



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2012 00383**

(22) Data de depozit: **30.05.2012**

(41) Data publicării cererii:
28.02.2014 BOPI nr. **2/2014**

(71) Solicitant:
• **INSTITUTUL DE CERCETARE-
DEZVOLTARE PENTRU PROTECȚIA
PLANTELOR,**
*BD. ION IONESCU DE LA BRAD NR.8,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO*

(72) Inventatori:
• **FĂTU VIOREL, STR. HĂȚIȘULUI NR. 5,**
*BL. H12, SC. 1, ET. 1, AP. 5, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;*
• **LUPU CARMEN, INTR.BĂRSEI NR. 5,**
*BL. G3, SC. 1, ET. 2, AP. 25, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO*

(54) **REȚETĂ DE COLORANT PENTRU EVIDENȚIEREA PRIN
MICROSCOPIE OPTICĂ A FITOPLAS-MELOR ÎN ȚESUTURI
VEGETALE**

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la o compoziție de colorant, cu care sunt colorate toate structurile morfologice intracelulare, în vederea evidențierii prin microscopie optică a fitoplasmelor în țesuturi vegetale, destinată diagnosticării plantelor infectate, constând din roșu Congo, eozină Sudan III, albastru de metilen, clorură de sodiu, etanol, apă și cristale de iod. Prin colorarea

țesuturilor folosind această compoziție, fitoplasmele din grupul proliferării măruului își păstrează viabilitatea cel puțin 4 h.

Revendicări: 1
Figuri: 8



Rețetă de colorant pentru evidențierea prin microscopie optică a fitoplasmelor în țesuturi vegetale

Prezenta invenție se referă la un amestec de substanțe colorante, format din roșu Congo, eozina, Sudan III, albastru de metilen, clorură de sodiu, etanol, apă și cristale de iod, amestec destinat evidențierii prin microscopie optică a fitoplasmelor în țesuturile vegetale, în domeniul diagnozei fitopatologice.

Fitoplasmele, cunoscute anterior ca organisme de tip micoplasma, sunt procariote din clasa *Mollicute* (Roger Shivas și Dean Beasley, 2005). Ele sunt similare bacteriilor, dar nu dispun de un perete celular rigid și nu pot trăi liber în mediu. Fitoplasmele se găsesc în celulele țesutului floemic al plantelor și, de cele mai multe ori, sunt transmise de insectele vectoare. Fitoplasmele sunt paraziți obligati și își finalizează ciclul de viață în țesuturile gazdă. Ele provoacă boli într-o gamă largă de plante gazde. Până de curând, principalele metode folosite pentru a identifica și distinge bolile date de fitoplasme au fost simptomatologia, gama de gazde, specificitatea vectorului și microscopia electronică de transmisie a secțiunilor ultrasubtiri de țesut bolnav. Dezvoltarea tehnicilor moleculare pe bază de ADN, în special a primerilor PCR specifici pentru fitoplasme, concepuți pe baza secvențelor de gene înalt conservative de acid ribonucleic ribozomal (ARNr) de 16S, au îmbunătățit considerabil capacitatea de a detecta și identifica fitoplasmele.

Deși fitoplasmele au fost detectate în țesuturile vegetale și insectele afectate prin utilizarea de tehnologii bazate pe microscopia electronica de transmisie, anticorpi și acizi nucleici, ele sunt incapabile de a fi cultivate *in vitro*. Fitoplasmele nu pot fi deosebite morfologic sau ultrastructural folosind microscopia electronică sau optică (CABI, 2009).

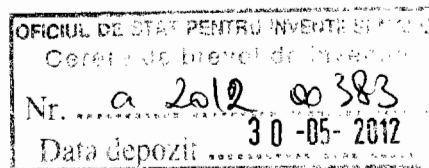
Sunt cunoscute în principal două rețete de coloranți: DAPI și Dienes folosite în evidențierea fitoplasmelor prin microscopie optică.

Rețeta de colorant Dienes după Deleey și alții, 1979 și Hibben și alții 1986:

2,5g albastru de metilen,
1,25g azure 11,
10,0g maltoză,
0,25g carbonat de sodiu,
100 ml apă distilată.

Rețeta de colorant după Sinclair și alții, 1989

4',6-diamidino-2-fenilindol,
Apă distilată.



Dezavantajul acestor rețete constă în faptul că nu diferențiază suficient structurile morfologice celulare pentru a genera o imagine de calitate superioară la microscopul optic.



Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a evidenția mult mai ușor și mai repede infecțiile cu fitoplasma în țesuturile vegetale prin intermediul microscopiei optice. Rezultatele diagnosticării plantelor infectate prin microscopie optică folosind această rețetă de colorant se încadrează în domeniul de siguranță oferit de diagnosticare microscopică optică ce folosește colorarea DAPI și Diens, dar cu o claritate și o rezoluție mai bună a imaginii (Fig.1, Fig. 2 Fig.3). Rezoluția imaginilor obținute prin microscopie optică folosind această rețetă se apropie de cea a imaginilor obținute prin microscopie electronică Fig. 4, Fig.5 Fig. 6).

Originalitatea rețetei de colorant constă în simplitatea realizării ei și în accentul pus pe colorarea tuturor structurilor morfologice intercelulare.

Elementul de noutate constă în faptul că prin colorarea țesuturilor folosind această rețetă, fitoplasmele din grupul proliferației mărului își păstrează viabilitatea cel puțin patru ore. Viabilitatea este verificată prin mobilitatea celulelor de fitoplasmă, ceea ce indică o activitate ridicată a pompelor de ioni din membranele celulare. Rețeta de colorant a fost folosită cu succes în evidențierea fitoplasmelor Proliferarea mărului (Fig. 7) și Flavașcența viței de vie (Fig. 8).

Amestecul de substanțe colorante conform invenției este constituit din:

- | | |
|------------------------|----------------------|
| a) Roșu Congo | 64 mg |
| b) Eozină | 18 mg |
| c) Sudan III | 6,5 mg |
| d) Albastru de metilen | 6 mg |
| e) Clorură de sodiu | 200 mg |
| f) Cristale de iod | 2-3 cristale de 2 mm |
| g) Etanol 97% | 1 ml |
| h) Apă | 10 ml |

Mod de preparare: se cântăresc toate substanțele, se adaugă toate în etanol, se omogenizează bine, apoi se completează cu cantitatea de apă de 10 ml. Se lasă în repaus câteva zile, apoi se poate folosi în colorarea secțiunilor vegetale prin cufundarea acestora într-o picătură de colorant.

Bibliografie

1. Management of Plant Pathogen Collections, Roger Shivas and Dean Beasley, Commonwealth of Australia 2005;
2. Detection of Phytoplasma Associated with Yellow Streak Disease of Date Palms (Phoenix dactyliferaL.) in Egypt, Ammar, M.I¹ ; M. A. Amer ² and M. F. Rashed ¹ Egyptian J. Virol. 2, 74-86 (2005)
3. Characterization and Classification of Phytoplasmas Associated with Oil Palm (Elaeis guineensis), E. Alvarez and J.L Claroz, http://ciatlibrary.ciat.cgiar.org/Articulos_Ciat/phytoplasmas_oil_palm_alvarez.pdf: 02-05-2012
4. Congo red, http://en.wikipedia.org/wiki/Congo_red
5. Eosin, <http://en.wikipedia.org/wiki/Eosin>
6. Sudan III, http://en.wikipedia.org/wiki/Sudan_III
7. Methylene blue, http://en.wikipedia.org/wiki/Methylene_blue



Revendicări

1. Rețetă de colorant pentru evidențierea prin microscopie optică a fitoplasmelor în țesuturi vegetale, destinată diagnosticării plantelor infectate, **caracterizată prin aceea că** este constituită din: roșu Congo 64 mg, eozină 18 mg, Sudan III 6,5 mg, albastru de metilen 6 mg, clorură de sodiu 200 mg, etanol 97% 1 ml, apă 10 ml și 2 – 3 cristale de iod de 2 mm.



