



MD 461 Z 2012.08.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **461** ⁽¹³⁾ **Z**
(51) Int.Cl: *A01H 4/00* (2006.01)
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**

(21) Nr. depozit: s 2011 0099 (22) Data depozit: 2011.06.03	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2012.01.31, BOPI nr. 1/2012
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE GENETICĂ ȘI FIZIOLOGIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD (72) Inventator: ANDRONIC Larisa, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE GENETICĂ ȘI FIZIOLOGIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	

(54) **Procedeu de obținere a somaclonelor de varză**

(57) **Rezumat:**

1
Invenția se referă la biotehnologie, în parti-
cular la un procedeu de obținere a somaclon-
nelor de varză.

Procedeul include infectarea mecanică a
plantelor în faza de două frunzulițe cotile-
donate cu virusul mozaicului conopidei, colec-
tarea explantelor de țesut mezofil din sec-
toarele învecinate zonelor clorotice, sterilizarea
lor, inocularea explantelor pe mediul nutritiv
Murashige și Skoog, ce conține agar 7 g/l,
chinetină 0,01 mg/l și suplimentar 6-benzil-
aminopurină 0,5 mg/l, acid naftilacetic 0,5
mg/l, cu incubarea ulterioară a lor la întuneric
la temperatura de 25°C pentru inițierea for-
mării calusului morfogen, apoi cu o foto-

2
5 perioadă de 16 ore la iluminare de 2000 lx și
temperatura de 27°C, transferarea calusurilor
morfogene pe medii nutritive proaspete cu
obținerea somaclonelor și înrădăcinarea ulte-
rioară a lor pe mediul nutritiv Murashige și
Skoog, ce conține suplimentar acid naftilacetic
0,5 mg/l cu adaptarea ulterioară la condiții *ex-
vitro* și plantarea în sol a somaclonelor.

10 Rezultatul invenției constă în sporirea
variabilității somaclonale la varză și în posi-
bilitatea selecției somaclonelor care posedă
caractere cantitative, nespecifice pentru soiul
15 inițial.

Revendicări: 1

MD 461 Y 2012.08.31

(54) Process for the production of cabbage somaclones

(57) Abstract:

1 The invention relates to biotechnology, in particular to a process for the production of cabbage somaclones.

2 The process includes the mechanical infection of plants in the phase of two cotyledonous leaves with the cauliflower mosaic virus, selection of mesophilic tissue explants from the chlorotic areas adjacent sectors, their sterilization, inoculation of explants in the Murashige-Skoog nutrient medium, containing 7 g/l of agar, 0.01 mg/l of kinetin and additionally 0.5 mg/l of 6-benzylaminopurine, 0.5 mg/l of naphthaleneacetic acid, followed by their incubation in the dark at the temperature of 25°C to initiate the formation of morphogenic callus, and then

3 with a photoperiod of 16 hours at the light of 2000 lx and the temperature of 27°C, transfer of morphogenic calluses to fresh nutrient media to obtain somaclones and their subsequent establishment in the Murashige-Skoog nutrient medium, containing additionally 0.5 mg/l of naphthaleneacetic acid, followed by adaptation to *ex-vitro* conditions and planting in soil of somaclones.

4 The result of the invention is to increase the somaclonal variation of cabbage and the possibility of selecting somaclones with quantitative traits, non-specific for the original variety.

5 Claims: 1

(54) Способ получения соматклонов капусты

(57) Реферат:

1 Изобретение относится к биотехнологии, в частности к способу получения соматклонов капусты.

2 Способ включает механическое инфицирование растений в фазе двух семядольных листьев вирусом мозаики цветной капусты, отбор эксплантов мезофильной ткани из секторов соседних хлоротичных зон, их стерилизацию, инокулирование эксплантов на питательную среду Мурасиге-Скуга, содержащую 7 г/л агара, 0,01 мг/л кинетина и дополнительно 0,5 мг/л 6-бензиламинопурина, 0,5 мг/л нафтилуксусной кислоты, с последующим их инкубированием в темноте при температуре 25°C для иницирования формирования морфогенного

3 каллуса, а затем с фотопериодом 16 часов при освещении 2000 лк и температуре 27°C, перенос морфогенных каллусов на свежие питательные среды с получением соматклонов и последующее их укоренение на питательной среде Мурасиге-Скуга, содержащей дополнительно 0,5 мг/л нафтилуксусной кислоты с последующей адаптацией к условиям *ex-vitro* и посадку в почву соматклонов.

