



MD 1799 F1

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) 1799⁽¹³⁾ F1
(51) Int. Cl.⁷: A 01 G 7/00;
A 01 H 1/04

(12) BREVET DE INVENȚIE

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată în termen de 6 luni de la data publicării	
(21) Nr. depozit: a 2000 0061 (22) Data depozit: 2000.04.07	(43) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului pe răspunderea solicitantului: 2001.12.31, BOPI nr. 12/2001
(71) Solicitant: Institutul de Genetică al Academiei de Științe a Republicii Moldova, MD (72) Inventatori: LUPAȘCU Galina, MD; BARBACARI Nicolae, MD (73) Titular: Institutul de Genetică al Academiei de Științe a Republicii Moldova, MD	

(54) Metodă de apreciere a rezistenței genotipurilor de triticale la fuzarioză

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la agricultură, în particular, la
genetica și selecția plantelor și poate fi utilizată
pentru aprecierea rezistenței genotipurilor de
triticale la fuzarioză.

Esența invenției constă în aprecierea rezistenței
genotipurilor de triticale la fuzarioză prin analiza
electroforetică a biopolimerilor în radicele de triti-
cale după tratarea boabelor cu acid fuzaric de
0,01% timp de 18 ore. Se analizează spectrul
electroforetic al produselor amplificării fragmen-
telor de ADN în cadrul reacției în lanț a poli-

2
merazei la utilizarea primerilor oligonucleotidici
OPA.2: 5'TGCCGAGCTG-3' și OPA.3:
5'AGTCAGCCAC-3'. Plantele de triticale, la care
spectrul electroforetic al produselor amplificării
fragmentelor de ADN cu greutatea 100...400
perechi de nucleotide nu se schimbă, se apreciază
ca rezistente la fuzarioză.

Revendicări: 1
Figuri: 2

15

MD 1799 F1

MD 1799 F1

3

Descriere:

Invenția se referă la agricultură, în particular la genetica și selecția plantelor și poate fi utilizată pentru aprecierea rezistenței genotipurilor de triticale la fuzarioză.

Este cunoscută metoda de apreciere a rezistenței culturilor cerealiere la fuzarioză prin evaluarea în grade a suprafeței brunificate sau necrozate de la baza tulpinii [1].

Însă această metodă are un șir de dezavantaje, necesitând un volum mare de lucru pentru prepararea inocului (izolate de ciuperci multiplicare pe grâu sterilizat) pentru crearea fondului de infecție, suprafețe mari de teren, examinarea multor plante pe parcursul a câțiva ani. În afară de aceasta, gradul de atac de fuzarioză în condiții de câmp depinde în mare măsură de condițiile de mediu, ceea ce pune la îndoială obiectivitatea metodei de apreciere. Totodată, introducerea inocului în sol are implicații ecologice nedorite.

Este cunoscută, de asemenea, metoda de apreciere a rezistenței genotipurilor de triticale la fuzarioză prin testarea nivelului de sinteză a proteinelor solubile în apă (PSA) în plantele (radicele) tratate cu filtrat de cultură (FC) al ciupercii *Fusarium graminearum* Schwabe [2]. Dezavantajul acestei metode constă în faptul că pentru atingerea efectului scontat în cazul genotipurilor rezistente este necesară aplicarea unui suplimentar factor de acțiune - a celui termic ($t=6^{\circ}\text{C}$), ceea ce face ca metoda să fie laborioasă. De rând cu aceasta, separarea benzilor de proteine în unele zone ale trusei nu este suficientă, ceea ce conduce la diminuarea potențialului informațional al moleculelor de proteine cu masă moleculară diferită și la lipsa de claritate a rolului acestora în reacția la fuzarioză.

Problema pe care o rezolvă invenția este asigurarea unei aprecieri rapide, obiective și eficiente a rezistenței genotipurilor de triticale la fuzarioză.

