100 plantule / mp., perioada de inoculare fiind de 45 -50 zile. Lucrările de îngrijire executate în această perioadă sunt plivitul, respectiv prășitul și udarea sau irigarea. Perioada de repicare poate fi prelungită pentru întreaga perioadă de vegetație, dacă se utilizează inoculul comercial.

Controlul colonizării și selecția vitroplantulelor de dud inoculate se realizează

prin aplicarea metodei de colorare cu Trypan blue.

Controlul și selecția vitroplantulelor de dud inoculate prin această metodă se aplică prin control randomizat pe diagonala câmpului de repicare la un număr minim de 10 plante/ 1000 vitroplantule.

Vitroplantulele de dud necolonizate se vor suprainocula prin administrarea inocului brut sau comercial în dozele menționate, în zona radiculară a fiecărei plantule, toate plantele urmînd a fi udate zilnic, timp de 7 zile, apoi udările următoare devenind săptămînale. Suprainocularea se poate repeta de cel mult 3 ori, la sfîrșitul perioadei de vegetație, existența unui număr de 10% de plante de dud necolonizate fiind în limite normale.

Caracteristicile genetice ale plantulelor de dud colonizate sunt identice cu formele parentale, iar conținutul de proteină a crescut, fiind de peste 28,5% comparativ cu o medie de 26,5% la vitroplantulele fără endomicorize. Vitroplantulele de dud colonizate cu endomicorize au prezentat o rată de supraviețuire de 100% pe substrat contaminat cu plumb, manifestînd o toleranță fiziologică totală.

Modul de aplicare industrială a invenției:

Biotehnologiile utilizate pot fi aplicate în toate laboratoarele și centrele de biotehnoologii la scară industrială. Rezultatele cercetărilor care au permis obținerea noului tip de material săditor de dud s-au testat în condiții de producție industrială obținîndu-se un număr de peste 10.000 vitroplantule de dud inoculate cu endomicorize de tip vezicular arbuscular, pe durata unei luni normale de lucru. Toate terenurile contaminate cu plumb pot fi cultivate cu noul tip de material săditor de dud pentru practicarea sericiculturii, activitate agricolă nealimentară.

**VITROPLANTULE DE DUD INOCULATE CU ENDOMICORIZE DE TIP
VEZICULAR-ARBUSCULAR DESTINATE CULTIVĂRII SOLURILOR
CONTAMINATE CU PLUMB ȘI PROCEDEU DE OBȚINERE**

**AUTORI: Diaconescu Cristiana, Tanase Doina, Ichim Maria, Urdes Laura, Dinita
Georgeta, Popa Razvan, Visan Adriana, Ichim Liviu-Ionel, Enache Ramona**

REVENDICĂRI

^ Produs sub forma unui nou material săditor de dud , reprezentat de vitroplantule de dud colonizate cu endomicorize vezicular-arbusculare la un număr minim de 15% din biomasa radiculară, cu caracteristici genetice identice ale formelor parentale, dar cu parametri bioproductivi superiori și toleranță fiziologică pe solurile contaminate cu plumb.

^ Procedul de obținere conform invenției constă în multiplicarea in vitro a explantelor nodale rezultate din lăstarii stimulați ai mugurilor dorminzi, utilizând mediul de cultură MS, hormonii de multiplicare BAP în doză de 1mg/l și KIN în doză de 1-2mg/l, hormonul de înrădăcinare IBA în doză de 1mg/l, inocularea vitroplantulelor cu inocul brut provenit din biomasa radiculară a porumbului sau a plantelor de ceapă, în doza de 50g/1000g substrat sau a unor biofertilizanți comerciali în doză de 30mg/1000g substrat, controlul colonizării prin metoda Trypan blue și selecția vitroplantulelor colonizate din câmpul de repicare.