



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2022 00767

(22) Data de depozit: 24/11/2022

(41) Data publicării cererii:  
30/05/2024 BOPI nr. 5/2024

(71) Solicitant:  
• UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE  
AGRONOMICE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ  
DIN BUCUREȘTI - USAMVB, BD. MĂRĂȘTI,  
NR. 59, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:  
• CICEOI ROXANA, STR. 1 DECEMBRIE  
1918, NR. 1, SAT ROȘU, COMUNA  
CHIAJNA, IF, RO;  
• VENAT OANA, STR. LIPOVA NR. 40,  
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;  
• NICOLAE CĂTĂLINA, STR. PETRU ȘI  
PAVEL NR. 78A, SECTOR 1, BUCUREȘTI,  
B, RO;  
• IORDĂCHESCU MIHAELA,  
STR. COSMONAUȚILOR NR. 1, BL. 122A,  
AP. 3, PLOIEȘTI, PH, RO;

• ASANICĂ ADRIAN, STR. MEHADIA NR. 12,  
BL. 1 ICEM, SC. 2, ET. 6, AP. 48, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• STĂNICĂ FLORIN, ȘOS. BANATULUI  
NR. 14, BL. 21, ET. 3, AP. 239, CHITILA, IF,  
RO;  
• GUTUE MINODORA, STR. SFINȚII  
VOIEVOZI NR. 2, SECTOR 1, BUCUREȘTI,  
B, RO;  
• LUCHIAN VASILICA, STR. FLOARE ROȘIE  
NR. 18, BL. 65, SC. 3, ET. 2, AP. 51,  
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;  
• BUTCARU ANA, STR. BRÂNDUȘELOR  
NR. 9, BL. G4, SC. 1, AP. 24, SECTOR 3,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• STAVRESCU-BEDIVAN MALA-MARIA,  
STR. GRINȚIESULUI NR. 2B, ET. 5, AP. 41,  
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;  
• POPESCU DAN, STR. NICODIM NR. 22,  
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(54) TEHNOLOGIE DE IDENTIFICARE A BIOTIPURILOR  
DE LYCIUM CHINENSE REZISTENTE LA ATACUL  
ACARIANULUI GALICOL AL PLANTELOR DE GOJI

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de selecție preliminară, asistat de markeri moleculari, pe explante obținute *in vitro*, pentru identificarea de biotipuri de goji rezistente la atacul acarianului galicol, *Aceria kuko*. Procedeu, conform invenției, constă într-o succesiune de etape de: pregătire a semințelor prin recoltarea bachelor de goji de pe plante selecționate, extracția și decontaminarea semințelor prin imersie în fungicid sistemic 0,5% timp de 20 min., cu clătire repetată pentru eliminarea fungicidului, dezinfectia cu hipoclorit de sodiu cu concentrații de 10...15%, pregătirea mediului de cultură de tip Gamborg B5(-) fără hormoni de creștere și inocularea semințelor pe mediu, verificarea creșterii

calusului/explante și a plantulelor, analiza cu doi markeri moleculari de tip ISSR și un marker molecular de tip SSR, selectare material vegetal pentru secvența completă de analiză cu markeri moleculari SSR și ISSR pentru identificarea rapidă a biotipurilor rezistente la atacul acarianului galicol, astfel că biotipurile rezistente pot fi diferențiate de cele sensibile cu ajutorul a 10 benzi, din care 6 benzi dau o indicare pozitivă a rezistenței și 4 benzi indică același caracter prin prezența doar la biotipurile sensibile.

Revendicări: 3

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).



|  |               |
|--|---------------|
| OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI |               |
| Cerere de brevet de invenție             |               |
| Nr. ....                                 | a 2022 00 767 |
| Data depozit .....                       | 24-11-2022    |

36

## Tehnologie de identificare a biotipurilor de *Lycium chinense* rezistente la atacul acarianului galicol al plantelor de goji

Invenția se referă la un procedeu de selecție preliminară asistată de markeri moleculari a unor biotipuri de goji din punct de vedere al rezistenței la atacul acarianului galicol, *Aceria kuko*. Invenția este destinată utilizării în cadrul activităților de ameliorare la această specie, include metode și compoziții pentru evaluarea rezistenței plantelor și reprezintă o succesiune de etape aplicate pe țesut vegetal rezultat din plantule obținute *in vitro* din semințe, rezultate în urma activităților de hibridare sau de selecție în scopul obținerii de biotipuri noi valoroase. Adicional, etapele finale ale invenției, reprezentate de identificarea cu ajutorul markerilor moleculari de tip ISSR și SSR pot fi aplicate direct pe țesut vegetal provenit din materialul săditor folosit pentru plantare, la înființarea de plantații noi sau testarea plantelor deja existente în plantații.

