



(12)

BREVET DE INVENȚIE

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

(22) Data de depozit: **19/09/2011**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **26/02/2016** BOPI nr. **2/2016**

(41) Data publicării cererii:
30/07/2013 BOPI nr. **7/2013**

(73) Titular:
• **UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE
AGRONOMICE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ
DIN BUCUREȘTI, BD.MĂRĂȘTI NR.59,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **BIOING S.A., STR.PROF.ION 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.PA 1,
SC.2, ET.3, AP.26, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **URDEȘ LAURA,
STR.CPT.OCTAV COCĂRĂSCU NR.45 A,
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.GĂRLENI NR.2,
BL.C 86, AP.35, SECTOR 6, BUCUREȘTI,
B, RO;**
• **VIȘAN ADRIANA, STR.FELEACU NR.6,
BL.10 I, SC.2, ET.2, AP.21, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **ICHIM LIVIU-IONEL, STR.HUȘI NR.7,
BL.PA 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**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
MARIA ICHIM & COLAB.
**"STUDIES ON TRANSLOCATION OF
LEAD CONTAMINANTS AND THEIR
ACCUMULATION IN MORUS PLANTS",
THE 39TH INTERNATIONAL SESSION OF
SCIENTIFIC COMMUNICATIONS OF THE
FACULTY OF ANIMAL SCIENCE,
SCIENTIFIC PAPERS, SERIA D,
VOL. LIII - ZOOTEHNIE, PP. 67-70,
BUCHAREST, 2010; EP 0911387 (A2)**

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



RO 128587 B1

1 Inventția se referă la un nou material săditor, reprezentat de vitroplantule de dud
2 *Morus sp.* inoculate cu endomicorize de tip vezicular-arbuscular, și la un procedeu de obți-
3 nere a acestuia, prin metode biotehnologice, acesta urmând a fi utilizat pentru cultivare pe
4 solurile contaminate cu plumb, și pentru practicarea sericulturii, respectiv, pentru obținerea
5 gogoșilor de mătase de la specia *Bombyx mori L.*, destinate industriei textile.

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

10 Valorificând totipotența celulelor și țesuturilor meristematice ale plantelor de dud în
11 scopul donării *in vitro*, s-au obținut rezultate pozitive, menționate în lucrări internaționale și
12 naționale.

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

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

20 Inocularea cu endomicorize vezicular-arbusculare constituie o metodă de cultivare
21 cu efecte benefice în scopul reducerii aplicării de fertilizanți chimici și de pesticide, ca
22 element cheie în abordările durabile din agricultură și horticultură; se știe că micorizele sunt
23 capabile să colonizeze diferite habitate, succesul lor ecologic reflectând un grad ridicat de
24 diversitate a capacităților genetice și fiziologice ale fungilor endofiți. Aproape 6000 de specii
25 de fungi dintre *Zygo-*, *Asco-* și *Basidio-micete* au fost identificate ca micorizale, iar odată cu
26 dezvoltarea tehnicilor moleculare, noi specii micorizale și noi tipuri de asociații sunt descrise
27 pe baza amprentării ADN.

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

34 **Maria Ichim & colab. în “*Studies on translocation of lead contaminants and their*
35 *accumulation in morus plants*”, The 39th International Session of Scientific
36 Communications of the Faculty of Animal Science, Bucharest, Nov. 2010, Scientific
37 papers, seria D, vol. LIII - ZOOTEHNIE, pp. 67-70, se referă la un model experimental
38 pentru obținerea unui material biologic, respectiv, răsaduri de *Morus sp.* necesare evaluării
39 gradului de translocare a contaminanților de plumb, și acumularea acestora în plantele de
40 *Morus sp.***

41 **EP 0911387 (A2)** se referă la o ciupercă izolată și purificată, din genul *Glomus*, care
42 formează o rețea arbusculară de micorize cu plante metalofite *Viola calaminaria* sau *V.*
43 *guestphalica*, și la remedierea pentru agricultură a solului contaminat, folosind noua ciupercă
44 sau sporii săi, care formează o simbioză micorizală cu o plantă metalofită.

