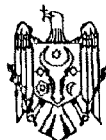




MD 1055 Z 2017.02.28

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **1055** (13) **Z**
(51) Int.Cl: *A01H 4/00* (2006.01)
C12N 9/08 (2006.01)
C12Q 1/28 (2006.01)

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

(21) Nr. depozit: s 2016 0017 (22) Data depozit: 2016.02.12	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2016.07.31, BOPI nr. 7/2016
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE GENETICĂ, FIZIOLOGIE ȘI PROTECȚIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD (72) Inventatori: CAUȘ Maria, MD; CĂLUGĂRU-SPĂTARU Tatiana, MD; DASCALIUC Alexandru, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE GENETICĂ, FIZIOLOGIE ȘI PROTECȚIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	

(54) **Procedeu de determinare a sexului la plantele de *Actinidia arguta* cultivate *in vitro***

(57) **Rezumat:**

1

Invenția se referă la biotehnologie, în special la un procedeu de determinare a sexului la plantele de *Actinidia arguta* cultivate *in vitro*.

Procedeul, conform invenției, constă în determinarea spectrului electroforetic al peroxidazelor în frunzele plantei, obținute la inocularea mugurilor laterali ai minibutașilor și cultivarea lăstarilor obținuți cu inducerea rizogenezei pe un mediu nutritiv, prin macerația frunzelor plantei în soluție tampon

2

0,05 M Tris-HCl, agitarea ulterioară și separarea extractului prin centrifugare, disc-electroforeza extractului în tuburi cu gel de poliacrilamidă cu obținerea spectrului electroforetic al peroxidazelor și dezvoltarea benzilor, totodată dacă spectrul obținut conține 8 peroxidaze, planta este de gen feminin, iar dacă conține 4 peroxidaze – de gen masculin.

Revendicări: 1

Figuri: 1

MD 1055 Z 2017.02.28

(54) Method for determining the sex of *Actinidia arguta* plants cultivated *in vitro*

(57) Abstract:

1

The invention relates to biotechnology, particularly to a method for determining the sex of *Actinidia arguta* plants cultivated *in vitro*.

The method, according to the invention, consists in determining the electrophoretic peroxidase spectrum in the plant leaves, obtained by inoculation of lateral buds of minicuttings and cultivation of the obtained shoots with rhizogenesis induction on a nutrient medium, by maceration of plant leaves in 0.05 M Tris-HCl buffer solution, subsequent

2

mixing and separation of the extract by centrifugation, disc electrophoresis of the extract in tubes with polyacrylamide gel to obtain the electrophoretic peroxidase spectrum and staining of bands, at the same time if the obtained spectrum contains 8 peroxidases, the plant is of feminine gender, and if it contains 4 peroxidases – of masculine gender.

Claims: 1

Fig.: 1

(54) Способ определения пола у растений *Actinidia arguta* культивированных *in vitro*

(57) Реферат:

1

Изобретение относится к биотехнологии, в частности к способу определения пола у растений *Actinidia arguta* культивированных *in vitro*.

Способ, согласно изобретению, состоит в определении электрофоретического спектра пероксидаз в листьях растения, полученного при инокуляции боковых почек миничеренков и выращивании полученных побегов с индукцией ризогенеза на питательной среде, путем мацерации листьев растения в буферном

2

растворе 0,05 М Tris-HCl, последующего перемешивания и отделения экстракта при центрифугировании, диск-электрофореза экстракта в трубках с полиакриламидным гелем с получением электрофоретического спектра пероксидаз и окрашивания полос, при этом если полученный спектр содержит 8 пероксидаз, растение женского рода, а если содержит 4 пероксидазы - мужского рода.

П. формулы: 1

Фиг.: 1

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie, în special la un procedeu de determinare a sexului la plantele de *Actinidia arguta* cultivate *in vitro*.

5 In literatura de specialitate sexul plantelor la *Actinidia arguta* poate fi identificat numai după morfologia florilor, adică la momentul primului an de înflorire, care are loc la 4...6 ani.

