



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2011 01244

(22) Data de depozit: 28.11.2011

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

(71) Solicitant:
• STAȚIUNEA DE CERCETARE
DEZVOLTARE PENTRU POMICULTURĂ
CLUJ, STR. HORTICULTORILOR NR. 5,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(72) Inventatori:
• CLAPA DOINA, STR. TARNIȚA NR.5,
AP.6, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• FIRA ALEXANDRU, ALEEA BORȘA
NR. 5-7, BL. U 50, SC. III, AP. 25,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(54) PROCEDEU DE MULTIPLICARE ȘI ÎNRĂDĂCINARE IN VITRO
LA PRUNUS DOMESTICA

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la un procedeu de multiplicare și înrădăcinare *in vitro* la prun, pe medii nutritive artificiale cu consistență semisolidă, conținând amidon din grâu și agent de gelificare. Conform invenției, purunul (*Prunus domestica*) este înmulțit pe mediu nutritiv Murashige & Skoog modificat, la care se adaugă 0,5 mg/l 6-benzilamino purină și 50 g/l amidon ca agent de gelificare, și este înrădăcinat pe același mediu, gelificat cu amidon, dar fără hormoni în compoziție. Componentele se adaugă în compoziție înainte de autoclavare, în autoclavă la 121°C se face sterilizarea

timp de 30 min. Explantele utilizate pentru cultura *in vitro* sunt fragmente de lăstari de 1...2 cm, inoculate câte 5...7/vas pentru faza de multiplicare și 15/vas pentru faza de înrădăcinare. Culturile se incubează în camera de creștere cu climat controlat la 23...26°C, aplicându-se lumină cu intensitate de circa 2400 lucși pe perioade de 16 h/zi. Ciclurile de multiplicare sunt de 2...3 luni, iar cele de înrădăcinare *in vitro*, de 1...2 luni, rezultând material vegetal de calitate superioară.

Revendicări: 4



a 2011 cl 264
2011

Procedeu de multiplicare și înrădăcinare *in vitro* la *Prunus domestica*

Descrierea invenției

Invenția se referă la un procedeu destinat multiplicării și înrădăcinării *in vitro* la prun (*Prunus domestica*) utilizând ca mediu bazal mediul Murashige & Skoog (1962) modificat, iar ca agent de gelificare amidonul din grâu, în concentrație de 50g/l de mediu.

Este cunoscut faptul că înmulțirea *in vitro* la speciile pomicele poate fi utilizată pe scară largă atât pentru înmulțirea rapidă a unor soiuri sau varietăți dar și ca metodă de eliberare de agenți patogeni din materialul săditor sau stocarea germoplasmei prin crioconservare.

De asemenea, se știe că înmulțirea *in vitro* la prun este o verigă importantă în procesul de devirozare a prunului prin chimioterapie și termoterapie (Paunovic S. și alții, 2007; Hauptmanová A. și Polák, J. 2011).

De asemenea, este cunoscut faptul că pentru cultura *in vitro* la prun s-a utilizat, de obicei, ca mediu bazal Murashige & Skoog (1962) adăugat cu 6-benzilaminopurină (BAP), acid indolilbutiric (AIB) și acid giberelinic (GA₃), în diverse concentrații, pentru faza de inițiere și multiplicare, iar pentru faza de înrădăcinare cu diferite concentrații de AIB. Concentrația de BAP a variat la diverși autori: 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 mg/L (Leontiev-Orlov O. și alții, 2000; Lucic P. și alții, 2000; Rogalski M. și alții, 2003; Vorpsi V. și alții, 2010). Aceste variante de medii nutritive au în compoziția lor mai mulți fitohormoni și în concentrații mai mari, fapt ce influențează atât calitatea vitroplantulelor cât și prețul de cost.