Deși *Aceria kuko* (Kishida, 1927), acarianul galicol al plantelor de goji, este un dăunător nelipsit din plantațiile de goji din China, Japonia, și Coreea de Sud, și aproape 700 de brevete din Google patents menționează compuși chimici noi eficienți în managementul curativ al acestui acarian eriofiid, în Europa, goji este o plantă de cultură a cărei producție este solicitată din ce în ce mai mult pe piață ca fiind certificată în sistem ecologic, fără pesticide. În aceste condiții, amelioratorii sunt cei care trebuie să găsească soluții rapide pretabile sistemului ecologic, prin lansarea pe piață a unor soiuri rezistente la principalele boli și dăunători. România a devenit în ultimii ani unul dintre cei mai importanți cultivatori de goji, în special în sistem ecologic. În România, specia este destul de rezistentă la dăunători și boli. Primele soiuri omologate sunt 'Kronstadt', 'Anto', 'Erma', 'Transilvania', din specia *L. barbarum* și 'Sara' din specia *L. chinense*. Cultura se extinde rapid în Europa, pentru a satisface cererea crescută de alimente funcționale, cu efecte în tratamentul bolilor cronice (cancer, diabet, ateroscleroză etc.).

În România, *Aceria kuko* a fost semnalat pentru prima dată în 2013 (Ciceoi et Mardare, 2016), la 5 ani după prima lui semnalare în Europa, în 2008. În ultimii 8 ani specia s-a adaptat și s-a naturalizat la noi în țară, creând focare de infecție în zonele în care goji crește sălbatic, invaziv. În plus, față de problemele cauzate de reducerea producției vandabile de goji și de debilitarea în timp a plantelor de cultură, acarianul prezintă un potențial de risc necunoscut pentru agricultură, în special pentru *Solanaceae*, deoarece teste preliminare au demonstrat că acesta poate ataca și ardei (*Capsicum annuum* L.) și poate supraviețui pe zărnă (*Solanum nigrum* L.).

Goji, *Lycium chinense* L., este o specie de arbuști cu fructe comestibile, foarte apreciate de consumatori, relativ nou introdusă în cultură în România (Asănică, 2017). Soiuri cu calități organoleptice deosebite sunt deja utilizate în cultură prin dezvoltarea de plantații care cultivă goji în sistem ecologic. Pentru România, goji este de interes pentru cultivatori și datorită faptului că este o specie cu o plasticitate mare, întâlnindu-se aproape în toate județele țării (Stavrescu-Bedivan et al., 2022), de la bazinul Olteniei până în Moldova sau Timișoara (Mencinicopschi și Bălan, 2013). Înmulțirea speciei se face în principal pe cale generativă (prin semințe), dar variabilitatea foarte mare nu oferă stabilitate producției, înmulțirea sexuată neputând garanta

transmiterea caracterelor importante, precum mărime, gust, culoare, formă, dimensiune și rezistențe la diverși factori biotici și abiotici. Înmulțirea vegetativă permite păstrarea caracterelor și caracteristicilor genitorilor, folosindu-se tehnica butășirii sau a drajonării la care specia excelează nativ. Ultima și cea mai stabilă dintre tehnologiile de înmulțire, care poate genera număr mare de plante (un important factor în lansarea producției industriale), stabile din punct de vedere genetic și libere de virusuri este înmulțirea *in vitro*, prin organogeneză directă (apexuri, segmente nodale, fragmente de frunză) sau organogeneză indirectă (culturi de calus). Microînmulțirea este o ramură a biotehnologiilor care se bazează pe principiul "totipotenței celulare"<sup>1</sup>. Astfel, înmulțirea *in vitro* a speciilor poate păstra caracterele individului, poate controla rata de infectare a noului material vegetal (prin culturi de meristeme combinate cu termoterapie, crioterapie sau tratamente antivirale) și permite producerea rapidă de material săditor, în cantitate mare și liber de virusuri. Înmulțirea *in vitro* la goji este des abordată în literatura de specialitate, în special ca suport pentru ameliorare și conservare, inclusiv autori români având în vedere testarea acestei specii în ceea ce privește rata de multiplicare sau durata producerii plantulelor prin embriogeneză somatică.

Etapele standard care se parcurg pentru înmulțirea *in vitro* a unei specii sunt:

**a) pregătirea materialului vegetal:** se are în vedere recoltarea de material vegetal bine dezvoltat, cu caracteristici standard pentru specie; în cazul în care se recoltează parte verde (lăstari sau frunze), se caută cele mai reprezentative organe de pe individ, poziționate satisfăcător, urmărindu-se prezența acelor părți biologice necesare pentru înmulțirea *in vitro* (muguri, muguri dorminzi, lăstari tineri, vârfuri de lăstari, pețiol format, frunză matură, etc.); pentru recoltarea de polen, antere, se caută doar florile nedesfăcute, cu caractere de gen bine definite, la primele ore ale dimineții, iar manipularea recoltării trebuie să se facă în cele mai stricte condiții de asepsie. Dacă materialul vegetal nu se lucrează în aceeași zi, se condiționează și se stratifică la 4-6°C.

**b) sterilizarea materialului vegetal:** se produce conform protocoalelor stabilite în urma consultării literaturii de specialitate și a experienței dobândite în laborator. În condițiile în care materialul vegetal este deosebit de contaminat (insecte și patogeni), se pot introduce etape suplimentare de dezinfecție, de ex. imersia pentru 24 h a lăstarilor sau semințelor în apă cu pesticide sistemice sau de contact specifice. Toaletarea materialului vegetal pentru etapa de sterilizare se face în funcție de tehnologia care se va aplica (excizie muguri, realizare segmente uninodale din lăstari noi sau forțați, selectare semințe, etc.) iar tipul și durata de dezinfectare se stabilesc cu grijă, urmărindu-se menținerea calității explantului, lipsa brunificării sau a deprecierei țesutului vegetal. **Prezența invenției aduce un plus de siguranță** în activitate prin înlocuirea soluțiilor de clorură mercurică 0.1-0.2% cu care se poate face dezinfecția semințelor de *Lycium ruthenicum*, conform recomandărilor patent CN105815221A (China). Folosirea hipocloritului de sodiu cu concentrații de 10-15% testate progresiv pentru dezinfecția semințelor, cu un pretratament cu fungicid de concentrații 0.4 - 0.6 % asigură o dezinfecție de 100% a semințelor, **reduce riscul toxicității majore pentru om, mediu și explant**, știut fiind că