45 Problema tehnică pe care o rezolvă invenția de față constă în remedierea pe cale
46 biologică a solurilor contaminate cu plumb, pentru reintroducerea lor în circuitul agricol.

RO 128587 B1

Potențialul biosintetic al rădăcinilor de la dud este puțin studiat, fapt care evidențiază importanța cercetărilor privind stabilirea de clone în condiții <i>in vitro</i> , și experimentarea biofertilizării cu endorize vezicular-arbusculare a vitroplantulelor și a plantulelor de dud.	1 3
Combinarea efectului fungilor de micorize privind ecosistemul plantă-sol la vitro-plantulele de dud creează premisa utilizării cu succes a acestora în fitoremediere, adică în procesul de detoxifiere a mediului poluat cu ajutorul acestor plante, abordare biotehnologică de mare perspectivă.	5 7
Principalul obiectiv al invenției a constat în obținerea unui nou material săditor de dud, printr-un procedeu biotehnologic, sub formă de vitroplantule de dud inoculate cu endomicorize de tip vezicular arbuscular, destinate solurilor contaminate cu plumb.	9
Materialul săditor, conform invenției, constă în vitroplantulele de dud <i>Morus sp.</i> inoculate cu endomicorize de tip vezicular-arbuscular la un minim de 15% din biomasa radiculară, endomicorize provenite din inocul brut de biomasă radiculară de porumb <i>Zea mays</i> sau ceapă <i>Allium cepa</i> , sau inocul comercial care conține linii ale fungilor <i>Glomus mosseae</i> , <i>G. fasciculatum</i> și <i>Sclerocystis sp.</i> , și care au caracteristici genetice identice cu ale formelor parentale, un conținut de proteină de 28,5% și toleranță fiziologică de 100% pe soluri contaminate cu plumb.	11 13 15 17
Procedeu de obținere a vitroplantulelor, conform invenției, constă în multiplicarea <i>in vitro</i> a explantelor nodale rezultate din lăstarii lignificați, stimulați ai mugurilor dorminzi, utilizând mediul de cultură MS, hormonii de multiplicare BAP în doză de 1 mg/l și KIN în doză de 1...2 mg/l, hormonul de înrădăcinare IBA în doză de 1 mg/l, inocularea vitroplantulelor cu inocul brut de biomasă radiculară de porumb <i>Zea mays</i> sau ceapă <i>Allium cepa</i> , în doză de 50 g/1000 g substrat, sau inocul comercial, care conține linii ale fungilor <i>Glomus mosseae</i> , <i>G. fasciculatum</i> și <i>Sclerocystis sp.</i> în doză de 30 mg/1000 g substrat, controlul inoculării prin metoda Trypan blue și selecția vitroplantulelor inoculate prin control randomizat pe diagonala câmpului de repicare la un număr minim de 10 plante/1000 vitroplantule, cât și suprainocularea repetată de cel mult 3 ori; la sfârșitul perioadei de vegetație, existența unui număr de 10% de plante de dud necolonizate va fi considerată în limite normale.	19 21 23 25 27
Invenția prezintă următoarele avantaje:	29
- noul tip de material săditor de dud prezintă o rezistență sporită la agenții patogeni specifici;	31
- sistemul radicular al acestui material săditor permite o mobilizare și o absorbție mai bună a macro- și microelementelor din sol, inclusiv a unor metale grele imobilizate în particulele de sol, realizând astfel și decontaminarea solurilor la nivele optime de conținut;	33
- noul tip de material săditor de dud permite valorificarea terenurilor contaminate cu metale grele (zinc, cupru, plumb) necesare agriculturii, respectiv, sericulturii;	35
- cercetările recente au abordat aspecte privind înființarea unor plantații de dud cu destinație sericolă pe terenurile contaminate cu plumb, ce permit valorificarea economică a acestora prin includerea în circuitul agricol;	37
- cercetările efectuate de către autorii invenției au condus la obținerea unui material săditor de dud cu toleranță fiziologică totală pe solurile contaminate cu plumb.	39 41
Se dă, în continuare, un exemplu concret de realizare a invenției.	
Realizarea invenției constă în parcurgerea următoarelor etape de execuție:	43
- realizarea vitroplantulelor de dud;	
- obținerea inoculului endomicorizal de tip vezicular-arbuscular, sub formă de inocul brut, provenit din biomasa radiculară a plantelor de <i>Zea mays</i> sau <i>Allium cepa</i> , sau sub formă de inocul comercial;	45 47

