



MD 251 Y 2010.08.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **251** ⁽¹³⁾ **Y**

(51) Int. Cl.: *A01H 1/04* (2006.01)
A01H 1/06 (2006.01)
C12Q 1/70 (2006.01)
C12R 1/94 (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE
DE SCURTĂ DURATĂ**

În termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție de scurtă durată, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului	
(21) Nr. depozit: s 2010 0075 (22) Data depozit: 2010.04.22	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2010.08.31, BOPI nr. 8/2010
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE GENETICĂ ȘI FIZIOLOGIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD (72) Inventatori: ANDRONIC Larisa, MD; GRIGOROV Tatiana, MD; BUJOREANU Valeriu, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE GENETICĂ ȘI FIZIOLOGIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	

(54) **Procedeu de obținere a recombinanților de orz de primăvară**
(57) **Rezumat:**

1

Invenția se referă la biotehnologia agricolă, și anume la un procedeu de obținere a recombinanților de orz de primăvară.

Procedeu include iradierea semințelor cu raze gamma în doză de 150 Gy, semănarea lor peste 2 zile, infectarea plantelor în faza de 2...3 frunze cu virusul mozaicului dungat al orzului în două repetări la interval de două zile, colectarea semin-

5

2

țelor formate în spice, semănarea semințelor colectate și obținerea din ele a recombinanților de orz de primăvară.

Rezultatul invenției constă în sporirea numărului de recombinanți de orz de primăvară cu un spectru larg de caractere cantitative.

Revendicări: 1

10

MD 251 Y 2010.08.31

MD 251 Y 2010.08.31

3

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologia agricolă și anume la un procedeu de obținere a recombinanților de orz de primăvară.

5 Una din cele mai aplicabile metode de inducere a formelor noi în cadrul soiurilor este mutagenza experimentală.

Este cunoscut un procedeu netradițional de obținere a recombinanților în cadrul soiurilor de grâu bazat pe acțiunea virusului mozaicului dungat al orzului [1]. Conform procedurii dat plantulele de grâu în faza de 2...3 frunze se infectează cu virusul mozaicului dungat al orzului. Materialul semincer de grâu de la plantele infectate cu virus se colectează și ulterior se utilizează pentru obținerea 10 recombinanților. Dezavantajul procedurii de referință rezidă în faptul că formele noi cu caractere netradiționale soiului inițial pot fi selectate începând cu generația a doua obținută de la părinți infectați.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în obținerea recombinanților de orz de primăvară prin majorarea variabilității genotipice și diversificarea caracterelor cantitative.

15 Procedul de obținere a recombinanților de orz de primăvară, conform invenției, include iradierea semințelor cu raze gamma în doză de 150 Gy, semănarea lor peste 2 zile, infectarea plantelor în faza de 2...3 frunze cu virusul mozaicului dungat al orzului în două repetări la interval de două zile, colectarea semințelor formate în spice, semănarea semințelor colectate și obținerea din ele a recombinanților de orz de primăvară.

20 Noutatea invenției constă în utilizarea asociată a virusului mozaicului dungat al orzului și a razelor gamma în scopul obținerii recombinanților de orz de primăvară cu un spectru diversificat de caractere cantitative în prima generație provenită de la plantele virus, ceea ce permite simplificarea procedurii clasice de inducere a formelor noi cu caractere cantitative valoroase în ameliorarea plantelor.

25 Rezultatul invenției constă în sporirea numărului de recombinanți de orz de primăvară cu un spectru larg de caractere cantitative.

Exemplu de realizare a invenției

În cercetare au fost antrenate soiurile de orz de primăvară Galactic, Sonor și Unirea. Jumătate din totalul de semințe incluse în experimente (nu mai puțin de 500 semințe pentru fiecare soi) au fost 30 iradiate cu raze gamma în doze de 150 Gy, utilizând instalația RXM-γ-20 (cu capacitatea de 0,20 Gy/s, unde în calitate de sursă radioactivă a servit elementul Co⁶⁰). După două zile de repaus toate semințele au fost semănate în câmp. Jumătate din plantulele crescute din semințele iradiate, precum și jumătate din cele neiradiate, în faza de 2...3 frunze, au fost infectate mecanic, în două repetări la interval de două zile, cu inocul al virusului mozaicului dungat al orzului. Drept inocul a servit 35 extractul obținut în urma macerării frunzelor plantelor de orz, stabilite ca purtătoare de germeni ai virusului mozaicului dungat al orzului, diluat cu apă distilată în raport de 1:2.