<sup>1</sup> Principiu explicat de Gottlieb Haberlandt în 1902, care lansează ipoteza că fiecare celulă are informația genetică și capacitatea de a produce o plantă perfectă (Haberlandt, 1902).

folosirea unor soluții cu toxicitate mare pentru dezinfecție, impune eliminarea completă a acestora înainte de inoculare și creșete riscului apariției mutațiilor genetice.

**c) inocularea:** materialul vegetal supus sterilizării se toaletează având în vedere că țesuturile care urmează să permită asimilarea resurselor de hrană din mediul de cultură trebuie să fie sănătoase și întregi, iar toate părțile necrozate sau depreciate în urma sterilizării se elimină. De asemenea, explantele care prezintă semne de neconformitate, de ex.: semințe care plutesc în soluție, ca semn al lipsei embrionului (semințe șiștave) se îndepărtează. Ulterior, explantele/semințele se introduc în recipientele de cultură, păstrând polaritatea și starea de asepsie a recipientelor. Manipularea explantelor, toaletarea lor, precum și manevrele de inoculare se fac cu cea mai mare atenție pentru a se evita contaminarea.

Spre deosebire de datele publicate în patent CN103843664A (China) care a folosit pentru inoculare mediul MS (-) cu adiție de auxine: methyl  $\alpha$ -naphthyl acetate – ANA ( $C_{12}H_{10}O_2$ ), prezenta invenție permite inițierea culturii de semințe pe medii MS (-) (nu face obiectul revendicărilor) sau **Gamborg B5 (-) fără hormoni**, germinarea petrecându-se în medie în 15 - 25 zile, termen adecvat pentru dezvoltarea metodei de lucru. **Avantajele sunt de ordin financiar, în primul rând, prin lipsa hormonilor de creștere în mediul de cultură**, în condițiile în care doar alegerea mediului Gamborg (B5) ca mediu de inițiere în detrimentul Murashige & Skoog (MS) poate produce o rată mult superioară pentru dezvoltarea plantulelor și nu necesită și prezența auxinelor/citochinelor. Această soluție tehnologică superioară este întreținută și de capacitatea ridicată a speciei de a germina, respectiv de a lăstării sau drajona. Este de precizat ca etapa moleculară a tehnologiei necesită o cantitate foarte mică de țesut pentru amplificarea ADN-ului în prezența markerilor ISSR și SSR, **fiind suficiente 10-25 zile de la inocularea semințelor pe mediu până la efectuarea testării**. Vasele de cultură/eprubetele de creștere se plasează în camera de creștere la o temperatură de 23°C, 50% și fotoperioadă de 16/8.

**d) subcultivarea/repasarea:** este etapa care permite multiplicarea plantelor, mărirea exponențială a numărului de noi plante cu păstrarea identității genetice și care lansează, teoretic, posibilitatea stocării conformației genetice a plantei inițiale la infinit. Plantele se secționează și se multiplică pe medii dedicate, iar plantulele obținute se consideră un nou individ și se segmentează în continuare, păstrând o asepsie totală pe durata procesului. Părțile din plantule care prezintă defecte biologice, care sunt degradate, care și-au pierdut turgescența sau sunt afectate de fenomene vizibil depreciative, sunt eliminate. Plasarea noilor plantule în vasele de creștere se face respectând biologia speciei și tendințele native de creștere și habitusul aferent pentru a permite plantulelor să se dezvolte armonios, să nu se concureze pentru resurse de lumină (în principal) și să genereze indivizi uniformi în dezvoltare, apți pentru a trece în etapa de înrădăcinare. Una din particularitățile deosebite ale speciei *Lycium chinense* este drajonarea, iar acest comportament specific vegetativ se păstrează și la înmulțirea *in vitro*, rădăcinile plantulelor generând drajoni și crescând rata de multiplicare, în avantajul producătorilor de plante prin această tehnologie. Spre deosebire de recomandarea paltenului CN103843664A (China) pentru mediul MS cu adiție de citochinină - 0.1 mg/L 6-benzyl amino adenine (BAP) și auxină - 0.05 mg/L indole-3-acetic acid (AIA) pentru subcultivare, **actuala tehnologie permite subcultivarea pe un alt mediu (Gamborg B5) cu rate mult mai bune de multiplicare pentru plante și este lipsit de hormoni de creștere, ceea ce scade considerabil costurile de producție. Soluția propusă reduce foarte mult timpii de producere ai materialului biologic.**

**d) înrădăcinarea:** este etapa care aduce noile plantule către viața *in vivo* și care le fortifică sistemul radicular. Deși unele specii prezintă o atitudine negativă și o rată mică de înrădăcinare, fiind catalogate drept specii "recalcitrante", plantele din genul *Lycium*, pe care s-au efectuat studii de peste 10 ani în cadrul USAMV (Nicolae et al., 2018), au avut un comportament bun, producând rădăcini și în medii fără concentrații de hormoni definite pentru înrădăcinare. Ca tehnologie, plantele venite din etapa de subcultivare trec printr-un proces similar de selecție și tăiere, folosindu-se cu precădere pentru etapa aceasta apexurile și mugurii laterali porniți, mici plante identice cu planta mamă.

