



MD 200 Y 2010.05.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **200** ⁽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 2009 0198 (22) Data depozit: 2009.10.21	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2010.05.31, BOPI nr. 5/2010
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE GENETICĂ ȘI FIZIOLOGIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD (72) Inventatori: ANDRONIC Larisa, MD; JACOTĂ Anatolie, 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 tomate**

(57) **Rezumat:**

1

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

Procedeu de obținere a recombinanților de tomate include prelucrarea termică a semințelor mature la 70°C timp de 72 ore, iradierea acestora cu raze gamma în doză de 150 Gy, germinarea semințelor peste două săptămâni după iradiere, sădirea semințelor germinate, infectarea plantelor în faza de 4...6 frunze cu virusul aspermiei toma-

5

2

telor, colectarea fructelor formate pe al doilea ciorchine din mugurii floriali ce au atins lungimea de 2...3 mm la a 15-a zi după infectare, separarea semințelor și obținerea din ele a recombinanților de tomate.

10

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

Revendicări: 1

Descriere:

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

5 Este cunoscut procedeu de obținere a recombinanților de tomate prin infectarea hibridilor F₁ cu virusul mozaicului tutunului în faza de butonizare a primului ciorchine; colectarea fructelor legate din mugurii floralii aflați în fazele meiozei după 4...6 zile de la apariția primelor simptome de viroză; extragerea semințelor din aceste fructe și cultivarea din ele a plantelor cu selectarea formelor recombinante [1].

10 Dezavantajul acestui procedeu constă în aceea că el este îndelungat și complicat în realizare.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în extinderea variabilității genetice la soiuri bazată pe utilizarea în calitate de factor recombinogen a virusului aspermiei tomatelor și a razelor gama.

15 Esența invenției constă în aceea că procedeu de obținere a recombinanților de tomate include prelucrarea termică a semințelor mature la 70°C timp de 72 ore, iradierea acestora cu raze gamma în doză de 150 Gy, germinarea semințelor peste două săptămâni după iradiere, sădirea semințelor germinate, infectarea plantelor în faza de 4...6 frunze cu virusul aspermiei tomatelor, colectarea fructelor formate pe al doilea ciorchine din mugurii floralii ce au atins lungimea de 2...3 mm la a 15-a zi după infectare, separarea semințelor și obținerea din ele a recombinanților de tomate.

20 Rezultatul invenției constă în majorarea frecvenței și a spectrului recombinării meiotice la tomate; modificarea variației și diversificarea spectrului de forme noi ce îmbină caractere cantitative agronomice valoroase; simplificarea procedurii clasice de inducere a formelor noi cu caractere cantitative valoroase necesare procesului de ameliorare a soiurilor de plante.

Au fost cercetate soiurile de tomate Nistru, Prizior și Fachel. Semințele mature au fost prelucrate termic (la 70°C timp de 72 ore) în scopul inactivării germenilor patogeni. După cel puțin două zile de la tratamentul termic jumătate din semințe au fost iradiate cu raze gamma în doză de 150 Gy, utilizând 25 instalația RXM-y-20 (cu capacitatea de 0,65 Gy/s), unde în calitate de sursă radioactivă a servit elementul Co60. După două săptămâni de repaus toate semințele erau plasate în cutii Petri pe discuri din hârtie de filtru îmbibate cu apă distilată, apoi sădite în vase vegetative pentru obținerea răsadului. Jumătate din plantulele crescute din semințele iradiate, precum și jumătate din cele neiradiate, în faza de 30 4...6 frunze, au fost infectate mecanic cu extract al virusului aspermiei tomatelor. Plantulele crescute din semințe neiradiate și neinfectate cu virusul aspermiei tomatelor au servit în calitate de martor. Astfel, toate plantulele fiecărui soi au fost divizate în patru variante experimentale: martor, radiație (plantule obținute din semințe iradiate), virus (plantule infectate cu virusul aspermiei tomatelor) și radiație + virus (plantule crescute din semințe iradiate și infectate cu virusul aspermiei tomatelor). Ulterior, toate plantele au fost răsădite în câmp în condiții similare conform standardelor agrotehnice. 35 Fiecare lot a inclus 30 plante aflate în aceeași fază ontogenetică. Identificarea plantelor infectate a fost realizată la 12...14 zile după infectare prin procedeu imunoenzimatic. Pentru studii ulterioare au fost utilizați mugurii floralii ai celui de-al doilea ciorchine ce au atins lungimea de 2...3 mm la a 15-a zi după infectare, ceea ce corespunde primului maxim al concentrației virionilor în țesuturile nefertile ale anterei. O parte din muguri au fost excizați și fixați pentru cercetări citologice, iar alta etichetată pentru 40 obținerea fructelor și semințelor.