Este cunoscut procedeu de determinare a sexului în baza spectrului electroforetic al peroxidazelor (PO) în țesuturile calusului, lăstarilor și rădăcinilor de *Actinidia*
10 *deliciosa in vitro* feminine și masculine. Pentru obținerea extractelor enzimaticе s-a folosit soluția tampon de 0,15 M Tris-HCl, suplimentată cu 6 mM acid ascorbic, 6 mM hipoclorit de cisteină și 0,5 M zaharoză, pH=8,3. Extractele omogenizate au fost centrifugate timp de 5 min la 12 000 g și temperatura de -4°C. Supernatantul a fost folosit în analizele enzimaticе. Spectrele PO au fost obținute prin efectuarea
15 electroforezei în tuburi cu gel de poliacrilamidă 7%, pH=8,9. Vizualizarea benzilor corespunzătoare ale PO s-a efectuat cu utilizarea 0,1% benzidină în 0,1 M acetat de sodiu, pH=5,5, cu adaos de 0,1% de H₂O₂. Însă metoda menționată, comparativ cu metoda propusă, are unele deosebiri și neajunsuri.

Deosebirea dintre specii. În procedeu cunoscut s-a studiat *Actinidia deliciosa*, iar în
20 procedeu propus s-a studiat *Actinidia arguta*. Speciile respective se deosebesc după mai multe caractere morfo-fiziologice.

Fazele de dezvoltare a inoculilor cultivați *in vitro*, precum și conținutul mediilor de
cultivare. Pentru activarea și obținerea țesuturilor feminine și masculine de *Actinidia*
25 *deliciosa* s-a aplicat procedeu de cultivare constituit din două etape, cu o perioadă lungă de propagare, fiind folosite două tipuri de medii de cultivare. În procedeu propus, obținerea minibutașilor feminini și masculini *in vitro* este posibilă într-o singură etapă, cu utilizarea unui singur mediu de cultivare (Brevet MD 605 Z 2013.10.31).

Spre deosebire de spectrele electroforetice ale PO studiate la *Actinidia deliciosa*
din celulele calusului nediferențiat, lăstarilor (2,5...3 cm) și rădăcinilor la etapele
30 incipiente de dezvoltare, în procedeu propus, pentru obținerea spectrelor electroforetice ale PO s-au folosit frunze de *Actinidia arguta* ale minibutașilor feminini și masculini, cultivați *in vitro*, cu toate organele vegetative dezvoltate. Fiecare minibutaș de *Actinidia arguta* avea înălțimea de aproximativ 10 cm și 7...8 perechi de frunze, fiind la etapa finală de dezvoltare *in vitro*, cu transferul ulterior în condiții *ex vitro*.

Spre deosebire de componența soluției tampon folosită în cea mai apropiată soluție
35 pentru obținerea extractelor enzimaticе, în procedeu propus a fost utilizată soluția tampon de 0,05 M Tris HCl, fără adaosuri, cu pH=6,8. Acesta este un efort mai puțin costisitor față de cea mai apropiată soluție.

Neajunsurile procedurii cunoscut menționat diminuează exactitatea și
40 productivitatea, sporesc eforturile financiare și cele umane, depuse pentru obținerea rezultatelor.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în determinarea sexului la plante de
Actinidia arguta la etapa de dezvoltare completă a organogenezei *in vitro*, ce permite de
45 a identifica plantele feminine cu 4...5 ani înaintea înfloririi lor, ceea ce asigură accelerarea procesului de selecție la această specie cu cel puțin 4 ani.

Invenția soluționează problema prin aceea că se propune un procedeu de determinare a sexului la plantele de *Actinidia arguta* cultivate *in vitro*, care constă în determinarea
spectrului electroforetic al peroxidazelor în frunzele plantei, obținute la inocularea
mugurilor laterali ai minibutașilor și cultivarea lăstarilor obținuți cu inducerea
50 rizogenezei pe un mediu nutritiv, prin macerația frunzelor plantei în soluție tampon 0,05 M Tris-HCl, în raport de 1:2 respectiv, la un pH=6,8, agitarea ulterioară în decurs de 20 min și separarea extractului prin centrifugare la 15000 g timp de 15 min la temperatura de -4°C, disc-electroforeza extractului în tuburi cu gel de poliacrilamidă de 7,5%, în decurs de 3 ore la 2,5 mA/tub și 300 V cu obținerea spectrului electroforetic al
55 peroxidazelor, dezvoltarea benzilor cu soluție de 0,1% de benzidină în 0,2 M acetat de sodiu, la un pH=4,8, suplimentată cu 0,1% H₂O₂, totodată dacă spectrul obținut conține 8 peroxidaze, planta este de gen feminin, iar dacă conține 4 peroxidaze – de gen masculin.