4 Результат изобретения состоит в повышении соматклональной изменчивости капусты и возможности отбора соматклонов, обладающих количественными признаками, неспецифическими для исходного сорта.

5 П. формулы: 1

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie, în particular la un procedeu de obținere a somaclonelor de varză.

5 Este cunoscut procedeuul tradițional de generare a diversității genetice prin tehnici de culturi de țesuturi ce are la bază variabilitatea somaclonală [1].

Conform procedeuului dat cultivarea *in vitro* a țesuturilor poate genera variații somaclonale, rata cărora pentru același genotip depinde de mai mulți factori. Procedeuul prevede selectarea minuțioasă a explantelor. Pentru culturile leguminoase, inclusiv cele din specia *Brassica*, sunt propuse diverse părți de organe, inclusiv frunzele tinere. Ulterior se prevede realizarea etapelor de regenerare și reconstrucție integrală a plantelor prin inducerea embriogenezei somatice (cultivarea pe medii nutritive în condiții *in vitro*). Variabilitatea genetică în sistemele *in vitro* este întâmplătoare și limitată. Totodată, în aceste condiții se constată sporirea procentului de monstruozi, ceea ce diminuează avantajul aplicării procedeuului de inducere a variabilității somaclonale în scopul creării de genotipuri cu noi caractere agronomic valoroase.

15 Problema pe care o rezolvă invenția constă în obținerea și sporirea ratei de regeneranți de varză cu caractere noi, valoroase ce ar putea servi drept material inițial în ameliorarea soiurilor prin tehnici netradiționale.

Procedeuul de obținere a somaclonelor de varză, conform invenției, include infectarea mecanică a plantelor în faza de două frunzulițe cotiledonate cu virusul mozaicului conopidei, colectarea explantelor de țesut mezofil din sectoarele învecinate zonelor clorotice, sterilizarea lor, inocularea explantelor pe mediul nutritiv Murashige și Skoog, ce conține agar 7 g/l, chinetină 0,01 mg/l și suplimentar 6-benzilaminopurină 0,5 mg/l, acid naftilacetic 0,5 mg/l, cu incubarea ulterioară a lor la întuneric la temperatura de 25°C pentru inițierea formării calusului morfogen, apoi cu o fotoperioadă de 16 ore la iluminare de 2000 lx și temperatura de 27°C, transferarea calusurilor morfogene pe medii nutritive proaspete cu obținerea somaclonelor și înrădăcinarea ulterioară a lor pe mediul nutritiv Murashige și Skoog, ce conține suplimentar acid naftilacetic 0,5 mg/l cu adaptarea ulterioară la condiții *ex-vitro* și plantarea în sol a somaclonelor.

Noutatea invenției constă în utilizarea în calitate de explant pentru obținerea somaclonelor de varză a pieselor de țesut mezofilian derivate de la plante de varză infectate cu virusul mozaicului conopidei, ceea ce permite sporirea diversității generate de culturile *in vitro*.

30 Rezultatul invenției constă în sporirea variabilității somaclonale la varză și în posibilitatea selecției somaclonelor care posedă caractere cantitative, nespecifice pentru soiul inițial.

Exemplu de realizare a invenției

35 În cercetare au fost antrenate soiurile tardive de varză albă (*Brassica oleracea* L. var. capitata), sensibile față de virusul mozaicului conopidei (CaMV - virus ADNds, reprezentant al genului *Caulimovirus*): Zavadovskaia, Moldovanca și Amager.

Din fiecare genotip au fost sădite câte 30 plante. Jumătate din ele în faza de 2 frunze cotiledonate au fost infectate mecanic cu inocul al CaMV, care a fost izolat din *Datura stramonium* și identificat prin analiza imunosorbentă (ELISA). Plantulele neinfectate au servit în calitate de martor, iar cele infectate au format varianta experimentală.