Se știe că, în mod obișnuit, în mediile nutritive artificiale utilizate pentru culturile *in vitro* de țesuturi și organe vegetale este utilizat agarul ca și agent de gelificare, acesta având rolul de a susține explantele și, de asemenea, rolul de a regla presiunea osmotică, prevenind astfel hiperhidricitatea plantelor cultivate *in vitro*. Pentru gelificarea mediului nutritiv la prun literatura de specialitate arată că singurul agent de gelificare utilizat este agarul, cunoscut fiind faptul că acesta este, de obicei, componenta cea mai scumpă a mediilor nutritive și reprezintă un procent însemnat din prețul de cost al mediilor nutritive, influențând astfel semnificativ costul culturilor *in vitro*. Ca alternative pentru agar, în special pentru reducerea cheltuielilor, în literatura de specialitate se menționează că pentru gelificarea mediilor de cultură la alte specii horticoale s-a mai folosit guma guar, isubgol, vege-gel, gelrite (Jain R. și S. B Babbar, 2005; Clapa D. și alții, 2008; Fira Al. și Clapa D., 2008; Clapa D. și Fira Al., 2010).

Prezenta invenție are ca scop realizarea unui procedeu mai avantajos de multiplicare și înrădăcinare *in vitro* la prun care asigură obținerea de material vegetal de calitate și la un preț mai scăzut datorită faptului că agarul folosit până în prezent la gelificarea mediilor de cultură la această specie este înlocuit cu amidonul de grâu iar fitohormonii utilizați sunt de asemenea reduși (în faza de multiplicare) sau eliminați total (în faza de înrădăcinare).

De asemenea, utilizarea amidonului ca și agent de gelificare elimină necesitatea utilizării AIB în mediul nutritiv, care este un hormon vegetal sintetizat artificial și aplicat exogen și poate duce la fenomene fiziologice nedorite (calusarea bazelor explantelor, inhibiția creșterii). Pe mediul gelificat cu amidon are loc înrădăcinarea naturală, optimă, neasistată de hormoni exogeni.

Procedeu, conform invenției, constă în cultura *in vitro*, în scop de multiplicare și/sau înrădăcinare la *Prunus domestica* (prun) pe medii nutritive artificiale cu consistență semisolidă, în componența sus-numitelor medii nutritive utilizându-se amidon din grâu ca și agent de gelificare.

Mediul nutritiv se prepară utilizându-se soluții-stoc de macroelemente și microelemente Murashige & Skoog (1962), FeNaEDTA sub formă de pulbere, soluții-stoc de vitamine și 6-benzilaminopurină iar ca sursă de carbon, zahăr cristal din comerț (Tabel 1). După dozarea și

amestecarea componentelor, pH – ul mediului se ajustează la 5,8 utilizându-se o soluție diluată de hidroxid de sodiu (NaOH). Pentru etapa de înrădăcinare mediul de cultură are aceleași componente din tabelul 1 dar fără 6-benzilaminopurină.

După ajustarea pH-ului, volumul de mediu nutritiv se împarte în două vase: cca $\frac{3}{4}$ din cantitate se pune la fiert iar cu restul de $\frac{1}{4}$ se prepară, la rece, o suspensie de amidon cu doza de amidon care urmează să fie adăugată la mediu. După ce volumul de mediu nutritiv pus la fiert a dat în clocot, suspensia rece de amidon se adăugă încet la mediul nutritiv fierbinte, amestecându-se continuu. După ce mediul cu amidonul încorporat a dat în clocot se repartizează prin turnare în vasele de cultură (borcane de 720 ml cu capac cu filet), câte 100 ml de mediu/vas. Vasele de cultură se închid etanș cu capace prevăzute cu filtru bacteriologic și apoi se sterilizează în autoclav la 121 °C timp de 30 de minute. După sterilizare se lasă să se răcească.

Inoculările pe mediile nutritive gelificate cu amidon se fac în condiții sterile, la hota cu flux laminar orizontal de aer steril. Se inoculează fragmente de lăstari de 1-2 cm lungime, câte 5-7 inoculi/vas pentru faza de multiplicare și 15 inoculi/vas pentru faza de înrădăcinare. După 2-3 luni de cultură *in vitro* rezultă lăstari ce pot fi trecuți pe mediul de înrădăcinare, iar rădăcinile se formează în 1-2 luni.

