



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2016 00628**

(22) Data de depozit: **12/09/2016**

(41) Data publicării cererii:
30/03/2018 BOPI nr. **3/2018**

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA DIN PITEȘTI,
STR. TÂRGU DIN VALE NR.1, PITEȘTI, AG,
RO

(72) Inventatori:
• TOPALĂ CARMEN MIHAELA,
STR. STOLNIC CONSTANTIN
CANTACUZINO, BL. D4, SC. B, AP. 9,
PITEȘTI, AG, RO;

• TĂTARU LAVINIA DIANA,
STR. PALTINULUI NR. 18, BL. A37, SC. B,
AP. 1, PITEȘTI, AG, RO;
• GUȚĂ IONELA-CĂTĂLINA,
CALEA BUCUREȘTI, BL. U4, AP. 22,
PITEȘTI, AG, RO;
• BUCIUMEANU ELENA-COCUȚA,
CALEA CRAIOVEI, BL. 40 BIS, SC. A, AP. 8,
PITEȘTI, AG, RO;
• BĂDĂRĂU CARMEN LILIANA, STR. ZIZIN
NR. 31, BL. 9, SC. D, AP. 6, BRAȘOV, BV,
RO

(54) **PROCEDEU DE ELIMINARE A VIRUSURILOR
LA VIȚA-DE-VIE ȘI CARTOF PRIN
ELECTRO-CHIMIOTERAPIE**

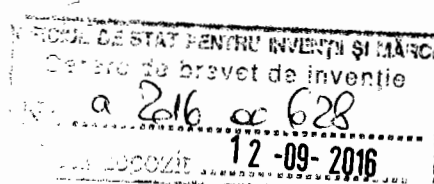
(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de regenerare a plantelor de viță de vie și cartof infectate cu virusuri. Procedeu conform invenției constă în eliminarea virusurilor prin electro-chimioterapia fragmentelor de lăstari de la plante infectate, utilizând curentul electric în cuva de electroforeză orizontală cu 30...120 mA, timp de 5...15 min, și cultivarea *in vitro* a lăstarilor tratați electric pe un mediu steril, suplimentat cu un amestec de

ribavirină 15...30 mg/l și oseltamivir 30...50 mg/l; materialul biologic este supus proceselor de organogeneză, rezultând plante de viță de vie regenerare, libere de virusurile scurtnodării, asociate răsucirii frunzelor și virusul fleck, respectiv, plante de cartof regenerare, libere de virusurile X și Y, serotipurile 1 și 2.

Revendicări: 1





18

PROCEDEU DE ELIMINARE A VIRUSURILOR LA VIȚA-DE-VIE ȘI CARTOF, PRIN ELECTRO-CHIMIOTERAPIE

DESCRIEREA INVENȚIEI

Invenția se referă la un procedeu de eliminare a virusurilor la vița-de-vie și cartof prin aplicarea succesivă a două metode: electroterapia în cuva de electroforeză orizontală și chimioterapia *in vitro*. Procedeu este aplicabil virusurilor:

- virusul scurtnodării, virusurile asociate răsucirii frunzei serotipurile 1+3 și virusul fleck la vița-de-vie;
- virusurile X și Y serotipurile 1 și 2 la cartof.

Metodele clasice de obținere de plante libere de virusuri la plante horticoale sunt cultura de meristem și/sau termoterapia.

Aceste metode prezintă dezavantajele dificultății izolării meristemului de dimensiuni cât mai mici (0,2–0,3 mm), cerințele multiple necesare pentru asigurarea viabilității explantului, necesitatea echipamentelor mari consumatoare de energie, perioadă lungă de obținere a plantelor sănătoase, dependența ratelor de însănătoșire de tipul virusului și mărimea explantului.

Necesitatea obținerii unei cantități suficiente de material horticol sănătos a dus la apariția și dezvoltarea metodelor alternative de devirozare: chimioterapia *in vitro*, electroterapia, crioprezervarea, sau combinații ale acestora, metode ale căror mecanisme de acțiune nu au fost încă elucidate în totalitate. Principiile prin care există posibilitatea blocării multiplicării virale sunt cunoscute (Awan și colab., 2007; Hormozi-Nejad și colab., 2010; Nasir și colab., 2010; Bayati și colab., 2011; Panattoni și colab., 2013), însă parametrii de lucru necesită experimentare.

Problema pe care o rezolvă invenția este aceea de obținere de plante de vița-de-vie și cartof, libere de virusuri cu largă răspândire și impact economic negativ asupra acestor culturi, în timp mai scurt și cu consum redus de energie, comparativ cu metodele clasice de devirozare.

Conform invenției, regenerarea de plante sănătoase se bazează pe blocarea multiplicării virale prin acțiunea cumulată a curentului electric și a unui amestec de chimioterapice, într-o succesiune de etape bine stabilite numite electro-chimioterapie.

Electro-chimioterapia, conform invenției constă în utilizarea curentului electric în cuva de electroforeză orizontală care inhibă multiplicarea virală prin creșterea temperaturii la



nivel celular (González, și colab., 2006), și a chimioterapicelor ribavirină și oseltamivir, inhibitoare ale unor enzime care întrerup lanțul multiplicării virale (De Clercq, 2002).