Pentru cultura *in vitro* au fost utilizate explantele de țesut mezofilian, învecinat zonelor clorotice, recoltate după 20 zile de la infectare de la plante ce au prezentat simptome externe de boală. Fragmentele de mezofil au fost ținute timp de 3 min în apă cu câteva picături de Tween-20 (0,1%), apoi clătite în apă curgătoare timp de 10 min. Piese recoltate au fost sterilizate timp de 15 min în soluție de hipoclorit de sodiu (diluție 1:1 a preparatului comercial „ACE” – apă distilată). După aseptizare, piesele au fost trecute prin 3 băi de apă sterilă, a câte 5 min în fiecare, pentru înlăturarea totală a clorului. Toate operațiunile de sterilizare a explantelor, precum și de inoculare pe medii de cultură, s-au desfășurat în condiții aseptice, în interiorul hotei cu flux laminar de aer steril. Vitrocultura a fost inițiată în eprubete, conținând câte 2 ml de mediu de cultură Murashige și Skoog ce conține 20 g/l zaharoză și 7 g/l agar, suplimentat cu 6-benzilaminopurină (BAP) – 0,5 mg/l, acid naftil-acetic (ANA) – 0,5 mg/l, chinetină – 0,01 mg/l, care s-a dovedit optim pentru toate trei genotipuri de varză analizate. Valoarea pH-ului mediului nutritiv a fost ajustată înainte de autoclavare până la 5,7. Pentru inducerea calusogenezei eprubetele au fost incubate la întuneric la temperatura de 25°C. Pe mediul respectiv la a 7...9-a zi după inoculare se observau inițieri de proliferare, după care explantele cu răspuns de calusare au fost transferate în condiții constante de temperatură cu o fotoperioadă de 16 ore, T 27°C și iluminare de 2000 lx. La fiecare 2...3 săptămâni se efectuau pasaje, respectând normele aseptice. Calusurile ce au prezentat zone morfogene au fost transferate în flacoane Magenta ce conțineau 5

ml mediu de cultură proaspăt. În urma a 4-5 pasaje se dezvoltau regeneranți, care în faza de 2-3 frunzulițe adevărate erau transferați pe mediul de rizogeneză Murashige și Skoog suplimentat cu ANA (0,5 mg/l). La 6...7 zile după pasaj pe acest mediu regeneranții prezentau un sistem radicular cu perișori absorbanti bine dezvoltați. După care plantulele erau transferate în vase de plastic de 500 ml cu amestec de sol:turbă (1:3). Vasele cu plantule se acopereau cu peliculă de polietilenă și se transferau în camera de cultură la 25...27°C și cu o fotoperioadă de 16 ore pentru adaptare *ex-vitro*. La apariția primei frunzulițe noi regeneranții erau plantați în sol conform tehnicilor standard.

Schema experimentului a cuprins două variante: 1– regeneranți obținuți din fragmente de țesut mezofilian recoltate de la plante martor; 2 – regeneranți obținuți din fragmente de țesut mezofilian alăturat sectoarelor învecinate zonelor clorotice colectate de la plante infectate cu CaMV.

Conform rezultatelor prezentate în tabelul 1 se constată, că efectul indus de infecția virală nu generează reducerea semnificativă a frecvenței regenerării, ceea ce permite obținerea unui număr esențial de regeneranți.

Tabelul 1

Frecvența regenerării *in vitro* la soiurile de varză albă (*Brasica oleracea* L. var. capitata) infectate cu virusul mozaicului conopidei (CaMV)

Genotipul analizat	Varianta	Frecvența regenerării
Amager	1	69,84±1,58
	2	56,67±3,33
Moldovanca	1	54,62±2,91
	2	46,63±1,71
Zavadovskaia	1	59,16±2,86
	2	55,83±4,06

Variabilitatea morfologică a regeneranților a fost evaluată după un șir de caractere morfologice: lățimea și lungimea frunzei, precum și coraportul acestor doi indici; numărul de frunzulițe; lungimea rădăcinii și tulpinii; conținutul de substanțe uscate.

Deosebiri statistic confirmate între valorile medii ale indicilor morfologici analizați au fost estimate pentru valorile statistice ale frunzulițelor, în timp ce coraportul dintre acești indici a rămas fără modificare (tabelul 2).