Esența invenției constă în aprecierea rezistenței genotipurilor de triticale la fuzarioză prin analiza electroforetică după spectrul produselor amplificării fragmentelor de ADN ca rezultat al reacției în lanț a polimerazei (polimerase chain reaction - PCR) cu primerii OPA.2: 5' TGCCGAGCTG-3' și OPA.3: 5' AGTCAGCCAC-3' la tratarea boabelor de triticale cu acid fuzaric de 0,01% timp de 18 ore. Plantele de triticale al căror spectru electroforetic al produselor amplificării fragmentelor de ADN cu greutatea 100...400 perechi de nucleotide nu se schimbă în comparație cu varianta de control sunt apreciate drept rezistente la fuzarioză.

Rezultatul invenției constă în accelerarea, sporirea exactității și veridicității metodei de apreciere a nivelului de rezistență a genotipurilor de triticale la fuzarioză.

Exemplu

În experiență se utilizează linii de triticale selectate din soiurile: PRAG 3, AD 1365, AD 206, CP 2779, cât și hibridii F1: AD 1365 x AD 206, CAD 2/917 x PRAG 3, AD 1365 x CAD 2/917, CP 2779 x CAD 2/917. Liniile din soiurile PRAG 3, AD 206 și CP 2779 sunt sensibile la fuzarioză, linia din soiul AD 1365, cât și hibridii F1 AD 1365 x AD 206, CAD 2/917 x PRAG 3, AD 1365 x CAD 2/917 sunt rezistenți, iar hibridul F1 CP 2779 x CAD 2/917 este rezistent-mediu rezistent.

Pentru infectarea plantelor în condiții de câmp se folosește un amestec de izolate *Fusarium sp.* (inocul), multiplicare pe grâu sterilizat. Boabele, câte 50 la număr, se seamănă în rânduri cu lungimea de 1,5 m și se acoperă cu 100 g de inocul. Distanța dintre rânduri a fost de 40 cm. Experiența s-a executat în 3 repetiții. În anul 1996 și termenul 1 din a. 1997 semănatul s-a efectuat la sfârșitul lunii septembrie, iar în termenul 2 din a. 1997 - la 14 octombrie. Condițiile mai puțin favorabile ale termenului 2 stimulează dezvoltarea fuzariozei. Gradul de atac s-a evaluat în scara de 5 grade după suprafața brunificată sau necrotizată de la baza tulpinii la etapa de coacere a boabelor: 0 grade - imun (I); 0,1 - rezistent puternic (RR); 1 - rezistent (R); 2 - sensibil (S); 3 - sensibil puternic (SS) conform metodei propuse în [1]. Estimarea s-a efectuat la 30...40 de plante în fiecare repetiție. Rezultatele sunt expuse în tabel.

MD 1799 F1

4

Date comparative ale nivelului de atac al unor genotipuri de triticale pe fond de infecție la fuzarioză

Nr. d/o	Genotipuri	Reacția	a. 1997	a. 1998, termenul 1	a. 1998, termenul 2
			$\bar{X} \pm m_x, \text{grad}$	$\bar{X} \pm m_x, \text{grad}$	$\bar{X} \pm m_x, \text{grad}$
1	PRAG 3	S	2,32±0,05	2,22±0,05	2,57±0,04
2	AD 1356	R	1,00±0,07	1,02±0,03	1,08±0,03
3	AD 206	S	2,03±0,05	2,04±0,04	2,41±0,05
4	CP 2779	S	1,85±0,04	2,04±0,04	1,99±0,03
5	F ₁ AD 206xAD 1365	R	1,25±0,06	1,16±0,03	1,20±0,04
6	F ₁ AD 1365xAD 206	R	1,00±0,08	1,05±0,04	1,08±0,10
7	F ₁ CAD 2/917xPRAG 3	R	0,85±0,05	0,79±0,04	0,85±0,03
8	F ₁ AD 1365xCAD 2/917	R	0,50±0,07	0,49±0,04	0,55±0,06
9	F ₁ CP 2779xCAD 2/917	R-MR	1,17±0,05	1,50±0,05	1,54±0,05
10	CAD 2/917 (standard)	R	0,90±0,07	0,88±0,03	0,93±0,02

După cum rezultă din datele prezentate, pe fond de infecție cu inocul *Fusarium* nivelul de atac al genotipurilor aflate în studiu a fost diferențiat, variind între 0,50...2,32 grade în a. 1997 și 0,49...2,57 în cele 2 termene din a. 1998.

