



MD 1482 G2

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) **1482** ⁽¹³⁾ **G2**
(51) Int. Cl.⁷: A 01 H 1/04

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. depozit: 99-0043
(22) Data depozit: 1999.01.27

(43) Data publicării hotărârii de
acordare a brevetului pe
răspunderea solicitantului:
2000.06.30, BOPI nr. 6/2000

(71) **Solicitant:** Institutul de Genetică al Academiei de Științe a Republicii Moldova, MD
(72) **Inventatori:** Lupașcu Galina, MD; Fandeev Elvira, MD; Gavzer Svetlana, MD; Buiucă Petru, MD
(73) **Titular:** Institutul de Genetică al Academiei de Științe a Republicii Moldova, MD

(54) **Metodă de apreciere a orientării efectelor genice în reacția genotipurilor
de triticales la fuzarioză**

(57) **Rezumat:**

1
Invenția se referă la agricultură, în particular la
genetica plantelor și poate fi utilizată la aprecierea
efectelor genice în reacția genotipurilor de triticales
la fuzarioză.

Esența invenției constă în cultivarea embrio-
nilor imaturi ai formelor testate ale genotipurilor de
triticales încrucișate în sistem backcross pe mediul
Murashige-Skoog care conține suplimentar 0,01%
acid fuzaric și calcularea efectelor genice conform
modelului E. Gamble, folosind în calitate de test-
parametru biomasa embrionilor, totodată în cazul

2
5 predominării valorilor pozitive ale efectelor genice
calculate se consideră că efectele genice sunt
orientate spre sporirea rezistenței genotipurilor de
triticales la fuzarioză.

10
Rezultatul invenției constă în depistarea acți-
unilor și interacțiunilor genice în reacția genotipu-
rilor de triticales la fuzarioză la etapa embrionară de
dezvoltare a formelor testate.

Revendicări: 1

15

MD 1482 G2

MD 1482 G2

3

Descriere:

Invenția se referă la agricultură, în particular la genetika plantelor și poate fi utilizată la aprecierea efectelor genice în reacția genotipurilor de triticeale la fuzarioză.

5 Ciupercile din genul *Fusarium Link. ex. Fr.* aduc mari prejudicii economice și fitosanitare în culturile cerealiere - triticeale, grâu, secară etc. Metodele genice de combatere a bolilor sunt cele mai eficiente sub aspect economic și ecologic [1].

Prin urmare, este necesară cunoașterea efectelor genice implicate în reacția genotipurilor la boli. În mod tradițional se efectuează testarea formelor parentale P1 și P2, hibrizilor F1 și F2, și retroîncrucișărilor BC1 și BC2 pe fond de infecție și calcularea efectelor conform modelului propus de E. Gamble [2]. Testarea pe fond de infecție asigură rezultate obiective, dar are un șir de dezavantaje, dintre care principalele sunt determinate de diferite operațiuni laborioase: prepararea inoculului pe boabe de grâu, semănarea și cultivarea plantelor timp de 3-4 ani în câmp. În afară de aceasta, nivelul de atac depinde în mare măsură de condițiile climaterice ale anului: pe timp foarte rece sau secetos brunificarea bazei tulpinii (suprafața căreia este estimată) este mult mai pronunțată decât în condiții favorabile de dezvoltare a plantelor.

15 Problema pe care o rezolvă invenția constă în elaborarea unei metode mai rapide și eficiente de apreciere a efectelor genice în reacția genotipurilor de triticeale la fuzarioză.

Problema se soluționează prin aceea că aprecierea orientării efectelor genice în reacția genotipurilor de triticeale la fuzarioză include testarea genotipurilor de triticeale încrucișate în sistem *backcross* pe fond cu fuzariotoxine și calcularea efectelor genice conform modelului E. Gamble. Totodată testarea se efectuează prin cultivarea embrionilor imaturi pe mediul Murashige-Skoog care conține suplimentar 0,01% acid fuzaric, iar la calcularea efectelor genice în calitate de test-parametru se utilizează biomasa embrionilor, totodată în cazul predominării valorilor pozitive ale efectelor genice obținute se consideră că efectele genice sunt orientate spre sporirea rezistenței genotipurilor de triticeale la fuzarioză.

25 Rezultatul invenției constă în depistarea acțiunilor și interacțiunilor genice în reacția genotipurilor de triticeale la fuzarioză la etapa embrionară de dezvoltare a formelor testate.