**e) aclimatizarea:** este considerată cea mai dificilă etapă a microînmulțirii și reprezintă etapa de trecere a plantelor din mediile *in vitro*, habitate închise și cu parametri controlați, în mediul natural, *ex vitro*. Noile plante au acum rădăcini viabile și suficiente pentru a încerca să treacă la condițiile de viață exterioară, pe substrat solid, nesterilizat și neprietenos dezvoltării lor. Umiditatea de 90-95% din vasele de cultură este modificată și plantele trebuie acomodate la 50-75% din exterior, prin sisteme de aspersie, pulverizări, etc. Temperatura și lumina sunt alți factori care transmit plantelor starea de necesitate și ajută sau nu procesele fiziologice să se adapteze la noile condiții de viață, trecerea făcându-se treptat, cu ajustarea parametrilor și controlarea factorilor de mediu. Durata acestei etape depinde de specie și caracteristicile ei de adaptare și nu face obiectul prezentei invenții. Prezenta invenție folosește material vegetal rezultat imediat după inoculare sau cel din primele etape de repasare pentru a fi analizat cu ajutorul markerilor moleculari.

Markerii moleculari sunt fragmente de ADN prelevate dintr-un anumit organism, care oferă informații despre acel organism, fiind **asociate cu o anumită locație în cadrul genomului** și sunt utilizați în biologia moleculară și biotehnologie pentru a identifica o anumită secvență de ADN dintr-o zonă necunoscută. De regulă markerii controlează expresii fenotipice și permit identificarea prezenței unei gene la nivel individual, bazându-se pe polimorfismul unei regiuni din ADN-ul genomic / gene la nivelul expresiei fenotipice în relație cu condițiile de mediu. Markerii moleculari sunt practic nelimitați, pentru că rezultă din diferite tipuri de mutații care apar pe parcursul recombinării genetice sau altor evenimente generatoare de stress, cum ar fi mutații punctiforme, inserții, deleții, erori în replicarea ADN-ului etc., și care nu au relevanță funcțională, fiind localizați în regiuni necodate ale ADN-ului. Există multe feluri de markeri moleculari (RFLP, RAPD, ISSR, SSR, AFLP, etc), fiecare cu avantaje și dezavantaje. Markerii din prezenta invenție fac parte din categoria SSRs (Simple Sequence Repeats) și ISSRs (Inter Simple Sequence Repeats). Markerii SSR permit o analiză simplă, cu repetabilitate ridicată, dar metoda de lucru este mai complexă, necesită mult timp și de regulă impune folosirea gelurilor de poliacrilamidă, datorită mărimii mici a secvențelor rezultate. Prezenta invenție permite evidențierea structurii genetice care conferă rezistență la atacul acarianului prin **vizualizare pe gel de agaroză, în electroforeză orizontală, reducând astfel timpii de lucru și costurile cu materialele**. Markerii ISSR permit efectuarea de analize cu cantități mici de ADN și nu necesită design special de primeri, dar fiind distribuiți aleatoriu în întregul genom, analiză poate avea repetabilitate mai scăzută. Datorită profilurilor de amprentare multilocus, analizele cu ISSR sunt intens folosite în studii privind identitatea genetică, filiația, identificarea clonelor și tulpinilor etc.

Analizele genetice cu markeri moleculari sunt de obicei costisitoare datorită prețului ridicat al reactivilor/kiturilor și al timpilor necesari pentru prelucrarea probelor și analiza rezultatelor de către personal înalt specializat. De regulă impun minim cinci etape, reprezentate de:

**a) izolarea ADN-ului genomic** (pentru obținerea de ADN de înaltă puritate și integritate). Procesul de extracție a ADN-ului genomic permite izolarea unui ADN de calitate superioară, cu care se pot efectua ulterior diverse studii moleculare. În ultimul timp, în laboratoarele care procesează multe probe zilnic, este preferată extracția automată, întrucât extracția manuală sau pe bază de kituri de extracție sunt recomandate doar în condițiile procesării unui număr mic de probe sau când este necesară optimizarea reacțiilor. Etapele premergătoare extracției presupun omogenizarea probei și liza celulară.

**b) Determinarea concentrației și purității ADN-ului genomic extras:** după procesul de extracție, se determină puritatea și concentrația ADN-ului, de regulă folosind metode spectrofotometrice, de ex. NanoDrop 1000, Qubit, etc. Se analizează probele de ADN la următoarele lungimi de undă: 230 nm, 260 nm, 280 nm și 340 nm. ADN-ul are un grad maxim de absorbție al luminii la lungimea de undă de 260 nm. Deoarece tirozina și triptofanul au grad maxim de absorbție al luminii la 280 nm, se folosește această lungime de undă ca un indicator al contaminării cu proteine. Citirea de la 230 nm indică dacă proba este contaminată cu fenol, din moment ce fenolul are un grad mare de absorbție al luminii la 230 nm. Citirea la 340 nm indică turbiditatea probei, valoarea acestei citiri fiind scăzută din valoarea citirii de la 260 nm.