Filtratul de cultură (FC) al ciupercii *F. graminearum* Schwabe a fost preparat în mediul Cszapek conform metodei cunoscute (Методы экспериментальной микологии. Киев, Наукова думка, 1982, 550 c.).

Pentru cercetările de laborator boabele s-au tratat în FC și acid fuzaric sintetic (una din toxinele de bază ale ciupercilor *Fusarium*) timp de 18 ore.

Analiza electroforetică a peroxidazei a fost efectuată în sistem de poliacrilamidă sub formă de placă cu grosimea de 1 mm și lungimea de 8 cm. Cercetările s-au efectuat în condiții nedaturate în gel omogen de 8% în sistemul Ornstein, Devis (Maurer I. Disc-electroforez. Moscova, Mir, 1971, 247 p.). Preparatele cu activitate peroxidazică au fost obținute prin mărunțirea materialului vegetal (radicelele plantelor de 7 zile) în piuliță cu tampon 0,005 M tris-OH-tris-HCl, pH 7,2, ce conținea 0,01 M MgCl₂ și 0,25 M zaharoză în proporție de 1:8.

Pentru identificarea benzilor de peroxidază gelul a fost colorat timp de 20 min în soluție de benzidină în tampon acetat, apoi în H₂O₂ de 0,3% timp de 10...15 min și după apariția benzilor a fost spălat în alcool. Experiența s-a efectuat în 3 repetiții. Rezultatele sunt prezentate în fig. 1.

Pentru analiza PSA materialul vegetal s-a pregătit în modul următor. Boabele de triticale au fost tratate timp de 20 ore cu FC al izolatei N16 *Fusarium graminearum* Schwabe și H₂O, după care s-au plasat în cutii Petri pe hârtie de filtru umezită cu aceste soluții. S-au menținut timp de 24 ore la 24°C pentru inițierea creșterii, apoi o jumătate din vase a fost transferată în frigider la 6°C, iar cealaltă jumătate a fost lăsată pentru 48 ore la 24°C la întineric. După expirarea timpului s-au prelevat 124 mg radicele, din fiecare variantă, și s-au fixat în azot lichid la -24°C.

Extragerea proteinelor. Materialul congelat (0,5 g) a fost mărunțit într-un mijac în prezența azotului lichid. În probă s-au adăugat 500 ml soluție-tampon pentru extragere/introducere cu următoarea componență: 0,125 M tris-HCl, pH 6,8, 1% SDA; 25% 2-mercaptoetanol; 10% glicerol; 0,0012% bromfenol albastru.

Prepararea probelor pentru electroforeză. 50 μl extract de proteine se amestecă cu un volum egal de soluție-tampon pentru extragere. Probele se incubează 5 min la 95°C, apoi se centrifughează 1 min în microcentrifugă. Supernatantul se introduce în gel.

Electroforeza moleculelor de proteine. Electroforeza s-a efectuat în gel de poliacrilamidă cu concentrația de 8...20%. Gelul de separare cu grosimea de 1 mm și lungimea de 15 cm a fost preparat în baza soluției-tampon pentru separare cu următoarea componență: 0,375 M tris-HCl, pH 8,8, 0,1% SDS, iar gelul de concentrare - în baza soluției-tampon pentru concentrare (0,125 M tris-HCl, pH 6,8, 0,1% SDS). Electroforeza s-a efectuat în soluția-tampon cu compoziția 0,25 tris-HCl, pH 8,2, 0,193 M glicină, 0,1% SDS la o tensiune a curentului continuu de 50 V/cm-h.