- Rezultatul invenției constă în posibilitatea de a determina sexul minibutașilor de *Actinidia arguta* la etapa completă de dezvoltare a organogenezei *in vitro*, cu transferul ulterior în condiții *ex vitro*, identificarea plantelor feminine cu 4...5 ani înaintea înfloririi lor, ceea ce asigură accelerarea procesului de selecție la această specie cu cel puțin 4 ani.
- Exemplu de realizare a invenției
- Pentru obținerea extractelor enzimatic s-au utilizat frunze de plantule masculine și feminine, obținute la inocularea mugurilor laterali ai minibutașilor și cultivarea lăstarilor obținuți cu inducerea rizogenezei pe un mediu nutritiv. Materialul vegetal a fost macerat cu sticlă pisată în prezența soluției tampon 0,05 M Tris HCl, pH=6,8, în raport 1:2. Apoi extractele omogenizate au fost agitate 20 min și centrifugate 15 min la 15000 g, la temperatura de -4°C. Supernatantul a servit drept extract enzimatic pentru etapele ulterioare ale experiențelor.
- Studiul spectrului electroforetic al PO s-a realizat prin utilizarea disc-electroforezei în tuburi cu gel de poliacrilamidă de 7,5%, în condiții native, în conformitate cu metoda (Davis B.J.: Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. - Ann. New York Acad. Sci., 1964, vol. 121, p. 404-427). În fiecare tub s-au introdus câte 0,1 ml extract enzimatic. Electroforeza a fost efectuată în frigider la temperatura +6°C pe parcursul a 3 ore, la 300 V și 2,5 mA/tub. Developarea benzilor s-a realizat cu soluție de 0,1% benzidină în 0,2 M acetat de sodiu, pH= 4,8, cu adaos de 0,1% H₂O₂. Fotografierea s-a realizat cu utilizarea sistemului de documentare - Vilber Lourmat. Rezultatele obținute sunt prezentate în figură. Pe spectrul electroforetic al PO din figură sunt identificate nouă peroxidaze (PO1, PO2, PO3, PO4, PO5, PO6, PO7, PO8, PO9), dintre care cinci sunt specifice numai plantelor feminine, una este specifică plantelor masculine, iar trei sunt comune, ce ne permite să tragem concluzia că dacă spectrul obținut conține 8 peroxidaze, planta este de gen feminin, iar dacă conține 4 peroxidaze – de gen masculin.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Auxtova O., Samaj J., Cholvadova B., Khandlova E. Isoperoxidase and isopolyphenol oxidase spectra in male and female tissues of *Actinidia deliciosa in vitro*. Biologia Plantarum, 1994, vol. 94(4), p. 535-541

(57) Revendicări:

Procedeu de determinare a sexului la plantele de *Actinidia arguta* cultivate *in vitro*, care constă în determinarea spectrului electroforetic al peroxidazelor în frunzele plantei, obținute la inocularea mugurilor laterali ai minibutașilor și cultivarea lăstarilor obținuți cu inducerea rizogenezei pe un mediu nutritiv, prin macerația frunzelor plantei în soluție tampon 0,05 M Tris-HCl, în raport de 1:2 respectiv, la un pH=6,8, agitarea ulterioară în decurs de 20 min și separarea extractului prin centrifugare la 15000 g timp de 15 min la temperatura de -4°C, disc-electroforeza extractului în tuburi cu gel de poliacrilamidă de 7,5%, în decurs de 3 ore la 2,5 mA/tub și 300 V cu obținerea spectrului electroforetic al peroxidazelor, developarea benzilor cu soluție de 0,1% de benzidină în 0,2 M acetat de sodiu, la un pH=4,8, suplimentată cu 0,1% H₂O₂, totodată dacă spectrul obținut conține 8 peroxidaze, planta este de gen feminin, iar dacă conține 4 peroxidaze – de gen masculin.