RO 128587 B1

1 - realizarea de vitroplantule de dud inoculate cu endomicorize de tip vezicular
arbuscular și repicarea acestora;

3 - controlul colonizării prin metoda de colorare cu Trypan blue, selecția vitroplantulelor
de dud inoculate cu endomicorize vezicular-arbusculare din câmpul de repicare, și
5 suprainocularea materialului săditor de dud necolonizat.

Realizarea vitroplantulelor de dud cuprinde parcurgerea unui procedeu de lucru
7 laborios.

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

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

17 Multiplicarea *in 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.

19 Procedeu de lucru parcurge următoarele etape:

Obținerea sursei de explante se realizează prin forțarea lăstarilor lignificați, recoltați
21 din colecția sau plantația de dud, în perioada noiembrie-decembrie, perioadă de repaus
vegetativ. Stimularea se realizează prin simularea condițiilor de dez mugurire, prin amplasarea
23 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
25 sursa de explante.

Sterilizarea materialului vegetal constă într-o operație de spălare cu apă normală de
27 robinet (presterilizare) a lăstarilor, necesară pentru eliminarea mecanică a unor contaminanți.
Lăstarii erbacei sunt tăiați în bucăți de circa 1,5...2,0 cm, fiecare conținând un mugure axilar
29 care va deveni un explant nodal, rezultând totodată și explante apicale. Sterilizarea efectivă
se realizează cu HgCl₂ în concentrație de 0,03% timp de 30 de min, explantele nodale fiind
31 amestecate în continuu în această soluție, după care sunt spălate cu apă distilată timp de
10 min, în 3 reprize. Sterilizarea poate fi realizată și prin utilizarea unei soluții de 3...5% de
33 hipoclorit de potasiu (produsul comercial Domestos).

Inițierea culturii primare (inocularea) are loc în condiții aseptice la hota de flux laminat.
35 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
37 (benzinaminopurina BAP și kinetina KIN) în următoarea combinație de dozaj:

- 39 - 1 mg/l BAP + 1 mg/l KIN, pentru soiurile de dud ce emit ușor rădăcini adventive;
- 1 mg/l BAP + 2 mg/l KIN, pentru soiurile de dud reticente.

Vasele de cultură, precum și mediul de cultură sunt sterilizate prin autoclavare realizată
41 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
43 5,6...5,8.

După inoculare (așezarea explantelor nodale în vasele de cultură sterilizate pe mediul
45 de cultură se face cu respectarea polarității normale), vasele de cultură sunt sterilizate prin
flacăra și obturate cu rola parafilm, fiind trecute în camera de creștere.

47 Incubația culturii inițiale și multiplicarea constau în transferarea în camera de
incubare (de creștere) a vaselor de cultură pentru o perioadă de 15 zile, la o temperatură de

RO 128587 B1

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.	1
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.	3 5
Înrădăcinarea și regenerarea plantelor autonome se realizează atunci când lăstarii dezvoltăți 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 cultură fiind lichid. Menținerea vitroplantulelor în mediul de cultură lichid se realizează prin utilizarea unor punți mici de hârtie 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 păstrează la aceiași parametri. Primele proimordii radiculare apar la un interval de 10...15 zile de la trecerea pe mediul de cultură lichid.	7 9 11 13
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 <i>ex situ</i> 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 pământ 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.	15 17 19 21 23
Obținerea inoculilor endomicorizali de tip vezicular-arbuscular se realizează procedând astfel, pentru obținerea inoculului brut:	25
Din parcelele cultivate cu porumb sau ceapă, se recoltează biomasa radiculară a plantelor, de la o adâncime a solului de 20...30 cm, urmând 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.	27 29 31 33
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.	35
Biofertilizarea vitroplantulelor de dud cu endomicorize se poate realiza și prin folosirea unor biofertilizanți comerciali, specializați pentru tipul vezicular-arbuscular.	37
Realizarea vitroplantulelor de dud inoculate cu endomicorize de tip vezicular-arbuscular, și repicarea acestora cuprind 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 min. După răcire, substratul de repicare este amestecat cu inoculul brut în doză de 50 g/1000 g amestec de substrat, sau în doză de 30 mg inocul comercial/1000 g de substrat. Biofertilizanții comerciali conțin flora activă și linii selectate ale fungilor de <i>Glomus mosseae</i> , <i>G. fasciculatum</i> și <i>Sclerocystis sp.</i>	39 41 43 45
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, asigurând o densitate de 100 plantule/m ² , perioada de inoculare fiind de 45...50 zile. Lucrările	47