Vizualizarea proteinelor în gelul PAAG. După electroforeză gelul se incubează în soluția pentru fixare/colorare cu următoarea componență: 25% izopropanol; 10% acid acetic glacial; 0,25% Coomassie albastru (R250) timp de 2 ore. Decolorarea gelului se efectuează în soluție de 7% acid acetic glacial. Fotografieră gelului s-a efectuat pe filmul fotografic Mikrat-300.

Analiza electroforetică a PSA în radicelele de triticale în funcție de genotip și condiții a demonstrat că acțiunea factorilor stresogeni (FC, t=6°C), cât și acțiunea comună a acestora (FC, 6°C), au influențat atât asupra spectrului general, cât și asupra nivelului de sinteză a proteinelor solubile în apă cu masă moleculară diferită. Filtratul de cultură a produs o intensificare ușoară a sintezei proteinelor cu masă moleculară diferită la genotipul CAD 2/917 și a proteinelor cu masă moleculară mare-medie (Rf=0,31...0,53) la genotipul PRAG 3.

MD 1799 F1

5

Temperatura de 6°C a produs o inhibare pronunțată a sintezei tuturor PSA la genotipul CAD 2/917. La genotipul PRAG 3 sub acțiunea separată a FC, temperaturii de 6°C, cât și sub acțiunea comună a FC și temperaturii de 6°C s-au intensificat ușor benzile cu $R_f=0,31...0,53$. La genotipul rezistent CAD 2/917, spre deosebire de genotipul sensibil PRAG 3, acțiunea comună a FC și temperaturii de 6°C, care mărește efectul primului produs, sinteza unei proteine noi cu $R_f=0,31...0,53$, adică a celor cu masă moleculară mare și medie (fig. 1).

Datele obținute permit de a concluziona că apariția sau intensificarea puternică a benzilor electroforetice sub acțiunea FC *Fusarium graminearum* Schwabe în limitele $R_f=0,19...0,53$, ce caracterizează proteinele cu masă moleculară mare și medie la genotipuri de triticale cu rezistență la fuzarioză, poate servi în calitate de test rapid și eficient de estimare a genotipurilor de triticale în vederea rezistenței la această boală.

Totodată, putem constata că unul din neajunsurile acestei metode constă în faptul că pentru atingerea efectului scontat în cazul genotipurilor rezistente este necesară aplicarea unui suplimentar factor de acțiune - a celui termic ($t=6^\circ\text{C}$), ceea ce face ca metoda să fie laborioasă. De rând cu aceasta, separarea benzilor de proteine în unele zone ale trusei nu este suficientă, ceea ce conduce la diminuarea potențialului informațional al moleculelor de proteine cu masă moleculară diferită și la lipsa de claritate a rolului acestora în reacția la fuzarioză.

Analiza spectrului ADN-ului genomic prin metoda PCR s-a efectuat în felul următor.

Izolarea ADN-ului. 1 g de material proaspăt de radicele de triticale de 7 zile a fost fărâmițat în azot lichid, la care s-au adăugat 3 volume de soluție-tampon cu următoarea componență: 133 mmoli de tris-HCl, pH 7,8, 6,7 mmoli de EDTA-Na, 0,95 M NaCl, 1,33% sarcozil de Na, 1,33% - mercaptoetanol. Amestecul a fost trecut într-o eprubetă de polipropilenă pentru incubare timp de 30 min la 65°C, amestecându-l peste fiecare 5 min. După aceasta omogenatul a fost tratat cu 1 volum de amestec de cloroform:alcoool izoamilic (24:1) și fracția apoasă a fost îndepărtată după centrifugare. ADN-ul din fracția apoasă a fost precipitat cu 2/3 volume de izopropanol. "Meduzele" de ADN formate au fost transferate în micropipete "Ependorf" și clătite cu alcoool etilic de 70%, ce conținea 0,2 M de acetat de natriu pentru 30 min. După aceasta ADN-ul a fost clătit încă de 2 ori cu alcoool etilic de 70%. În continuare preparatele de ADN s-au uscat în aer la temperatura camerei timp de 5 min (Vallejos C.E., Sakigama N.S., Chase C.D. A molecular marker-based linkage map of *Phaseolus vulgaris* L. Genetics, 1992, nr. 131, p. 733-740).