**c) amplificarea ADN-ului cu ajutorul markerilor:** se realizează cu ajutorul tehnicii PCR. În cazul markerilor tip ISSR se amplifică secvențe de ADN situate între microsateliți cu ajutorul unor primeri complementari secvențelor microsateliților. Polimorfismul apare oriunde în genom, unde lipsește una din secvențele microsatelitare sau există o deleție sau o inserție care modifică distanța dintre secvențele repetate. În cazul markerilor tip SSR, folosind markeri specifici, situații de o parte și de alta a microsateliților, se amplifică secvențe scurte, în general mai mici de 500 bp, ce conțin microsateliții.

**d) separarea fragmentelor de ADN amplificate:** electroforeza în gel de agaroză reprezintă metoda standard de analiză a acizilor nucleici. Deplasarea moleculelor se face într-un tanc de electroforeză orizontală în prezența unui curent electric. Mobilitatea electroforetică este influențată de următorii factori: concentrația de agaroză, conformația moleculei de ADN (monocatenar, bicatenar sau super-răsucit), prezența compusului fluorescent în gel, tamponul de electroforeză utilizat, tipul de agaroză și voltajul aplicat. Probele de ADN încărcate în gel de agaroză vor migra în prezența unui tampon de electroforeză sub acțiunea unui curent electric extern furnizat de o sursă de curent. Acizii nucleici sunt încărcăți negativ datorită prezenței grupărilor fosfat și vor migra spre electrodul încărcat pozitiv al tancului de electroforeză.

**e) preluarea și analiza imaginilor obținute la electroforeză:** fragmentele de ADN se detectează datorită asocierii acestora cu compuşii fluorescenți tip SYBR Green I (SYBR™ Green I Nucleic Acid Gel Stain-10.000X), colorant care se intercalează între bazele ADN-ului dublu catenar. Detecția moleculelor de ADN se realizează prin citire spectrală la lungimea de undă de 530 nm cu ajutorul aparatului de imagistică moleculară PharosFX, conectat la un laser extern.

**Problema tehnică pe care o rezolvă invenția propusă constă în identificarea unei metode care să permită obținerea și vizualizarea unor benzi caracteristice biotipurilor rezistente sau sensibile de goji prin eliminarea fazelor de izolare și cuantificare a ADN-ului, reducând mult timpul de analiză, costurilor și posibilitatea de a avea erori.**

Procedeele conform invenției oferă o soluție tehnică de realizare a unei metode de identificare a biotipurilor de *Lycium chinense* rezistente la atacul acarianului galicol al plantelor de goji și constă în următoarele etape:

**a) recoltarea bachelor de goji de pe plantele selecționate** (în prima parte a zilei pentru a evita insolația; bace situate pe ramurile cu expunere sudică; bace ajunse la maturitatea de recoltare, intacte, neatacate; excizare cu tot cu pețiol; etichetare cu numele/ poziție/data/alte detalii direct în câmp; minim 15 bucăți),

**b) pregătirea bachelor pentru extracția semințelor** (în laborator/sală corespunzătoare din punct de vedere sanitar; secționare cu bisturiu; scoaterea semințelor din pericarp; eliminarea completă a mezocarpului),

**c) decontaminarea semințelor** (imersie în fungicid sistemic 0.5%; 10-20 minute, cu agitare; clătire cu apă bidistilată sterilă, minim 3 minute de trei ori, până la eliminarea fungicidului),

**d) pregătirea pentru inoculare a semințelor** (asigurare mediu complet steril; plasare semințe în alcool etilic, 70%, doar cât să acopere semințele, în pahar Berzelius, agitat continuu timp de 30 - 40 secunde; clătire în același recipient, la hotă, de 2 ori, cu apă distilată sterilă; îndepărtarea semințelor care plutesc; adăugare soluție comercială de NaCl de 12% și sterilizare 15-20 minute cu agitare continuă; 3 clătiri succesive de câte 3 minute (toate manipulările se fac cu instrumentar sterilizat și răcit);

**e) pregătirea mediului de cultură** (în eprubete de cultură, se toarnă în condiții aseptice mediu Gamborg B5(-) care conține 100 ml/L macroelemente B5(-) 10X, 1 ml/L microelemente B5(-) 1000X, 5 ml/L chelat de fier 200X, 10 ml/L vitamine B5 100X (-), 10 ml/L inozitol 100X, zaharoză 30 g/L și agar 7 g/L. pH-ul mediului de cultură se ajustează la pH de 5,8 cu soluție NaOH 0,1 N și se autoclavează timp de 20 de minute la 121°C, la o presiune atmosferică de 1,1 bar);

**f) inocularea semințelor pe mediu** (dezinfecție cu lămpi UV 30 minute; rulare flux laminar 20-30 minute înainte, sterilizare suprafețe cu alcool; semințele se iau cu lama de bisturiu și se așază pe hârtia de filtru; semințele se introduc individual în eprubetele de cultură cu lama de bisturiu fără a atinge pereții de sticlă ai recipientului sau mediul de cultură; la finalul inoculării eprubetele se înfoliază cu parafilm, se etichetează și se plasează în camera climatică la 22°C și 50% umiditate, în condiții de întuneric. După aproape 15 zile semințele încep să germineze și se mută la lumină, la o fotoperioadă de 16 ore, intensitate luminoasă de 9.280 lx, temperatură de 22°C și umiditate atmosferică de 50%);