Modul de realizare.

În experiență se utilizează embrioni imaturi prelevați de la formele de triticeale P1, P2, F1, F2, BC1 și BC2, și plante cultivate în condiții de câmp.

30 Aprecierea gradului de atacare în condiții de câmp se face în baza suprafeței brunificate sau necrotizate de la baza tulpinii la etapa de coacere a plantelor. În cadrul testărilor biotehnologice embrionii imaturi s-au plasat pe mediul Murashige-Skoog (MS), suplimentat cu acid fuzaric. Calusarea embrionară a fost evaluată la a 21-a zi de la plasarea embrionilor imaturi pe mediu.

Exemplu

35 Liniile de triticeale din soiurile AD 206, PRAG 3, AD 113, CAD 2/917 au fost încrucișate în sistem *backcross* și testate în condiții de câmp pe fond de infecție cu inocul *Fusarium*. Semănatul a avut loc la sfârșitul decadei a 3-a septembrie, câte 50 de boabe în rânduri de 1,5 m, distanța dintre ele fiind de 40 cm, în 3 repetări. În perioada de coacere a boabelor (luna iunie) se estimează gradul de atacare a bazei tulpinii după scara de 5 grade (0 - rezistent puternic, imun; 0,1 - rezistent mediu; 2 - sensibil; 3 - sensibil puternic). Aprecierea s-a făcut la circa 70 de plante pentru părinți, F1 și retroîncrucișările BC1 și BC2 și 200 plante pentru populațiile F2.

40 Acidul fuzaric s-a obținut din filtratul de cultură (FC) al ciupercii *Fusarium oxysporum* Snyder et Hans în modul următor. FC se separă de miceliu prin filtrare, apoi se acidulează până la pH 3,5 cu soluție de HCl de 2N. Se adaugă butanol în proporția 1:5. Amestecul se agită în pâlnia de decantare timp de 10 min. După separare stratul superior butanolic se trece în vaporizator. Se efectuează distilarea până la obținerea precipitatului. Ultimul se dizolvă în 0,2 ml H₂O sau C₂H₅OH, pentru obținerea acidului fuzaric în formă cristalină FC se aduce la pH 4 cu soluție HCl de 2 N, se agită minuțios cu etilacetat, luat în raport de 1:5. Amestecul se sedimentează în pâlnia de decantare, se separă etilacetatul și se evaporă. Precipitatul obținut se dizolvă într-o cantitate mică de apă, se alcalinizează cu bicarbonat de sodiu până la pH = 8-8,5. Preparatul se purifică agitându-l prin scuturare de 2 ori cu un volum înjumătățit de eter. După aceasta FC se separă, se acidulează din nou până la pH 4, se adaugă 5 volume de eter și din nou se agită minuțios prin scuturare. Eterul se varsă în cești de evaporare. După evaporarea lui se formează cristale de acid fuzaric de culoare roz (Методы экспериментальной микологии. Справочник. Киев, Наукова думка, 1982, 550 с.).

55 La 14-16 zile de la polenizare s-au luat boabe de triticeale, s-au sterilizat în soluție de 20% apă clorată filtrată timp de 20 min, s-au clătit de 3 ori în apă distilată, s-au prelevat embrionii și s-au plasat

MD 1482 G2

4

pe mediul MS, suplimentat cu acid fuzaric (0,01%). După 21 zile s-au cântărit calusurile embriogene, cate 50-100 pentru părinți, F1 și formele *backcross* și 200 pentru F2.

Mediul MS are următoarea compoziție (g): 1,65 NH_4NO_3 ; 1,9 KNO_3 ; 0,44 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,37 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,17 KH_2PO_4 ; 0,00013 KI; 0,0062 H_3BO_3 ; 0,0223 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,0086 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,00025 $\text{Na}_2\text{MgO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,000025 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,000025 $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,028 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,0373 $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,1 mezo-inozită; 0,0005 acid nicotinic; 0,0005 piridoxină·HCl; 0,0001 tiamină·HCl; 0,002 glicină; 20 zaharoză (Murashige T., Skoog F. Arevised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Phisiol. Plant. 1962, N 15, p. 473-497).

10 Datele cu privire la nivelul de atac al părinților, hibridilor și retroîncrucișărilor de fuzarioză pe sectorul de testare sunt prezentate în tabelul 1.