Amplificarea ADN-ului. Pentru reacția în lanț a polimerazei a fost utilizat setul de reactivi "Boehringer Mannheim" (Germania). Amplificarea fragmentelor de ADN s-a efectuat în amestecul de reagenți cu 1 volum de 25 μl , ce conținea 1x tampon din setul corespunzător, 2,5 mmoli MgCl_2 , 100 μM al fiecărui dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 1 $\mu\text{M}/\mu\text{l}$ de primeri corespunzători, 0,5 unități de Taq-polimerază și 50 ng de ADN genomic. Pentru tehnologia RAPD (randomly amplified polymorphic DNA), care se consideră una din cele mai accesibile și simple în analiza PCR, au fost utilizați primerii oligonucleotidici OPA.2:

5'TGCCGAGCTG-3' și OPA.3: 5' AGTCAGCCAC-3', sintetizați de firma "Gibco BRL" (SUA). Analiza PCR s-a efectuat în amplificatorul "Crocodyle III", produs de firma "Appligene" (SUA). Reacțiile s-au efectuat după următorul program:

- 1) 3 min, 94°C; 0,5 min, 36°C; 2 min, 72°C - 1 ciclu;
- 2) 0,3 min, 94°C; 0,5 min; 36°C; 2 min, 72°C - 43 cicluri;
- 3) 0,3 min, 94°C; 0,5 min; 36°C; 10 min, 72°C - 1 ciclu.

Fragmentele amplificate de ADN au fost analizate prin electroforeză în gel de agaroză de 2%.

Analiza electroforetică în gel de agaroză. La 2 g de agaroză produsă de firma "Sigma" s-au adăugat 98 ml de soluție-tampon de 40 mmoli de tris-acetat, pH 8 și 1 mmol de EDTA, conținutul fiind încălzit până la fierbere. Ulterior, agaroză dizolvată a fost lăsată la temperatura camerei până la atingerea temperaturii de 45°C, după care a fost turnată în forme speciale, unde se introducea pieptenele. După răcirea agarozăi acesta era scos și gelul se transfera în camera pentru electroforeză. Pentru procesul de amplificare în amestecul de reagenți s-au adăugat 5 μl de albastru de bromfenol, ce conținea 1x TAE de tampon și 20% de glicerină și se agita minuțios. În continuare ADN-ul s-a introdus în buzunărașele de gel agaros, după care s-a produs separarea fragmentelor de ADN la un curent continuu de 60 V timp de 2,2...3,0 ore.

După electroforeză gelul s-a colorat cu bromură de etil de 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ timp de 30 min. Ulterior separarea electroforetică s-a înregistrat cu ajutorul transiluminatorului, iar gelul s-a fotografiat. Experiența s-a efectuat în 3 repetiții.

Rezultatele analizei PCR sunt prezentate în fig. 2.