Tabelul 2

Valorile medii ale unor caractere morfologice la regeneranții de varză derivați prin cultivare *in vitro*

Indicii morfologici	Soiul Amager		Soiul Moldovanca		Soiul Zavadovskaia	
	1	2	1	2	1	2
Lungimea unei frunzulițe (mm)	37,73±2,04	29,91±2,23	38,36±2,02	30,36±2,09	37,54±2,08	32,09±2,03
Lățimea unei frunzulițe (mm)	29,64±1,77	24,45±1,59	29,82±1,59	24,09±1,55	28,81±1,63	24,82±1,45
Coraportul lățime/lungime	0,78±0,02	0,83±0,01	0,78±0,02	0,80±0,24	0,77±0,03	0,78±0,02
Frunzulițe per regenerant (număr)	4,09±0,25	4,18±0,23	4,27±0,195	4,45±0,25	4,36±0,27	4,82±0,33
Lungimea rădăcinii (mm)	14,32±1,16	13,81±1,39	14,77±1,15	13,82±1,40	14,65±1,14	14,03±1,40
Lungimea tulpinii (mm)	1,93±0,14	2,67±0,19	1,98±0,13	2,64±0,19	1,98±0,15	2,65±0,19
Conținutul substanțelor uscate (%)	12,02±0,81	13,93±1,77	11,99±0,76	14,10±2,24	12,26±0,47	13,97±1,84

Variabilitatea sporită a unor caractere denotă inducerea unor clase noi de indivizi cu valori netipice soiului inițial, precum și celor obținuți pe cale biotehnologică tradițională.

- 5 Destabilizarea valorilor coeficientului de variație a unor caractere cantitative și inducerea unor noi clase fenotipice în cadrul soiurilor analizate de varză albă în urma aplicării procedurii propus denotă posibilitatea utilizării infecției produse de virusul mozaic al conopidei în calitate de inductor al variabilității somaclonale.

10

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. In vitro technology for mutation breeding. A technical document issued by the International Atomic Energy Agency, IAEA-TECDOC 392, Vienna, 1986, p. 9-10, 12-14, 34, 47

(57) Revendicări:

Procedeu de obținere a somaclonelor de varză care include infectarea mecanică a plantelor în faza de două frunzulițe cotiledonate cu virusul mozaic al conopidei, colectarea explantelor de țesut mezofil din sectoarele învecinate zonelor clorotice, sterilizarea lor, inocularea explantelor pe mediul nutritiv Murashige și Skoog, ce conține agar 7 g/l, chinetină 0,01 mg/l și suplimentar 6-benzilaminopurină 0,5 mg/l, acid naftilacetic 0,5 mg/l, cu incubarea ulterioară a lor la întuneric la temperatura de 25°C pentru inițierea formării calusului morfogen, apoi cu o fotoperioadă de 16 ore la iluminare de 2000 lx și temperatura de 27°C, transferarea calusurilor morfogene pe medii nutritive proaspete cu obținerea somaclonelor și înrădăcinarea ulterioară a lor pe mediul nutritiv Murashige și Skoog, ce conține suplimentar acid naftilacetic 0,5 mg/l cu adaptarea ulterioară la condiții *ex-vitro* și plantarea în sol a somaclonelor.

Șef Secție:	COLESNIC Inesa
Examinator:	BANTAȘ Valentina
Redactor:	LOZOVANU Maria

RAPPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii

(21) Nr. depozit: s 2011 0099

(32) Data de prioritate recunoscută:

(22) Data depozit: 2011.06.03

Raport de documentare internațională: ☐ da

(54) Titlul: Procedeu de obtinere a somaclonalelor verzei

(67)* Nr.	si data	transformării cererii
1	15.05.2017	15.05.2017
2	15.05.2017	15.05.2017
3	15.05.2017	15.05.2017
4	15.05.2017	15.05.2017
5	15.05.2017	15.05.2017
6	15.05.2017	15.05.2017
7	15.05.2017	15.05.2017
8	15.05.2017	15.05.2017
9	15.05.2017	15.05.2017
10	15.05.2017	15.05.2017
11	15.05.2017	15.05.2017
12	15.05.2017	15.05.2017
13	15.05.2017	15.05.2017
14	15.05.2017	15.05.2017
15	15.05.2017	15.05.2017
16	15.05.2017	15.05.2017
17	15.05.2017	15.05.2017
18	15.05.2017	15.05.2017
19	15.05.2017	15.05.2017
20	15.05.2017	15.05.2017
21	15.05.2017	15.05.2017
22	15.05.2017	15.05.2017
23	15.05.2017	15.05.2017
24	15.05.2017	15.05.2017
25	15.05.2017	15.05.2017
26	15.05.2017	15.05.2017
27	15.05.2017	15.05.2017
28	15.05.2017	15.05.2017
29	15.05.2017	15.05.2017
30	15.05.2017	15.05.2017
31	15.05.2017	15.05.2017
32	15.05.2017	15.05.2017
33	15.05.2017	15.05.2017
34	15.05.2017	15.05.2017
35	15.05.2017	15.05.2017
36	15.05.2017	15.05.2017
37	15.05.2017	15.05.2017
38	15.05.2017	15.05.2017
39	15.05.2017	15.05.2017
40	15.05.2017	15.05.2017
41	15.05.2017	15.05.2017
42	15.05.2017	15.05.2017
43	15.05.2017	15.05.2017
44	15.05.2017	15.05.2017
45	15.05.2017	15.05.2017
46	15.05.2017	15.05.2017
47	15.05.2017	15.05.2017
48	15.05.2017	15.05.2017
49	15.05.2017	15.05.2017
50	15.05.2017	15.05.2017
51	15.05.2017	15.05.2017
52	15.05.2017	15.05.2017
53	15.05.2017	15.05.2017
54	15.05.2017	15.05.2017
55	15.05.2017	15.05.2017
56	15.05.2017	15.05.2017
57	15.05.2017	15.05.2017
58	15.05.2017	15.05.2017
59	15.05.2017	15.05.2017
60	15.05.2017	15.05.2017
61	15.05.2017	15.05.2017
62	15.05.2017	15.05.2017
63	15.05.2017	15.05.2017
64	15.05.2017	15.05.2017
65	15.05.2017	15.05.2017
66	15.05.2017	15.05.2017
67	15.05.2017	15.05.2017
68	15.05.2017	15.05.2017
69	15.05.2017	15.05.2017
70	15.05.2017	15.05.2017
71	15.05.2017	15.05.2017
72	15.05.2017	15.05.2017
73	15.05.2017	15.05.2017
74	15.05.2017	15.05.2017
75	15.05.2017	15.05.2017
76	15.05.2017	15.05.2017
77	15.05.2017	15.05.2017
78	15.05.2017	15.05.2017
79	15.05.2017	15.05.2017
80	15.05.2017	15.05.2017
81	15.05.2017	15.05.2017
82	15.05.2017	15.05.2017
83	15.05.2017	15.05.2017
84	15.05.2017	15.05.2017
85	15.05.2017	15.05.2017
86	15.05.2017	15.05.2017
87		

(71) Solicitant: **INSTITUTUL DE GENETICĂ ȘI FIZIOLOGIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINTE A MOLDOVEI, MD**

(51) (Int.Cl): **Int.Cl: A01H 4/00** (2006.01) **C12Q 1/70** (2006.01)

A01H 1/04 (2006.01) **C12R 1/94** (2006.01)

A01H 1/06 (2006.01)

II. Conditii de unitate a inventiei:

x satisfie	$\square$ nu satisfie
------------	-----------------------

Note:

III.Revendicări: claritatea, susținerea de descriere

Note: ☒ x satisfice ☐ nu satisfice

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

MD (Documentare Invenții (inclusiv cereri nepublicate)) - **Int.Cl:** *A01H 4/00* (2006.01); *C12Q 1/70* (2006.01); *A01H 1/04* (2006.01); *C12R 1/94* (2006.01); *A01H 1/06* (2006.01)

somaclon*, infectare, Murashige și Skoog, varză

EA, CIS (Eapatis) – **Int.Cl:** *A01H 4/00* (2006.01); *C12Q 1/70* (2006.01) ; *A01H 1/04* (2006.01); *C12R 1/94* (2006.01); *A01H 1/06* (2006.01)

сомаклон*, среда Мурасиге-Скуга, инфицирован*, капуста

V. Baze de date si colectii de literatură nonbrevet cercetate

VI. Documente considerate a fi relevante

Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	MD 722 G2 1997.05.31	1
A	MD 3899 C2 2009.05.31	1
A	SU 1323046 A1 1987.07.15	1

A	SU 1729337 A1 1992.04.30	1
A, C	In vitro technology for mutation breeding. A technical document issued by the International Atomic Energy Agency, IAEA-TECDOC 392, Vienna, 1986, p. 9-10, 12-14, 34, 47	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 evidența principiul sau teoria pe care se bazează invenția	
X – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă când documentul este luat în considerație de unul singur	E – document anterior dar publicat la data depozit național reglementar sau după aceasta dată	
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 2011.11.01		
Examinator BANTAȘ Valentina		