Tabelul 1

Reacția liniilor și a populațiilor hibride de triticale la infecția *Fusarium* pe sectorul de testare

Linia, populația	$\bar{X} \pm m_x$, grad	S
P1 AD 206	2,03±0,05	0,15
P2 PRAG 3	2,32±0,05	0,22
F1 AD 206 x PRAG 3	1,82±0,06	0,15
F2 AD 206 x PRAG 3	1,66±0,07	0,80
BC1 F1 x AD 206	1,98±0,05	0,11
BC2 F1 x PRAG 3	2,02±0,06	0, 20
P1 AD 206	2,11±0,04	0,18
P2 AD 113	0,87±0,07	0,51
F1 AD 206 x AD 113	1,15±0,05	0,13
F2 AD 206 x AD 113	1,06±0,08	1,45
BC1 F1 x AD 206	1,48±0,09	0,43
BC2 F1 x AD 113	0,96±0,03	0,04
P1 CAD 2/917	0,98±0,07	0,50
P2 AD 1365	1,03±0,07	0,51
F1 CAD 2/917 x AD 1365	0,50±0,07	0,24
F2 CAD 2/917 x AD 1365	1,00±0,05	0,36
BC1 F1 x CAD 2/917	0,78±0,06	0,15
BC2 F1 x AD 1365	1,02±0,02	0,02

15 În baza datelor obținute s-au calculat efectele acțiunilor genice implicate în ereditatea rezistenței genotipurilor la fuzarioză conform modelului propus de E. Gamble [2] (tab. 2).

Tabelul 2

Efectele acțiunilor genice implicate în ereditatea reacției genotipurilor de triticale la fuzarioză pe fond de infecție

20

Combinăția hibridă	Efectele genice					
	m	a	d	aa	ad	dd
AD 206 x PRAG 3	1,66*	-0,04	1,00*	1,36*	0,00*	-1,36*
AD 206 x AD 113	1,06*	-0,52*	0,30*	0,64*	-0,10*	-0,24*
CAD 2/917 x AD 1365	1,00*	-0,24*	-0,87*	-0,40*	-0,17*	-0,26*

* Valori semnificative la nivelul de 5%

Procedeele de calcul al acțiunilor (a, d) și interacțiunilor (aa, ad și dd) genice după modelul E. Gamble (1962) sunt următoarele:

25

a) Estimarea valorilor și direcției (+ sau -) acțiunilor și interacțiunilor genice:

$$m = \bar{F}2;$$

$$a = B\bar{C}1 - B\bar{C}2;$$

$$d = -1/2\bar{P}1 - 1/2\bar{P}2 + \bar{F}1 - 4\bar{F}2 + 2B\bar{C}1 + 2B\bar{C}2;$$

$$aa = -4\bar{F}2 + 2B\bar{C}1 + 2B\bar{C}2;$$

(Remarcă: în calitate de valori pentru calculul acțiunilor și interacțiunilor servesc datele despre biomasa calusurilor și gradul de atac în condiții de câmp)

MD 1482 G2

5

$$ad = -1/2 \bar{P}_1 + 1/2 \bar{P}_2 + B \bar{C}_1 - B \bar{C}_2;$$

$$dd = \bar{P}_1 + \bar{P}_2 + 2 \bar{F}_1 + 4 \bar{F}_2 - 4B \bar{C}_1 - 4B \bar{C}_2,$$

unde:

m - efectul mediu;

a - acțiunea aditivă;

d - acțiunea dominantă;

5 aa - interacțiunea epistatică de tip aditiv-aditiv;

ad - interacțiunea epistatică de tip aditiv-dominant;

dd - interacțiunea epistatică de tip dominant-dominant

și:

$\bar{P}_1$ - media pentru populația P1;

10 $\bar{P}_2$ - media pentru populația P2;

$\bar{F}_1$ - media pentru populația F1;

$\bar{F}_2$ - media pentru populația F2;

$B \bar{C}_1$ - media pentru prima populație backcross (retroîncrucișarea F1 x P1);

$B \bar{C}_2$ - media pentru a doua populație backcross (retroîncrucișarea F1 x P2).