Culturile se incubează în camera de creștere cu climat controlat la temperaturi de 23-26 °C și lumină cu intensitatea de cca 2400 lucși. Fotoperioda este de 16 ore/zi. După înrădăcinare, noile plântuțe vor fi aclimatizate și utilizate în scopul pentru care au fost produse.

Tabel 1. Componenta mediului de cultură

Componenta	Concentrația
Săruri MS*	Concentrație întreagă
Myo-inozitol	100 mg/l
Vitamina B ₁	1 mg/l
Vitamina B ₆	0,5 mg/l
Acid nicotinic	0,5 mg/l
6-benzilaminopurina	0,5 mg/l
Zahăr	30 g/l

* Murashige & Skoog (1962)

Se dă în continuare un exemplu de utilizare a procedurii în cazul multiplicării și înrădăcinării *in vitro* la soiul de prun 'Ivan'. În faza de multiplicare *in vitro* a acestui soi s-a utilizat mediul de cultură prezentat în acest procedeu, gelificat cu agar în cantitate de 6g/l, obținându-se o rată de proliferare de 10-19 lastari/explant, respectiv o medie de 14,7 lastari/explant. Procentul de înrădăcinare pe mediul agarizat și adăugat cu 1mg/l AIB a fost de 75%. Pe mediul de cultură gelificat cu 50g/l amidon din grâu rata de proliferare a acestui soi a avut valori similare dar lăstarii au fost mai lungi și mai viguroși. Mediul de cultură gelificat tot cu 50g/l amidon din grâu folosit pentru înrădăcinarea soiului 'Ivan' a asigurat un procent de înrădăcinare de 90% cu toate că în mediu nu s-a mai adăugat 1mg/l AIB. Prezentul procedeu, pe lângă faptul că asigură o mai bună dezvoltare a plantelor și o rată de înrădăcinare superioară celei de pe mediului agarizat, determină scăderea prețului de cost a mediului de cultură cu 1,6-1,8 lei/l de mediu (cantitatea de amidon necesară gelificării unui litru de mediu costă 0,3 lei iar cea de agar costa 2,1 lei)

Prin aplicarea invenției, se obțin următoarele avantaje:

- reducerea cheltuielilor în procesul de înmulțire *in vitro* la prun prin eliminarea agarului din mediul de cultură, care este un agent de gelificare costisitor și înlocuirea lui cu amidon din grâu. Pretul amidonului/ litru de mediu nutritiv este de 5-7 ori mai mic față de cel al agarului. De

asemenea, în cazul înrădăcinării prunului pe mediul gelificat cu amidon nu este necesară adăugarea în mediul de cultură a acidului 3-indolilbutyric care se folosește în cazul utilizării mediului gelificat cu agar iar în faza de multiplicare se reduce numărul și concentrația de fitohormoni din mediul de cultură utilizându-se numai 0,5 mg/l 6-benzilaminopurină .

- simplificarea componentelor mediului de cultură prin eliminarea și reducerea fitohormonilor;

- creșterea calității materialului vegetal obținut, amidonul asigurând o mai bună creștere și dezvoltare a plantelor *in vitro*, obținându-se material vegetal deosebit de viabil.

Literatura citată.

Clapa D., Al. Fira, T. Rusu, 2008, The use of Isubgol and Sequestrene 138 for the *in vitro* propagation of the highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.), Journal of Food, Agriculture & Environment – JFAE Vol 6. (1) – 2008, p. 132-134

Clapa D., Al. Fira, 2010, Alternative Gelling Agents for the Micropropagation of some Horticultural Species, Bulletin UASVM, nr. 67 (1)/2010, Horticulture, Print ISSN 1843-5254; Electronic ISSN 1843-5394,. Pp.