Plantulele crescute din semințe neiradiate și neinfectate cu virusul mozaicului dungat al orzului au servit în calitate de martor. Fiecare variantă experimentală a inclus 100 plante aflate în aceeași fază ontogenetică. Toate boabele formate în spiculețe au fost colectate pentru studiile ulterioare. Circa 100 40 semințe din fiecare variantă experimentală au fost germinate în cutii Petri pe discuri din hârtie de filtru îmbibate cu apă distilată pentru evaluarea capacității de germinare a semințelor. Altele, cca 50 semințe, au fost utilizate pentru studiul schimburilor între cromatidele surori, indice aplicat în stabilirea efectului mutagen al factorilor. Analiza schimburilor între cromatidele surori se bazează pe 45 incorporarea diferențiată a 5-brom 2-deoxyuridinei (BrdU) în segmentele cromatidice. În acest scop semințele loturilor experimentale au fost germinate la întuneric până la atingerea lungimii de 2...3 cm. Incorporarea BrdU a fost realizată pe parcursul a două cicluri celulare prin etalare pe discuri expuse în amestec de 100 μM BrdU, 0,1 μM fluorodeoxyuridină și 5 μM uridină. Procedura de fixare, macerare a materialului a fost selectată conform tehnicii de colorare Schiff. Restul semințelor, în totalitate, au 50 fost ulterior semănate în câmp pentru obținerea generației I descendente de la plantele virus infectate.

Conform rezultatelor prezentate în tab. 1 se constată, că efectul razelor gamma în doză de 150 Gy asociat cu cel al virusului mozaicului dungat al orzului conduce la modificări nesemnificative ale capacității de germinare a semințelor, ceea ce constituie un moment esențial în realizarea sarcinii de obținere a descendenților.

MD 251 Y 2010.08.31

4

Tabelul 1

5 Capacitatea de germinare a semințelor de orz de primăvară infectate cu virusul mozaicului dungat al orzului și supuse iradierii

Soiul analizat	1	2	3
Galactic	87,96±8,52	59,81±7,11*	64,12±9,26
Sonor	79,55±12,98	65,97±9,38	5360±8,58
Unirea	83,88±9,66	57,99±4,14	79,15±16,63

* - diferențe semnificative față de martor pentru $P \leq 0,05$

10 - schema experimentului: 1 – plantule crescute din semințe netratate cu raze gamma și neinfectate cu virusul mozaicului dungat al orzului (martor); 2 – plantule infectate cu virusul mozaicului dungat al orzului (cea mai apropiată soluție); 3 – plantule crescute din semințe iradiatate cu raze gamma în doza de 150 Gy și infectate cu virusul mozaicului dungat al orzului (invenția propusă).

15 Rezultatele studiului schimburilor între cromatidele surori atestă genotoxicitatea virusului mozaicului dungat al orzului în complex cu razele gamma, exprimată prin majorarea semnificativă a numărului de schimburi între cromatidele surori (tab. 2). La toate cele trei soiuri de orz de primăvară analizate frecvența schimburilor cromatidice a deținut valori de 1,34...1,45 ori mai majore decât la martor.

Tabelul 2

20 Frecvența schimburilor între cromatidele surori induse de virusul mozaicului dungat al orzului la plantele iradiatate cu raze gamma

Varianta experimentală	Soiul analizat		
	Galactic	Sonor	Unirea
1	6,108±0,265	6,128±0,337	5,561±0,259
2	8,703±0,312***	8,359±0,299***	8,641±0,286***
3	9,054±0,274***	8,385±0,281***	8,081±0,246***

*** - diferențe semnificative față de martor pentru $P \leq 0,001$

25 Impactul asociat al razelor gamma și al infecției virale asupra materialului genetic denotă posibilitatea utilizării acestor factori în mutageniza experimentală în scopul extinderii variabilității genetice.

Analiza indicilor morfologici ai descendenților primei generații provenite de la plantele virusate și derivate din semințe iradiatate a scos în evidență devierea de la tipul inițial a caracterelor cantitative (tabelul 3).

Tabelul 3

30 Coeficientul de variație a unor caractere cantitative la orzul de primăvară

Nr.	Caracterul analizat	Soiul Galactic			Soiul Sonor			Soiul Unirea		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	Talia plantei, cm	5,54	9,42	17,64	10,83	9,69	12,45	8,99	13,57	14,20
2	Talia ultimului internod, cm	27,18	21,04	29,39	21,69	18,40	18,01	24,66	28,28	25,46
3	Spiculețe dezvoltate, nr.	27,77	51,32	56,92	21,70	37,54	51,41	28,67	44,17	48,96
4	Spiculețe nedevelopate, nr.	35,16	39,87	44,84	43,22	48,07	39,94	48,45	53,29	46,66
5	Lungimea spicului, cm	15,29	9,06	13,02	11,39	13,75	13,48	10,22	11,84	12,35
6	Internoduri, nr.	42,58	7,57	12,04	9,17	14,04	7,63	30,87	10,24	13,77
7	Frați sterili, nr.	48,0	46,66	50,82	64,43	63,77	56,63	41,77	75,40	89,96
8	Frați fertili, nr.	44,95	44,03	54,69	38,03	37,71	46,14	45,87	39,84	39,89