15

b) Estimarea valorilor acțiunilor și interacțiunilor genice:

$$S_m = S F_2;$$

$$S_a = SBC1 + SBC2;$$

$$S_d = 1/4SP1 + 1/4SP2 + SF1 + 16SF2 + 4SBC1 + 4SBC2;$$

20 $S_{aa} = 16SF2 + 4SBC1 + 4SBC2;$

$$S_{ad} = 1/4SP1 + 1/4SP2 + SBC1 + SBC2;$$

$$S_{dd} = SP1 + SP2 + 4SF1 + 16SF2 + 16SBC1 + 16SBC2.$$

Amintim că varianța S, la Доспехов Б.А. (1985) se folosește simbolul s^2 și se calculează după

formula: $s^2 = \varepsilon(X - \bar{x})^2 / n - 1$ (Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. Москва, Агропром-

25 издат, 1985, с. 160).

c) Autenticitatea acțiunilor și interacțiunilor genice se stabilește după criteriul t:

efectul (acțiunea sau interacțiunea) t/S_x efect;

$$\text{efectul} = S^2 \text{ efect} / n;$$

efectul n pentru $m = nF_2$;

30 efectul n pentru $a = nBC1 + nBC2$;

efectul n pentru $d = 1/4nP1 + 1/4nP2 + nF1 + 16nF2 + 4nBC1 + 4nBC2$;

efectul n pentru $aa = 16nF2 + 4nBC1 + 4nBC2$;

efectul n pentru $ad = 1/4nP1 + 1/4nP2 + nBC1 + nBC2$;

efectul n pentru $dd = nP1 + nP2 + 4nF1 + 16nF2 + 16nBC1 + 16nBC2$.

35

d) Gradele de libertate (GL) s-au calculat după formulele:

$$GL_m = GLF_2 = nF_2 - 1;$$

$$GL_a = (nBC1 - 1) + (nBC2 - 1);$$

$$GL_d = (1/4nP1 - 1) + (1/4nP2 - 1) + (nF1 - 1) + (16nF2 - 1) + (4nBC1 - 1) + (4nBC2 - 1);$$

$$GL_{aa} = (16nF2 - 1) + (4nBC1 - 1) + (4nBC2 - 1);$$

40 $GL_{ad} = (1/4nP1 - 1) + (1/4nP2 - 1) + (nBC1 - 1) + (nBC2 - 1);$

$$GL_{dd} = (nP1 - 1) + (nP2 - 1) + (4nF1 - 1) + (16nF2 - 1) + (16nBC1 - 1) + (16nBC2 - 1).$$

e) Eroarea acțiunilor sau interacțiunilor (efectelor genice) se calculează după formula:

$$S_{\text{efect}} = \sqrt{\frac{S}{n}}.$$

45 Valoarea erorii (S_{efect}) se indică după semnul $\pm$ pentru efectul mediu m, acțiunile a și d, și interacțiunile epistatice de tip aa, ad și dd.

După cum reiese din datele prezentate, la cele 3 combinații aflate în studiu, efectele aditive a și epistatice dd au acționat în direcția diminuării (semnul "-") nivelului de atac al bazei tulpinii (indice al rezistenței). Acțiuni similare, cu caracter sporadic, s-au constatat și pentru celelalte tipuri de efecte - d, aa și ad.

50

Datele cu privire la capacitatea de acumulare a biomasei în cultura embrionilor imaturi ai formelor P1, P2, F1, F2, BC1 și BC2 sunt prezentate în tab. 3.

MD 1482 G2

6

Conform aceluiași model E. Gamble s-au calculat efectele genice implicate în acumularea de biomasă de către calusurile embrionilor imaturi pe mediu cu fuzariotoxină (tab. 4). După cum rezultă din datele prezentate, efectele a și dd în toate 3 cazurile au fost orientate (semnul “+”) în direcția acumulării de biomasă (indice al rezistenței).