După cum reiese din rezultatele obținute, la formele sensibile de triticale, sub acțiunea acidului fuzaric s-a produs schimbarea spectrului fragmentelor de ADN (profilurile RAPD) amplificate: la linia PRAG 3 nu s-a sintetizat fragmentul cu greutatea 400 p.n., la linia AD 206 - fragmentele cu greutatea 100, 300 și 400 p.n., iar la linia CP 2779, dimpotrivă, s-au sintetizat fragmentele cu greutatea moleculară de 100 și 400 p.n. Totodată, la

MD 1799 F1

6

5 genotipurile rezistente - linia AD 1365 și hibrizii F1 aflați în studiu (variantele 10-17) nu s-au atestat schimbări în spectrul electroforetic al fragmentelor amplificate. Cu alte cuvinte, inhibarea sau stimularea amplificării fragmentelor de ADN genomic la genotipurile de triticales, sub influența acidului fuzaric (0,01%) în cadrul reacției în lanț a polimerazei în regiunea 100...400 p.n. servește ca indiciu al sensibilității acestei culturi la fuzarioză, și, dimpotrivă, păstrarea spectrului foretic al ADN-ului în regiunea dată la tratarea boabelor cu această toxină poate servi ca criteriu al rezistenței la această boală.

10

(57) Revendicare:

15 Metodă de apreciere a rezistenței genotipurilor de triticales la fuzarioză care include analiza electroforetică a biopolimerilor în radicele de triticales după tratarea boabelor cu filtrat de cultură al ciupercii *Fusarium graminearum* Schwabe, **caracterizată prin aceea că** tratarea boabelor se efectuează cu acid fuzaric de 0,01% timp de 18 ore, se analizează spectrul electroforetic al fragmentelor de ADN genomic în cadrul reacției în lanț a polimerazei la utilizarea *primerilor* oligonucleotidici OPA.2: 5'TGCCGAGCTG-3' și OPA.3: 5'AGTCAGCCAC-3' și se apreciază ca rezistente la fuzarioză acele genotipuri de triticales la care nu se schimbă spectrul electroforetic al fragmentelor de ADN cu greutatea 100...400 perechi de nucleotide.

20

25

(56) Referințe bibliografice:

1. Попов Ю.В. Шкала учета корневых гнилей. В: Зерновое хозяйство. 1985, № 9, с. 21
2. MD 1261 G2

Şef Secție:

CRASNOVA Nadejda

Examinator:

NADIOJCHINA Natalia

Redactor:

CANȚER Svetlana

MD 1799 F1

7

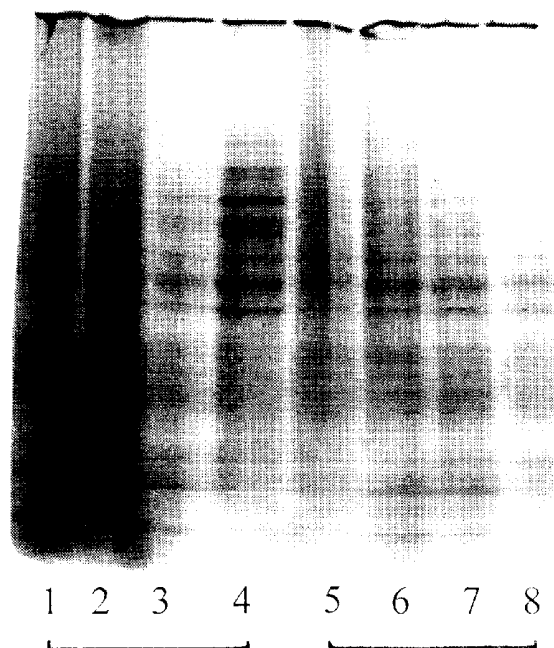


Fig. 1. Electroforegrama proteinelor solubile în apă sintetizate în radicele de triticale sub acțiunea FC *F. graminearum* și temperaturii scăzute

1 - martor; 2 - FC; 3 - $t=6^{\circ}\text{C}$; 4 - FC + $t=6^{\circ}\text{C}$; 5 - martor; 6 - FC; 7 - $t=6^{\circ}\text{C}$; 8 - FC + $t=6^{\circ}\text{C}$