RO 128587 B1

1 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
3 se utilizează inoculul comercial.

Controlul colonizării și selecția vitroplantulelor de dud inoculate se realizează prin
5 aplicarea metodei de colorare cu Trypan blue.

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

9 Vitroplantulele de dud necolonizate se vor suprainocula prin administrarea inoculului
brut sau comercial în dozele menționate, în zona radiculară a fiecărei plantule, toate plantele
11 urmând a fi udate zilnic, timp de 7 zile, apoi udările următoare devenind săptămânale.
Suprainocularea se poate repeta de cel mult 3 ori; la sfârșitul perioadei de vegetație,
13 existența unui număr de 10% de plante de dud necolonizate este considerată în limite
normale.

15 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
17 de 26,5% la vitroplantulele fără endomicorize. Vitroplantulele de dud colonizate cu endomi-
corize au prezentat o rată de supraviețuire de 100% pe substrat contaminat cu plumb,
19 manifestând o toleranță fiziologică totală.

Biotehnologiile utilizate pot fi aplicate în toate laboratoarele și centrele de
21 biotehnologii, la scară industrială. Rezultatele cercetărilor care au permis obținerea noului
tip de material săditor de dud s-au testat în condiții de producție industrială, obținându-se un
23 număr de peste 10000 vitroplantule de dud inoculate cu endomicorize de tip vezicular-arbus-
cular, pe durata unei luni normale de lucru. Toate terenurile contaminate cu plumb pot fi
25 cultivate cu noul tip de material săditor de dud, pentru practicarea sericulturii, activitate
agricolă nealimentară.

1. Vitroplantule de dud *Morus sp.* inoculate cu endomicorize de tip vezicular-arbuscular la un minim de 15% din biomasa radiculară, endomicorize provenite din inocul brut de biomasă radiculară de porumb *Zea mays* sau ceapă *Allium cepa*, sau inocul comercial care conține linii ale fungilor *Glomus mosseae*, *G. fasciculatum* și *Sclerocystis sp.*, și care au caracteristici genetice identice cu ale formelor parentale, un conținut de proteină de 28,5% și toleranță fiziologică de 100% pe soluri contaminate cu plumb. 3 5 7
2. Procedeu de obținere a vitroplantulelor de dud *Morus sp.* definite la revendicarea 1, care constă în multiplicarea *in vitro* a explantelor nodale rezultate din lăstarii lignificați, stimulați ai mugurilor dorminzi, utilizând mediul de cultură MS, hormonii de multiplicare BAP în doză de 1 mg/l și KIN în doză de 1...2 mg/l, hormonul de înrădăcinare IBA în doză de 1 mg/l, inocularea vitroplantulelor cu inocul brut de biomasă radiculară de porumb *Zea mays* sau ceapă *Allium cepa*, în doză de 50 g/1000 g substrat, sau inocul comercial, care conține linii ale fungilor *Glomus mosseae*, *G. fasciculatum* și *Sclerocystis sp.* în doză de 30 mg/1000 g substrat, controlul inoculării prin metoda Trypan blue și selecția vitroplantulelor inoculate prin control randomizat pe diagonala câmpului de repicare, la un număr minim de 10 plante/1000 vitroplantule, cât și suprainocularea repetată de cel mult 3 ori; la sfârșitul perioadei de vegetație, existența unui număr de 10% plante de dud necolonizate este considerată în limite normale. 9 11 13 15 17 19