5

10

Tabelul 3

Reacția liniilor și a populațiilor hibride de triticale la acidul fuzaric în cultura embrionilor imaturi

Linia	Biomasa calusurilor, mg	
	$\bar{X} \pm m_x$	S
P1 AD 206	59,68±4,01	1156,64
P2 PRAG 3	35,68±2,74	255,32
F1 AD 206 x PRAG 3	37,33±1,57	118,87
F2 AD 206 x PRAG 3	66,30±4,26	1199,69
BC1 F1 x AD 206	23,00±1,89	114,32
BC2 F1 x PRAG 3	17,70±1,79	95,94
P1 AD 206	59,68±4,01	1156,64
P2 AD 113	22,17±1,28	59,11
F1 AD 206 x AD 113	45,85±2,48	282,40
F2 AD 206 x AD 113	60,73±3,61	1001,12
BC1 F1 x AD 206	27,11±1,59	113,28
BC2 F1 x AD 113	27,22±2,89	299,95
P1 CAD 2/917	36,04±1,97	210,53
P2 AD 1365	45,00±3,27	352,88
F1 CAD 2/917 x AD 1365	42,75±2,05	150,94
F2 CAD 2/917 x AD 1365	42,75±2,05	150,94
BC1 F1 x CAD 2/917	19,13±1,65	82,05
BC2 F1 x AD 1365	33,07±2,92	247,92

15

Tabelul 4

Estimarea efectelor genice implicate în reacția embrionilor imaturi de triticale la fuzariotoxină

Combinăția hibridă	Efectele genice					
	m	a	d	aa	ad	dd
AD 206 x PRAG 3	66,30*	5,3*	-194,15*	-183,80*	-6,7	272,42*
AD 206 x AD 113	60,73*	0,11	-129,34*	-134,26*	-18,64*	199,15*
CAD 2/917 x AD 1365	69,00*	13,94*	-169,37*	-171,60*	-9,46*	233,74*

* Valori semnificative la nivelul de 5%

20

Dacă comparăm datele din tab. 2 și tab. 4 vom vedea că din cele 15 variante (3 combinații x 5 tipuri de efecte genice: a, d, aa, ad și dd) în 11 cazuri (73,3%) efectele orientate în direcția scăderii nivelului de atac (semnul “-”) coincid cu orientarea spre sporirea acumulării de biomasă (semnul “+”) în cultura embrionilor imaturi. Cu alte cuvinte, evaluarea biomasei embrionilor imaturi pe mediu MS suplimentat cu acid fuzaric (0,01%) pentru formele de triticale încrucișate în sistem backcross poate servi ca metodă de apreciere a efectelor genice implicate în reacția la fuzarioză.

25

MD 1482 G2

7

(57) Revendicare:

Metodă de apreciere a orientării efectelor genice în reacția genotipurilor de triticales la fuzarioză, care include testarea genotipurilor de triticales încrucișate în sistem backcross pe fond cu fuzariotoxine și calcularea efectelor genice conform modelului E. Gamble, **caracterizată prin aceea că** testarea se efectuează prin cultivarea embrionilor imaturi pe mediul Murashige-Skoog care conține suplimentar 0,01% acid fuzaric, iar la calcularea efectelor genice în calitate de test-parametru se utilizează biomasa embrionilor, totodată în cazul predominării valorilor pozitive ale efectelor genice obținute se consideră că efectele genice sunt orientate spre sporirea rezistenței genotipurilor de triticales la fuzarioză.

15

(56) Referințe bibliografice:

1. Gamble, E.E. Gene effects in corn (*Zea mays L.*). Separation and relative importance of gene effects for yield. Canadian Journal of Plant Science. 1962, № 42, p. 339-343

Șef secție:

CRASNOVA Nadejda

Examinator:

NADIOJCHINA Natalia

Redactor:

CANȚER Svetlana

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: 99-0043 (22) Data depozit: 1999.01.27	(85) Data fazei naționale PCT: (86) Data cererii PCT:
(54) titlul: Metodă de apreciere a orientării efectelor genice în reacția genotipurilor de triticales la fuzarioză Termeni caracteristici : efecte genice, reacția genotipurilor la fuzarioză	
I. D O C U M E N T A R E IN LITERATURA TEHNICO - ȘTIINȚIFICE	
Lucrări consultate (autori, titluri, editura, țara și data publicării)	
II. D O C U M E N T A R E ÎN LITERATURA DE BREVETE DE INVENȚII	
Indicii clasificărilor de brevete : (51) Int. Cl. : A 01 H 1/04; A 01 G 7/00 M D Perioada : 1993-1999 BEA Perioada :1996-1999 Brevete : n-au fost găsite Cereri publicate : n-au fost găsite Cereri nepublicate: n-au fost găsite Brevete: n-au fost găsite Cereri: n-au fost găsite	
Data	Examinator Gușan Ala