MD 251 Y 2010.08.31

5

5 Datele prezentate în tab. 3 relevă modificări semnificative ale coeficientului de variație a taliei plantei, lungimii spicului, numărului de spiculețe, numărului de frați. Conform invenției se atestă obținerea de forme cu talia mai joasă cu 9...19% decât la soiurile inițiale. Astfel, la soiul Galactic au fost remarcate exemplare cu talia minimă de cca 40 cm. Asemenea forme au fost atestate și la soiul Sonor și Unirea, în timp ce la soiurile inițiale înălțimea minimă a plantelor a constituit cel puțin 50...51 cm. Realizarea evaluărilor individuale a permis de a selecta exemplare cu talia joasă și îndici ce determină productivitatea (lungimea spicului, numărul de spiculețe dezvoltate) la nivelul soiului inițial. Diminuarea taliei plantelor a fost legată de reducerea numărului de internoduri. Trebuie de remarcat că formele pitice la orz prezintă un interes deosebit pentru amelioratori.

10 Valoarea intervalului de variație a fiecărui caracter analizat s-a dovedit a fi specifică genotipului soiului. Cel mai mare număr de spiculețe dezvoltate (25) a fost atestat la soiul Galactic în varianta cu aplicarea virusului mozaicului dungat al orzului și a razelor gamma în doză de 150 Gy. De asemenea, soiul Galactic a prezentat o superioritate față de celelalte două soiuri cu referire la plasticitate, precum și la caracterele cantitative cum ar fi numărul de internoduri, lungimea spicului.

15 Datele evaluării caracterelor biomorfologice ale descendenților primei generații obținute de la plante infectate cu virusul mozaicului dungat al orzului crescute din semințe iradiate sunt confirmate de rezultatele studiului citologic al schimbărilor cromatidice.

20 Majorarea frecvenței recombinării mitotice stabilite în urma aplicării procedurii propus induce forme cu noi combinații de caractere, obținerea cărora pe căi tradiționale este limitată de factori biologici.

25 (57) Revendicări:

30 Procedeu de obținere a recombinanților de orz de primăvară care include iradierea semințelor cu raze gamma în doză de 150 Gy, semănarea lor peste 2 zile, infectarea plantelor în faza de 2...3 frunze cu virusul mozaicului dungat al orzului în două repetări la interval de două zile, colectarea semințelor formate în spice, semănarea semințelor colectate și obținerea din ele a recombinanților de orz de primăvară.

35

(56) Referințe bibliografice:

1. SU 933052 1982.06.07

Șef Secție:

COLESNIC Inesa

Examinator:

BANTAȘ Valentina

Redactor:

LOZOVANU Maria

RAPORT DE DOCUMENTARE

pentru cerere de brevet de invenție de scurtă durată conform art.52(2) a Legii nr. 50/2008

(21) Nr. depozit: s 2010 0075	(85) Data fazei naționale PCT:
(22) Data depozit: 2010.04.22	(86) Cerere internațională PCT:
Prioritatea invocată: (31) nr.: 32) data: 33) țara: (51) IPC: Int. Cl.: A01H 1/04 (2006.01) A01H 1/06 (2006.01) C12Q 1/70 (2006.01) C12R 1/94 (2006.01) Alți indici de clasificare: Titlul: Procedeu de obținere a recombinanților de orz de primăvară (71) Solicitantul: INSTITUTUL DE GENETICĂ ȘI FIZIOLOGIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	
I. Condiția de unitate a invenției ☒ satisface ☐ nu satisface. Notă:	
II. Minimul de documente consultate: MD, EA	
III. Domeniul de documentare: Indicii IPC (ultima redacție): Int. Cl.: A01H 1/04 (2006.01) A01H 1/06 (2006.01) C12Q 1/70 (2006.01) a) C12R 1/94 (2006.01) b) Termeni caracteristici, cuvinte-cheie, sinonime: recombinanților de orz, iradierea semințelor, infecțarea semințelor, virus de mozaic dungat al orzului, рекомбинанты ячменя, облучение семян, заражение семян, вирус штриховатой мозаики ячменя	
IV. Documente considerate a fi relevante	
Categoria	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente
A	SU 933052 1982.06.07
A	RU 2150822 C1 2000.06.20
A	MD 2572 G2 2004.10.31
Relevant față de revendicarea nr.	
1	
1	
1	
Categorii de documente citate	
A - document care definește stadiul anterior în general	O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expunere etc.
X - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă	P - document publicat înainte de data de depozit dar după data priorității invocate
Y - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe alte documente de aceeași natură	T - document publicat după data de depozit sau a priorității invocate, citat pentru a pune în evidență principiul sau teoria care fundamentează invenția
E - document anterior dar publicat la data de depozit național reglementar sau după această dată	D - Document menționat în descrierea cererii de brevet
Data finalizării documentării 2010.05.12	
Examinatorul Bantaș Valentina	