Pentru studiul recombinării meiotice au fost obținute preparate citologice prin tehnica de colorare cu acetocarmină. În cadrul fiecărui lot experimental au fost evaluate cca 60 celule-mamă polinice aflate la etapa de diachineză timpurie. Drept indici ai recombinării meiotice au fost utilizate frecvența și spectrul chiasmelor (tabelul 1).

45 Tabelul 1

Frecvența chiasmelor la soiurile de tomate în condiții de patogeneză

Soiul analizat	Tip chiasme	Martor	Virus	Radiație+virus
Nistru	interstițiale	3,243±1,065	5,216±0,854	5,405±0,927
	totale	16,973±1,771	17,865±1,988	18,432±2,062
Prizior	interstițiale	3,897±1,714	6,308±1,779	6,410±1,681
	totale	16,949±2,492	18,205±2,041	18,615±1,927
Fachel	interstițiale	3,308±0,893	6,256±1,229	6,538±1,143
	totale	15,972±1,559	19,538±1,699	20,154±2,097

virus – varianta experimentală ce include plantule infectate cu virusul aspermiei tomatelor;

50 radiație + virus – varianta experimentală ce include plante crescute din semințe iradiate și infectate cu virusul aspermiei tomatelor.

Conform datelor prezentate în tab.1, infectarea cu virusul aspermiei tomatelor a plantelor obținute din semințe iradiate a indus cea mai majoră creștere a frecvenței chiasmelor interstițiale, cărora le revine rolul principal în generarea variabilității genetice. Complimentarea efectului radiației cu cel cauzat de infecția virală a contribuit la sporirea frecvenței chiasmelor interstițiale față de cea mai apropiată soluție de cca 1,5 ori la soiurile Nistru și Prizior și de 1,7 ori la soiul Fachel.

55

MD 200 Y 2010.05.31

4

5 Fructele legate din florile rămase pe ciorchinele al doilea au fost etichetate și folosite pentru obținerea semințelor din care ulterior au fost crescute plante. La descendenți a fost studiat un șir de caractere morfologice: numărul de lăstari formați, numărul de inflorescențe de pe un lăstar și total per plantă, numărul de fructe legate pe un ciorchine și total per plantă, numărul de fructe legate pe un ciorchine și total per plantă, numărul de semințe per fruct și per plantă, masa unui fruct și masa totală a fructelor unui ciorchine și a plantei. În calitate de parametri fiziologici au fost estimați: începutul înfloririi și coacerii; înflorirea și coacerea în masă. Drept indici biochimici au fost analizați: conținutul substanțelor uscate și aciditatea.

10 Conform rezultatelor obținute la soiurile analizate a fost estimată o extensie accentuată a distribuției valorilor multor caractere cantitative, precum ar fi numărul total de fructe la o plantă, masa unui fruct al ciorchinelui al doilea, numărul de semințe ale unui fruct, numărul de ciorchini cu fructe (tab. 2).