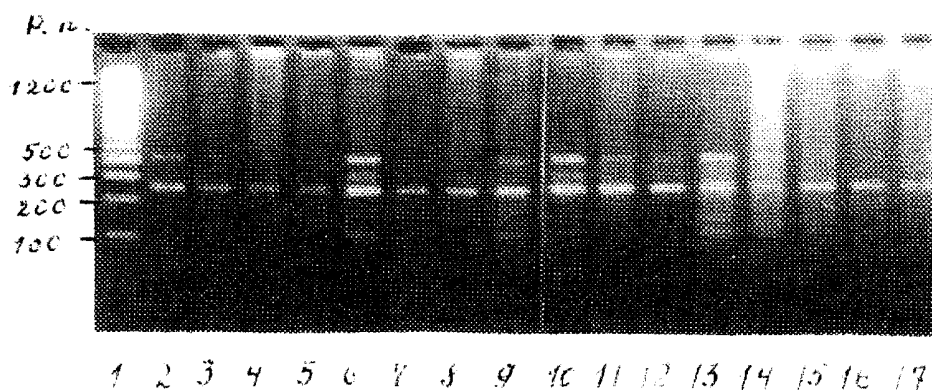


Fig. 2. Profilurile RAPD (spectrele) ale ADN-ului genomic extras din linii și hibrizi de triticale cu rezistență diferită la fuzarioză sub acțiunea acidului fuzaric

(1 - marker al greutatei moleculare, 100 perechi de nucleotide (p.n.); 2 - PRAG 3, martor (m); 3 - PRAG 3, acid fuzaric (a. f.); 4 - AD 1365, m; 5 - AD 1365, a. f.; 6 - AD 206, m; 7 - AD 206, a. f.; 8 - CP 2779, m; 9 - CP 2779, a. f.; 10 - F_1 AD 1365 x AD 206, m; 11 - F_1 AD 1365 x AD 206, a.f.; 12 - F_1 CAD 2/917 x PRAG 3, m; 13 - F_1 CAD 2/917 x PRAG 3, a. f.; 14 - F_1 AD 1365 x CAD 2/917, m; 15 - F_1 AD 1365 x CAD 2/917, a. f.; 16 - F_1 CP 2779 x CAD 2/917, m; 17 - F_1 CP 2779 x CAD 2/917, a. f.).

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: a 2000 0061		
(22) Data depozit: 2000.04.07		
(51) Int. Cl. (7) : A 01 G 7/00; A 01 H 1/04		
(54) Titlul : Metodă de apreciere a rezistenței genotipurilor de triticeale la fuzarioză		
(71) Solicitantul : Institutul de Genetică al Academiei de Științe a Republicii Moldova, MD		
Termeni caracteristici : rezistențe genotipurilor de triticeale la fuzarioză, metodă de apreciere		
I. Minimul de documente consultate (sistema clasificării și indici de clasificare Int. Cl. - 7)		
A 01 G 7/00; A 01 H 1/04		
II. Documente considerate ca relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	1261 MD	1
A	1482 MD	1
☐ Documentele următoare sunt indicate în continuare a rubricii II		☐ Informația referitoare la brevete paralele se anexează
* categoriile speciale ale documentelor consultate:		P - document publicat înainte de data depozitului național reglementat dar după data priorității invocate
A - document care definește statutul general al tehnicii		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 care conține baza invenției
E - document anterior dar publicat la data de depozit național reglementar sau după aceasta data		X - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă
L - document care poate pune în discuție data priorității invocate, poate contribui la data publicării altor divulgări sau pentru un motiv expres (se va indica motivul)		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, aceasta combinație fiind evidentă pentru o persoană de specialitate
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expunere sau orice altă		& - document care face parte din aceeași familie de documente
Data efectuării de documentare		2001.02.05
Examinatorul		Nadiojchina Natalia

RAPORT DE DOCUMENTARE

Informația referitoare la brevete paralele		(21) Nr. depozit:	
Date de identificare ale documentelor citate în raport	Data publicării	Brevete paralele	Data publicării
1	2	3	4