Procedeul de obținere de plante de viță-de-vie și cartof libere de virusuri, conform invenției, constă în: tratamentul în cuva de electroforeză orizontală cu 30...120 mA timp de 5...15 min a fragmentelor de plantă infectate și cultivarea acestora pe un mediu de cultură steril, suplimentat cu amestecul de ribavirină 15...50 mg/L și oseltamivir 30...50 mg/L.

Desfășurarea proceselor de organogeneză, de multiplicare a materialului biologic rezultat prin proliferarea lăstarilor, înrădăcinarea *in vitro* au loc în condiții controlate în camere de creștere: temperatura 18...25°C, fotoperioada 16 ore lumină și iluminarea 3000-3500 lx.

Minilăstarii înrădăcinați sunt aclimatizați conform tehnologiei de regenerare a viței-de-vie și cartofului prin cultură *in vitro*.

Plantele regenerate sunt testate în vederea alcătuirii loturilor de plante libere de virusurile ce le-au infectat inițial.

Invenția prezintă următoarele avantaje comparativ cu metodele clasice, termoterapia și cultura de meristem:

- utilizează un procedeu simplu, economic și eficient, destinat eradicării celor mai păgubitoare virusuri ce pot infecta vița-de-vie și cartoful, prin acțiunea combinată a curentului electric și a chimioterapicelor;

- reduce timpul de regenerare a plantelor de viță-de-vie și cartof libere de virusurile menționate cu 40...50%;

- utilizează minim de echipamente pentru tratamentul în cuva de electroforeză orizontală și cultura *in vitro*, înlăturându-se astfel procesele tehnologice energofage care utilizează un număr mare de aparate și instalații;

- prin folosirea apexurilor intens regenerative și a fragmentelor nodale, ca tip de explante, se elimină inconvenientul ratei mici de viabilitate a explantelor de dimensiuni reduse;

- este o metodă prietenoasă mediului, protocolul de lucru se desfășoară în condiții controlate oferite de cultura *in vitro*, fără utilizarea de substanțe poluante.

Se dă în continuare un exemplu de realizare a invenției.

Electro-chimioterapia constă în tratamentul în cuva de electroforeză orizontală cu 30...120 mA, timp de 5...15 min a fragmentelor de lăstari provenite de la plantele infectate.

Minilăstarii tratați electric se fasonează și se dezinfectează cu hipoclorit de calciu 6-10%, timp de 4...7 min, după o imersare în alcool etilic 80%.



Spălarea materialului biologic de agentul sterilizant se realizează prin 3-4 clătiri succesive cu apă distilată sterilă.

După dezinfectia materialului vegetal, explantele se inoculează în condiții sterile la hota cu flux de aer laminar, pe mediu de cultură M&S (Murashige și Skoog, 1962) suplimentat cu antiviralele ribavirină și oseltamivir, după ce în prealabil a fost distribuit în vase de cultură și autoclavat la 120°C și 1 atm. timp de 10 min.

Vasele de cultură inoculate se incubează în camere de creștere la temperatura 18...25°C, fotoperioada 16 ore lumină și iluminarea 3000-3500 lx, o perioadă de 1...3 subculturi pe mediu de multiplicare specific viței-de-vie și cartofului, urmate de o subkultură pe mediu de înrădăcinare.

Vitroplantele înrădăcinate sunt aclimatizate conform tehnologiei de regenerare a viței-de-vie și cartofului prin cultură *in vitro*: se spală de resturile de agar și se plantează în ghivece pe substrat de turbă îmbogățită cu substanțe nutritive.

Plantele regenerate sunt testate în vederea alcătuirii loturilor de plante libere de virusuri.

Plantele de viță-de-vie și cartof, regenerate libere de virusuri constituie sursa de material de înmulțire certificat.



REVENDICĂRI

1. Procedul de regenerare de plante de viță-de-vie libere de virusul scurtnodării, virusurile asociate răsucirii frunzei serotipuri 1+3 și virusul fleck, precum și de obținere de material de înmulțire de cartof liber de virusurile X și Y serotipurile 1 și 2, caracterizat prin aceea că, protocolul de lucru constă în: tratamentul în cuva de electroforeză orizontală cu 30...120 mA timp de 5...15 min a fragmentelor de lăstari prelevați de la plantele infectate, dezinfecția cu hipoclorit de calciu 6-10% timp de 4...7 min, inocularea pe mediul de cultură specific viței-de-vie și cartofului, suplimentat cu antiviralele ribavirină 15...50mg/L și oseltamivir 30...50 mg/L, în condiții sterile la hota cu flux de aer laminar. Desfășurarea proceselor de organogeneză, de multiplicare a materialului biologic rezultat prin proliferarea lăstarilor, înrădăcinarea *in vitro*, au loc în condiții controlate în camere de creștere: temperatura 18...25°C, fotoperioada 16 ore lumină și iluminarea 3000-3500 lx. Perioada de incubare pe mediu de cultură este de 1...3 subculturi. Lăstarii înrădăcinați sunt aclimatizați conform tehnologiei de regenerare a viței-de-vie și cartofului prin cultură *in vitro*. Plantele regenerare sunt testate în vederea alcătuirii loturilor de plante libere de virusuri.