**g) verificarea creșterii calusului/explante și a plantelor** (inspecție regulată a camerei de creștere, cu verificarea parametrilor amintiți; eliminarea vaselor infectate sau cu probleme vizibile);

**h) prelevarea materialului vegetal pentru amplificare cu markeri SSR și ISSR** (la minim 20 zile de la inoculare; selectare plantule - minim 4 frunze, dezvoltare corespunzătoare, fără cloroze, semne de deshidratare sau defecte mecanice; pe două foi de hârtie de filtru sterile se extrage plantula; se detașează dintr-o frunză/calus un fragment de 0.2 mm și introduce în tub Eppendorf etichetat anterior, cu mediu de diluție; se mărunțește țesutul cu ajutorul unui vârf de pipetă, până soluția devine omogenă, verzuie, de la clorofilă);

**h') repasarea biotipului de la care s-a prelevat proba** (pentru asigurarea materialului necesar producției de plante, în cazul în care se confirmă rezistența aceluia individ);

**i) amplificarea ADN-ului cu ajutorul markerului SSR<sup>2</sup>** (pregătire reacție volum total 20 μl, conținând per probă: 10 μl 2x buffer, 8,1 μl H<sub>2</sub>O, 0,4 μl Phire Hot Start II DNA Polymerase, 0,5 μl primer AF244121 (5'TACCTCCTCGCCAATCCTTCTG3'), 0,5 μl primer (5'TTGAAAGTTCTTTCCATGACAACC3'), 0,5 μl soluție omogenă cu material vegetal; rulare program PCR (1) denaturare 98°C, 5 min, (2) 35 cicluri de amplificare cu 3 pași (98°C, 5 sec, 45°C, 5 sec, 72°C, 40 sec), (3) extensia finală 72°C, 5 min, (4) menținere la 4°C);

**i') amplificarea ADN-ului cu ajutorul markerului ISSR1** (pregătire reacție volum total 20 μl, conținând per probă: 10 μl 2x buffer, 8,1 μl H<sub>2</sub>O, 0,4 μl Phire Hot Start II DNA Polymerase, 1 μl primer Ai2 (5'ACACACACACACACAG3'), 0,5 μl soluție omogenă cu material vegetal; rulare program PCR (1) denaturare 98°C, 5 min, (2) 40 cicluri de amplificare cu 3 pași (98°C, 5 sec, 42°C, 5 sec, 72°C, 40 sec), (3) extensia finală 72°C, 5 min, (4) menținere la 4°C);

**i'') amplificarea ADN-ului cu ajutorul markerului ISSR2** (pregătire reacție volum total 20 μl, conținând per probă: 10 μl 2x buffer, 8,1 μl H<sub>2</sub>O, 0,4 μl Phire Hot Start II DNA Polymerase, 1 μl primer Ai8 (5'GAAGAAGAAGAAGAAGAA3'), 0,5 μl soluție omogenă cu material vegetal; rulare program PCR (1) denaturare 98°C, 5 min, (2) 40 cicluri de amplificare cu 3 pași (98°C, 5 sec, 42°C, 5 sec, 72°C, 40 sec), (3) extensia finală 72°C, 5 min, (4) menținere la 4°C);

**j) electroforeza fragmentelor de ADN amplificate** (pregătire gel agaroză 2%, încărcare pe gel 10 μl, 1 μl loading buffer, ladder 1Kb+, rulare la 10 V/cm, 5 cm, 2 h);

**k) preluarea și analiza imaginilor obținute la electroforeză pentru SSR** (vizualizare cu lampă UV sau PharosFX; se vizualizează 2 benzi de 1360 pb<sup>3</sup> și 230 pb la biotipurile rezistente, acestea neexistând la biotipurile sensibile și 2 benzi de 440 pb și 260 pb la biotipurile sensibile, acestea neexistând la biotipurile rezistente);

**k') preluarea și analiza imaginilor obținute la electroforeză pentru ISSR1** (vizualizare la UV sau Pharos; se vizualizează 3 benzi de 1280 pb, 1380 pb și 13670 pb la biotipurile rezistente, acestea neexistând la biotipurile sensibile și 1 bandă de 375 pb la biotipurile sensibile, aceasta neexistând la biotipurile rezistente);

**k'') preluarea și analiza imaginilor obținute la electroforeză pentru ISSR2** (vizualizare la UV sau Pharos; se vizualizează 1 bandă de 360 pb la biotipurile rezistente, acestea neexistând la biotipurile sensibile și 1 bandă de 600 pb la biotipurile sensibile, aceasta neexistând la biotipurile rezistente);

**Timpul total necesar estimat** pentru obținerea materialului vegetal necesar pentru analiza genetică este de **10-20 de zile** iar **timpul necesar pentru analiza cu markeri moleculari este de 2-3 ore**, în funcție de experiența operatorului. Acest interval de timp este mult redus față de metoda clasică de verificare a rezistenței, care este de cel puțin 4 luni pentru obținerea unei plante de goji și de 5-24 de ore pentru secvența completă de analiză cu markeri moleculari, în condițiile în care s-ar folosi markerii indicați de prezentul brevet. Literatura de specialitate nu

<sup>2</sup> Optimizarea temperaturii de atașare a primerilor se face în funcție de fiecare aparat Termocycler și de tipul de ADN-polimerază folosite de amplificare ADN

<sup>3</sup> pb – pereche de baze



menționează încă nici o referință legată de markerii moleculari folosiți în indicarea rezistenței la acarianul galicol, iar timpul necesar în cercetare pentru descoperirea unor astfel de primeri este apreciată la minim 3 luni.