Șef Direcție Brevete:

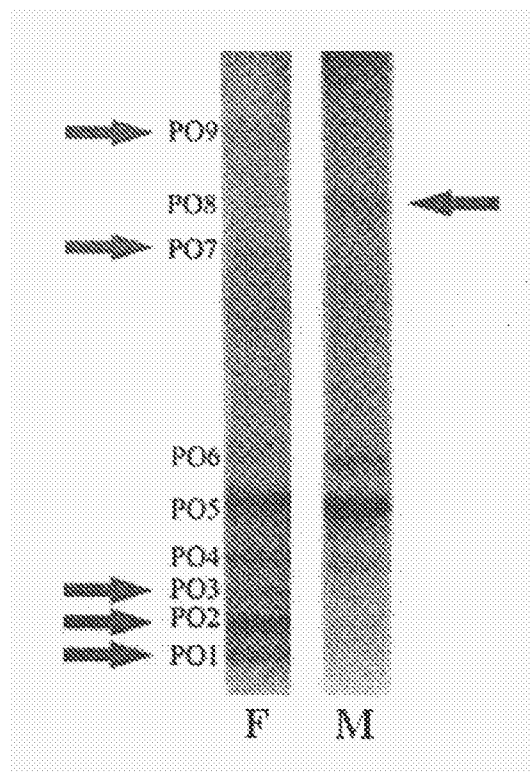
GUȘAN Ala

Șef Secție Examinare:

LEVIȚCHI Svetlana

Examinator:

COLESNIC Inesa



RAPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii

(21) Nr. depozit: s 2016 0017 (32) Data de prioritate recunoscută:
 (22) Data depozit: 2016.02.12 Raport de documentare internațională: ☐ da
 (67) Numărul cererii transformate și data transformării:
 (71) Solicitant: **INSTITUTUL DE GENETICĂ, FIZIOLOGIE ȘI PROTECȚIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD**
 (54) **Titlul: Procedeu de determinare a sexului la plante de *Actinidia arguta in vitro***

II. Clasificarea obiectului invenției:

(51) **Int.Cl: A01H 4/00** (2006.01)
C12N 9/08 (2006.01)
C12Q 1/28 (2006.01)

III. Colecții și Baze de date de brevete cercetate (denumirea, termeni caracteristici, ecuații de căutare reprezentative)

MD - Intern « Documentare Invenții » (inclusiv cereri nepublicate; trunchiere automată stanga/dreapta):

Int.Cl: A01H 4/00

C12N 9/08

C12Q 1/28

Peroxidaze, Actinidia, sexul plantelor

EA, (Eapatis):

Int.Cl: A01H 4/00

C12N 9/08

C12Q 1/28

Пероксидазы, пол растений, Actinidia,

IV. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate

V. Documente considerate a fi relevante

Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A, D, C	O. Auxtova, J. Samaj, B. Cholvadova, E. Khandlova. Isoperoxidase and isopolyphenol oxidase spectra in male and female tissues of <i>Actinidia deliciosa in vitro</i> , Biologia Plantarum, 1994, vol. 94(4), p. 535-541	1
A	MD 605 Y 2013.03.31	1

*** categoriile speciale ale documentelor citate:**

A – document care definește stadiul anterior general	T – document publicat după data depozitului sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidență principiul sau teoria pe care se bazează invenția
X – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau	E – document anterior dar publicat la data depozit național reglementar sau după aceasta dată

implicând activitate inventivă când documentul este luat în considerație de unul singur	
Y – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe documente de aceeași categorie	D – document menționat în descrierea cererii de brevet
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expoziție sau la orice alte mijloace de divulgare	C – document considerat ca cea mai apropiată soluție
	& – document, care face parte din aceeași familie de brevete
P - document publicat înainte de data de depozit, dar după data priorității invocate	L – document citat cu alte scopuri
Data finalizării documentării 2016.04.26	
Examinator COLESNIC Inesa	