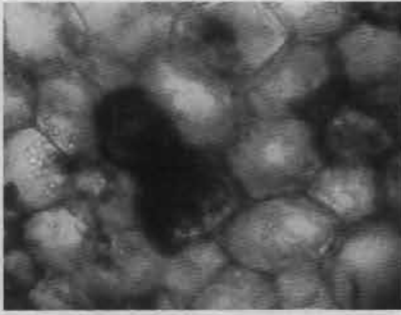


Fig. 1 Colorare DAPI, autor: Fătu Viorel

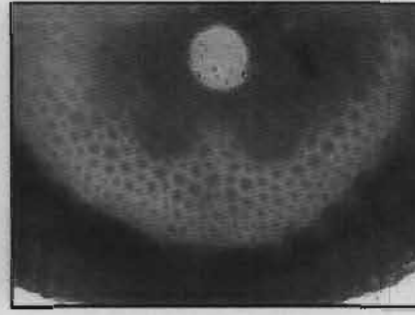


Fig.2 Colorare Dienes, autori: E. Alvarez and J.L. Claroz

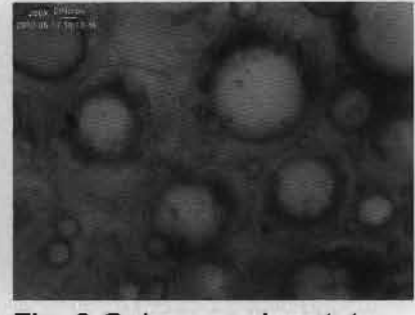


Fig. 3 Colorare prin rețeta de colorant propusă, autor: Fătu Viorel

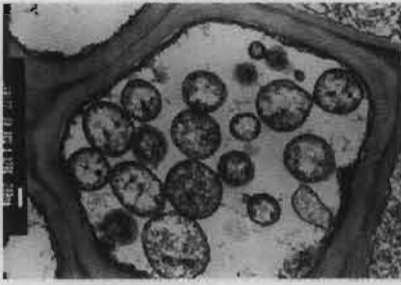


Fig.4 Microscopie electronică, autor: Assunta Bertaccini

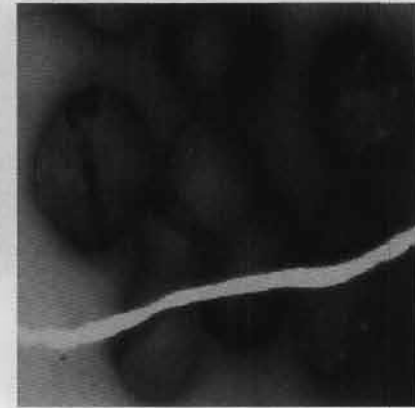


Fig.5 Microscopie electronică, autor: Fătu Viorel

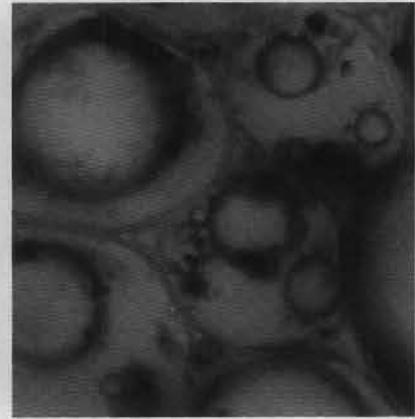


Fig. 6 Microscopie electronică, autor: Fătu Viorel

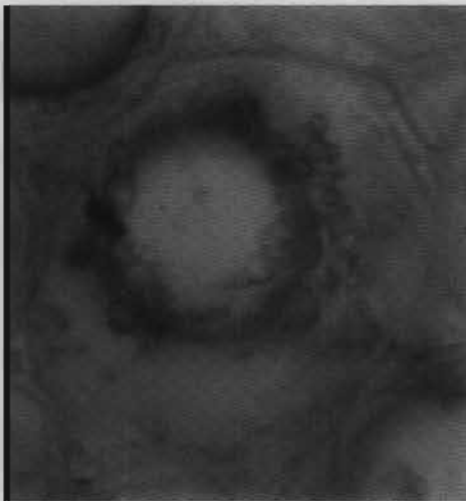


Fig.7 Proliferarea mărului, autor Fătu Viorel

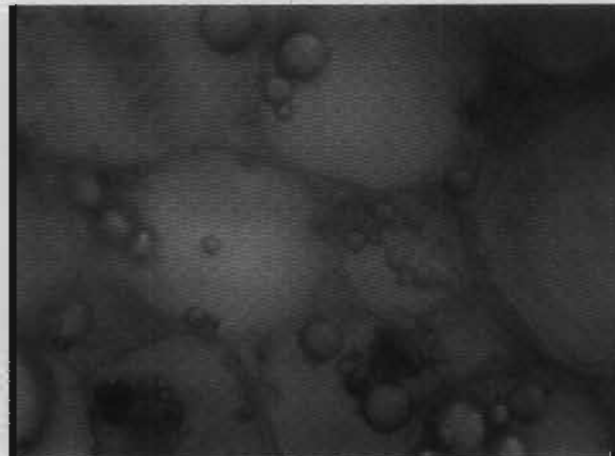


Fig.8 Flavașcența viței de vie, autor Fătu Viorel