În concluzie, biotipurile rezistente de *Lycium chinense* pot fi diferențiate de cele sensibile cu ajutorul a 10 benzi, dintre care 6 benzi dau o indicare pozitivă a rezistenței și 4 benzi indică același caracter prin prezența doar la biotipurile sensibile.

Datele experimentale de mai sus demonstrează existența unui efect tehnic nou apărut în urma aplicării tehnologiei revendicate prin prezentul brevet.

## BIBLIOGRAFIE

Asănică A., 2017. Cultura pe verticală a arbuștilor fructiferi. Editura Total Publishing, București.

Haberlandt, G. 1902. Culturversuehe mit isolierten Pflanzenzellen. Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien Math. Naturwiss, 111, 69–92.

Mencinicopschi I. C., Bălan V., 2013. Scientific substantiation for the introduction, on Romanian territory, of *Lycium barbarum* L., a species with sanogene properties. AgroLife Scientific Journal, Volume 2, Number 1.

Fira A., N. Joshee, Victoria Cristea, Manuela Simu, Monica Hârța, D. Pamfil, Doina Clapa, 2008. Optimization of micropropagation protocol for Goji Berry (*Lycium barbarum* L.). Bulletin USAMVM Horticulture 73 (2).

Dănăilă-Guidea S.-M., Dobrinoiu R.-V., Vișan L., Toma R.C., 2015. Protocol for efficient *in vitro* multiplication of *Lycium barbarum* L. by direct organogenesis. Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies, Vol. XIX

Nicolae C., Peticilă A., Oana V., Asănică A., Popescu D., 2018. Research regarding *in vitro* propagation of some *Lycium barbarum* and *Lycium chinense* hybrids, Proceedings of the International Symposium “Hortus Academicus”, vol. I.

Ciceoi Roxana., Mardare Elena Ștefania, 2016. Aceria kuko Mites: a Comprehensive Review of their Phytosanitary Risk, Pathways and Control, Bulletin UASVM Horticulture, vol. 73(2):89- 100, ISSN 1843-5254, E-ISSN 1843-5394, DOI:10.15835/buasvmcn-hort:12264

Stavrescu-Bedivan Mala-Maria, Pelcaru Cristina Florentina, Cătălin Mihai Croitoru, Clara Daniela Mihai, Roxana Ciceoi. 2022. Preliminary Survey For Mapping The Distribution Of Spontaneous Goji Berry Shrubs In Romania, Scientific Papers. Series B, Horticulture, LXVI(1):907-912.

CN105815221A: Method for in-vitro rapid propagation of lycium ruthenicum by taking young seedlings as explant donors

CN103843664A: Lycium exsertum tissue culture and rapid propagation method

## Tehnologie de identificare a biotipurilor de *Lycium chinense* rezistente la atacul acarianului galicol al plantelor de goji

### REVENDICĂRI

**1. Metodă de producere a materialului vegetal pentru identificarea rapidă a biotipurilor de *Lycium chinense* rezistente la atacul acarianului galicol al plantelor de goji, caracterizată prin aceea că include următoarele etape:** a) recoltarea bachelor de goji de pe plantele selecționate (în prima parte a zilei pentru a evita insolația; bace situate pe ramurile cu expunere sudică; bace ajunse la maturitatea de recoltare, intacte, neatacate; excizare cu tot cu pețiol; etichetare cu numele/poziție/data/alte detalii direct în câmp; minim 15 bucăți), b) pregătirea bachelor pentru extracția semințelor (în laborator/sală corespunzătoare din punct de vedere sanitar; secționare cu bisturiu; scoaterea semințelor din pericarp; eliminarea completă a mezocarpului), c) decontaminarea semințelor (imersie în fungicid sistemic 0.5%; 10-20 minute, cu agitare; clătire cu apă bidistilată sterilă, minim 3 minute de trei ori, până la eliminarea fungicidului), d) pregătirea pentru inoculare a semințelor (asigurare mediu complet steril; plasare semințe în alcool etilic, 70%, doar cât să acopere semințele, în pahar Berzelius, agitat continuu timp de 30 - 40 secunde; clătire în același recipient, la hotă, de 2 ori, cu apă distilată sterilă; îndepărtarea semințelor care plutesc; adăugare soluție comercială de **hipoclorit de sodiu cu concentrații de 10-15% testate progresiv pentru dezinfectia semințelor și sterilizare** 15-20 minute cu agitare continuă; 3 clătiri succesive de câte 3 minute (toate manipulările se fac cu instrumentar sterilizat și răcit); e) pregătirea mediului de cultură (în eprubete de cultură, se toarnă în condiții aseptice mediu **Gamborg B5(-) fără hormoni de creștere** care conține 100 ml/L macroelemente B5(-) 10X, 1 ml/L microelemente B5(-) 1000X, 5 ml/L chelat de fier 200X, 10 ml/L vitamine B5 100X (-), 10 ml/L inozitol 100X, zaharoză 30 g/L și agar 7 g/L. pH-ul mediului de cultură se ajustează la pH de 5,8 cu soluție NaOH 0,1 N și se autoclavează timp de 20 de minute la 121°C, la o presiune atmosferică de 1,1 bar); f) inocularea semințelor pe mediu (dezinfecare cu lămpi UV 30 minute; rulare flux laminar 20-30 minute înainte, sterilizare suprafețe cu alcool; semințele se iau cu lama de bisturiu și se așază pe hârtia de filtru; semințele se introduc individual în eprubetele de cultură cu lama de bisturiu fără a atinge pereții de sticlă ai recipientului sau mediul de cultură; la finalul inoculării eprubetele se înfoliază cu parafilm, se etichetează și se plasează în camera climatică la 22°C și 50% umiditate, în condiții de întuneric. După aproape 15 zile semințele încep să germineze și se mută la lumină, la o fotoperioadă de 16 ore, intensitate luminoasă de 9.280 lx, temperatură de 22°C și umiditate atmosferică de 50%); g) verificarea creșterii calusului/explante și a plantelor (inspecție regulată a camerei de creștere, cu verificarea parametrilor amintiți; eliminarea vaselor infectate sau cu probleme vizibile); h) prelevarea materialului vegetal pentru amplificare cu markeri SSR și ISSR (la minim 20 zile de la inoculare; selectare plantule - minim 4 frunze, dezvoltare corespunzătoare, fără cloroze, semne de deshidratare sau defecte mecanice; pe două foi de hârtie de filtru sterile se extrage plantula; se detașează dintr-o frunză/calus un fragment de 0.2 mm și introduce în tub Eppendorf etichetat anterior, cu mediu de diluție; se mărunțește țesutul cu ajutorul unui vârf de pipetă, până soluția devine omogenă, verzuie, de la clorofilă); h') repasarea biotipului de la care s-a prelevat proba (pentru asigurarea materialului necesar producției de plante, în cazul în care se confirmă rezistența aceluși individ);