Tabelul 2

15 Coeficientul de variație a unor caractere cantitative în cadrul soiurilor de tomate

Nr.	Parametrul cantitativ analizat	Genotipul analizat		
		Nistru	Prizior	Fachel
1	Fructe per plantă (nr.)	22,79...23,63	47,23...32,15	19,79...34,18
2	Fructe pe ciorchinele al doilea (nr.)	28,21...30,37	30,46...35,00	19,69...52,50
3	Masa unui fruct (g)	8,08...9,80	3,14...11,97	3,09...3,96
4	Masa unui fruct de pe ciorchinele al doilea (g)	10,53...19,79	12,66...17,06	5,77...16,20
5	Semințe per fruct (nr.)	4,36...10,55	3,12...11,60	3,66...18,25
6	Semințe per fruct de pe ciorchinele al doilea (nr.)	11,10...16,26	9,60...11,52	8,20...6,67
7	Lăstari laterali (nr.)	20,28...19,81	19,23... 25,74	18,12...25,24
8	Ciorchini cu fructe (nr.)	15,88...31,80	15,17...31,95	14,89...32,39
9	Conținutul substanțelor uscate	0,90...0,88	1,53...0,89	1,30...1,94
10	Aciditatea	0,90...1,05	0,72...0,97	1,73...1,27

20 Datele prezentate în tab. 2 denotă că diapazonul modificării coeficientului de variație a fost în dependență de soiul analizat. Pentru unele caractere coeficientul de variație a fost modificat doar la un anumit soi. Așa de exemplu, numărul de fructe de pe ciorchinele al doilea la plantele martor, precum și la cele iradiate și infectate la soiul Nistru a variat aproximativ în aceeași proporție de 28,21 și 30,37%, în timp ce la soiul Fachel virusul aspermiei tomatelor în comun cu razele gamma au indus o majorare a variabilității acestui caracter de cca 2,7 ori.

25 Evaluarea coeficientului de variație a permis de a studia comparativ particularitățile individuale în cadrul aceluiași genotip. Utilizarea procedurii propus creează posibilitatea de a evidenția diversificarea formelor de tomate. Astfel, aplicarea radiației și a infecției virale a permis de a modifica interdependența dintre unele caractere corelate, așa cum ar fi masa fructului, numărul de semințe. În așa mod au fost obținute forme ale soiului Fachel cu masă mare a fructului și un număr redus de semințe; masă mare a fructelor primilor ciorchini (în particular al doilea) și conținut sporit de substanțe uscate.

MD 200 Y 2010.05.31

5

(57) Revendicări:

- 5 Procedeu de obținere a recombinanților de tomate, care include prelucrarea termică a semințelor mature la 70°C timp de 72 ore, iradierea acestora cu raze gamma în doză de 150 Gy, germinarea semințelor peste două săptămâni după iradiere, sădirea semințelor germinate, infectarea plantelor în faza de 4...6 frunze cu virusul aspermiei tomatelor, colectarea fructelor formate pe al doilea ciorchine din mugurii floriali ce au atins lungimea de 2...3 mm la a 15-a zi după infectare, separarea semințelor și obținerea din ele a recombinanților de tomate.

10

(56) Referințe bibliografice:

1. SU 1741677 A1 1992.06.23

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 2009 0198	(85) Data fazei naționale PCT:
(22) Data depozit: 2009.10.21	(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 tomate (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): a) Int. Cl.: A01H 1/04 (2006.01) A01H 1/06 (2006.01) C12Q 1/70 (2006.01) C12R 1/94 (2006.01) b) Termeni caracteristici, cuvinte-cheie, sinonime: recombinante la tomate, virus aspermiei tomatelor, iradierea semințelor; рекомбинанты томатов, вирус аспермии томатов, облучение семян	
IV. Documente considerate a fi relevante	
Categoria	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente
A	SU 1741677 A1 1992.06.23
A	MD2572 G2 2004.10.31
A	RU 2136144 C1 1999.09.10
A	RU 2038743 C1 1995.07.09
Relevant față de revendicarea nr.	
1	
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 2010.02.22	
Examinatorul Bantaș Valentina	