Fira Al., D. Clapa, 2008, The Influence of the Gelling Agent upon Multiplication Rate in *Sequoia Sempervirens*, Buletinul USAMV-CN, 65 (1) /2008 (-), ISSN 1454-2382, p.463

Hauptmanová A., Polák, J. 2011. The elimination of *Plum pox virus* in plum cv. Bluefree and apricot cv. Hanita by chemotherapy of *in vitro* cultures, Hort. Sci. (Prague), 38:49–53.

Jain R., S. B Babbar (2005), Guar gum and isubgol as cost-effective alternative gelling agents for *in vitro* multiplication of an orchid, *Dendrobium chrysotoxum*, Current Science, 88.(2):292-295.

Leontiev-Orlov, O., Rogalski, M., Mossi, A.J., Cansian, R.L 2000, 6-benzilaminopurina (BAP) na multiplicação *in vitro* de prunáceas (*Prunus* sp.), Rev. Bras. de AGROCIÊNCIA, v.6 no1:42-46.

Lucic, P., Paunovic, G., Djuric, G., Ruzic, D. 2000. Rooting in the mother plantation and *in vitro* culture of plum rootstocks selected from populations of autochthonous *Prunus domestica* L. and *Prunus cerasifera* Ehrh. genotypes. Acta Hort. (ISHS) 517:183-188

Murashige T., Skoog F., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture, Physiol. Plant 15, 473-497.

Paunovic, S., Ruzic, D., Vujovic, T., Milenkovic, S., Jevremovic D. 2007. *In vitro* production of *plum pox virus* - free plums by chemotherapy with ribavirin, Biotechnol. & Biotechnol. Eq. 21/2007/4:417-421.

Rogalski, M., Guerra, M.P., Da Silva, A.L.2003, *In vitro* multiplication of 'Santa Rosa' plum: effect of cytokinin BAP, Rev. Bras. Frutic. [online], vol.25, n.2: 365-367.

Vorpsi, V., Harizaj, F., Vjollca ,V. 2010. Effect of different concentration of benzylaminopurine (BAP) on *in vitro* shoot proliferation albanian autochthon plum cv Shengjine, Research Journal of Agricultural Science, 42 (2):295-300

Revendicări

1. Procedeu de multiplicare și înrădăcinare *in vitro* la *Prunus domestica* **caracterizat prin aceea că** mediul nutritiv utilizat este Murashige & Skoog (1962), modificat, gelificat cu amidon din grâu în concentrație de 50 g/l, adăugat cu 0,5 mg/l 6-benzilaminopurina pentru multiplicare și fără fitohormoni pentru înrădăcinare.
2. Procedeu de multiplicare *in vitro* la *Prunus domestica* **caracterizat prin aceea că** mediul nutritiv utilizat este Murashige & Skoog (1962), modificat, gelificat cu amidon din grâu în concentrație de 50 g/l și adăugat cu 0,5 mg/l 6-benzilaminopurina.
3. Procedeu de înrădăcinare *in vitro* la *Prunus domestica* **caracterizat prin aceea că** mediul nutritiv utilizat este Murashige & Skoog (1962), modificat, gelificat cu amidon din grâu în concentrație de 50 g/l fără hormoni de creștere.
4. Metodă de gelificare a mediilor nutritive pentru înmulțirea *in vitro* la specia *Prunus domestica* **caracterizată prin aceea că** agentul de gelificare este amidonul din grâu în cantitatea de 50 g/l de mediu nutritiv care se încorporează în mediu astfel: mediu nutritiv se împarte în două vase: cca $\frac{3}{4}$ din cantitate se pune la fiert iar cu restul de $\frac{1}{4}$ se prepară, la rece, suspensia de amidon. După ce volumul de mediu nutritiv pus la fiert a dat în clocot, suspensia rece de amidon se adăugă încet la mediul nutritiv fierbinte, amestecându-se continuu. După ce mediul cu amidonul încorporat a dat în clocot se repartizează prin turnare în vasele de cultură. Vasele de cultură se închid etanș cu capace prevăzute cu filtru bacteriologic și apoi se sterilizează în autoclav la 121 °C timp de 30 de minute.