**2. Markerii moleculari de tip ISSR pentru recunoșterea rezistenței la atacul acarianului galicol al plantelor de goji la specia *L. chinense*, caracterizați prin aceea că**

markerul Ai2, cu secvența 5'ACACACACACACACAG'3', permite vizualizarea a 3 benzi de 1280 pb, 1380 pb și 13670 pb la biotipurile rezistente, acestea neexistând la biotipurile sensibile și 1 bandă de 375 pb la biotipurile sensibile, aceasta neexistând la biotipurile rezistente, în condițiile folosirii a 1 μl marker într-o reacție PCR de volum total 20 μl, conținând 10 μl 2x buffer, 8,1μl H<sub>2</sub>O, 0,4 μl Phire Hot Start II DNA Polymerase, cu 0,5 μl soluție omogenă din materialul vegetal, la amplificare după programul PCR (1) denaturare 98°C, 5 min, (2) 40 cicluri de amplificare cu 3 pași (98°C, 5 sec, 42°C, 5 sec, 72°C, 40 sec), (3) extensia finală 72°C, 5 min, (4) menținere la 4°C);

markerul Ai8, cu secvența 5'GAAGAAGAAGAAGAAGAA'3', permite vizualizarea a 1 bandă de 360 pb la biotipurile rezistente, acestea neexistând la biotipurile sensibile și 1 bandă de 600 pb la biotipurile sensibile, aceasta neexistând la biotipurile rezistente, în condițiile folosirii a 1 μl marker într-o reacție PCR de volum total 20 μl, conținând 10 μl 2x buffer, 8,1μl H<sub>2</sub>O, 0,4 μl Phire Hot Start II DNA Polymerase, cu 0,5 μl soluție omogenă din materialul vegetal, la amplificare după programul PCR (1) denaturare 98°C, 5 min, (2) 40 cicluri de amplificare cu 3 pași (98°C, 5 sec, 42°C, 5 sec, 72°C, 40 sec), (3) extensia finală 72°C, 5 min, (4) menținere la 4°C);

**3. Marker molecular de tip SSR pentru recunoșterea rezistenței la atacul acarianului galicol al plantelor de goji la specia *L. chinense*, caracterizat prin aceea că markerul AF244121 (5'TACCTCCTCGCCAATCCTTCTG3'), 0,5 μl primer (5' TTGAAAGTTCTTTCCATGACAACC3'), permite vizualizarea a 2 benzi de 1360 pb<sup>1</sup> și 230 pb la biotipurile rezistente, acestea neexistând la biotipurile sensibile și 2 benzi de 440 pb și 260 pb la biotipurile sensibile, acestea neexistând la biotipurile rezistente, în condițiile folosirii a 0,5 μl marker forward și 0,5 μl marker reverse într-o reacție de volum total 20 μl, conținând per probă: 10 μl 2x buffer, 8,1μl H<sub>2</sub>O, 0,4 μl Phire Hot Start II DNA Polymerase, 0,5 μl soluție omogenă cu material vegetal; rulare program PCR (1) denaturare 98°C, 5 min, (2) 35 cicluri de amplificare cu 3 pași (98°C, 5 sec, 45°C, 5 sec, 72°C, 40 sec), (3) extensia finală 72°C, 5 min, (4) menținere la 4°C);**

---

<sup>1</sup> pb – pereche de baze