



MD 4036 C1 2010.05.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) 4036 (13) C1

(51) Int. Cl.: A01N 45/00 (2006.01)  
C07J 51/00 (2006.01)  
A01P 21/00 (2006.01)  
A01C 1/00 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

<p>(21) Nr. depozit: a 2009 0131 (22) Data depozit: 2009.10.01</p>	<p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2010.05.31, BOPI nr. 5/2010</p> <p>(67)* Nr. și data transformării cererii: s 2009 0186, 2009.12.08</p>
<p>(71) Solicitant: INSTITUTUL DE GENETICĂ ȘI FIZIOLOGIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD</p> <p>(72) Inventatori: ȘVEȚ Stepan, MD; VEVERIȚĂ Efimia, MD; CHINTEA Pavel, MD; JACOTĂ Anatolie, MD; MARCENCO Alexandra, MD</p> <p>(73) Titular: INSTITUTUL DE GENETICĂ ȘI FIZIOLOGIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD</p>	

(54) 3-O-[[α-L-ramnopiranozil (1→2)]-[α-L-ramnopiranozil (1→4)]-β-D-glucopiranozidă]-(25R)-colest-5-en-3β,19,22β,26-tetraol-[26-O-β-D-glucopiranozidă], care sporește legarea semințelor la hibridizarea la distanță

(57) Rezumat:

1

Invenția se referă la o substanță biologic activă din clasa glicozidelor steroidice, care poate fi aplicată în selecție la încrucișarea grâului comun de toamnă cu seară pentru obținerea noilor forme de triticale.

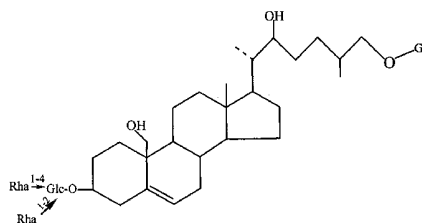
Se propune o glicozidă steroidică nouă de tip colestanic 3-O-[[α-L-ramnopiranozil(1→2)]-[α-L-ramnopiranozil (1→4)]-β-D-glucopiranozidă]-(25R)-colest-5-en-3β,19,22β,26-tetraol-[26-O-β-D-glucopiranozidă] cu formula structurală:

2

5

10

15



unde Glc – glucoza, Rha – ramnoza, care sporește legarea semințelor la hibridizarea la distanță.

Revendicări: 1

MD 4036 C1 2010.05.31

## MD 4036 C1 2010.05.31

3

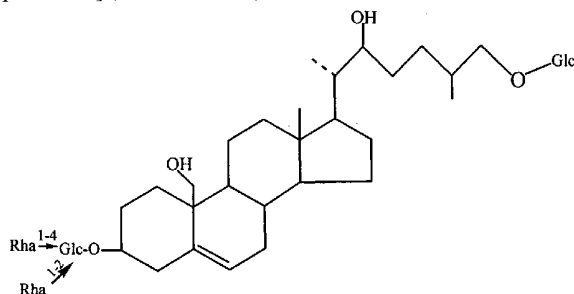
### Descriere:

Invenția se referă la o substanță biologic activă din clasa glicozidelor steroidice, care poate fi aplicată în selecție la încrucișarea grâului comun de toamnă cu secară pentru obținerea noilor forme de triticale.

5 Se cunoaște utilizarea unei glicozide steroidice de tip furostanolic 3-O-[[ $\beta$ -D-glucopiranozil (1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucopiranozil (1 $\rightarrow$ 4)]- $\beta$ -D-glucopiranozil(1 $\rightarrow$ 3)] -  $\beta$ -D-galactopiranozidă]-(25R)-5 $\alpha$ -furostan - 3 $\beta$ , 22 $\alpha$ , 26-triol - [26-O- $\beta$ -D- glucopiranozidă] (hiosciamozida G), obținute din semințele de *Hyosciamus niger* L. pentru sporirea legării semințelor la încrucișarea grâului comun de toamnă cu secară [1]. Însă preparatul cunoscut posedă eficacitate insuficientă.

10 Problema pe care o rezolvă invenția constă în sporirea producției semințelor hibride la încrucișarea grâului comun de toamnă cu secară și extinderea arsenalului de substanțe, care sporesc legarea semințelor la hibridizare la distanță.

15 Se propune o glicozidă steroidică nouă de tip colestanic 3-O-[[ $\alpha$ -L-ramnopiranozil(1 $\rightarrow$ 2)]- $\alpha$ -L-ramnopiranozil (1 $\rightarrow$ 4)]- $\beta$ -D-glucopiranozidă]-(25R)-colest-5-en-3 $\beta$ ,19,22 $\beta$ ,26-tetraol-[26-O- $\beta$ -D-glucopiranozidă] (floridanozida H) cu formula structurală:



unde Glc – glucoza, Rha – ramnoza, care sporește legarea semințelor la hibridizarea la distanță.

20 Floridanozida H reprezintă o glicozidă steroidică nouă de tip colestanic, care nu este descrisă în literatura de specialitate. Proprietățile fizico-chimice ale substanței:  $t_{\text{top}}$  = 169°C,  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  - 75°(C 0,3; H<sub>2</sub>O). Formula brută: C<sub>51</sub>H<sub>86</sub>O<sub>22</sub>.

Floridanozida H reprezintă un praf de culoare cafenie deschisă, se dizolvă bine în apă, alcoolii (etilic, metilic, butilic), nu se dizolvă în acetona, cloroform, eter dietilic.

25 La hidroliza acidă totală a floridanozidei H prin metode fizico-chimice a fost identificat (25R)-colest-5-en-3 $\beta$ , 19, 22 $\beta$ , 26-tetranolul în calitate de aglicon (floridogenin), formula brută C<sub>27</sub>H<sub>46</sub>O<sub>4</sub> RMN<sup>13</sup>C(ppm.) 34,8(C-1), 30,4(C-2) 73,6(C-3), 39,3(C-4) 137,2(C-5), 126,9(C-6) 33,3(C-7) 34,1(C-8) 52,0(C-9), 42,2(C-10), 22,9(C-11), 41,2(C-12) 42,0(C-13), 58,7(C-14) 24,8(C-15), 29,9(C-16), 53,2(C-17), 12,3(C-18) 63,0(C-19) 41,5(C-20) 11,6(C-21), 74,0(C-22), 31,8(C-23), 33,4(C-24), 34,7(C-25) 76,1(C-26), 16,9(C-27).

30 În partea oligozaharidică a floridanozidei H, utilizând cromatografierea în strat subțire (CSS) și cromatografia pe hârtie, au fost identificate glucoza și ramnoza, iar cu ajutorul CGL a acetatilor derivaților aldononitrilici ai monozaharidelor obținute s-a constatat că aceste monozaharide sunt în raport de 2:2.

35 Consecutivitatea unirii monozaharidelor în lanțul glucidic a fost stabilită prin hidroliza acidă parțială, iar analiza produselor obținute în rezultatul metilării și metanolizei floridanozidei H permetilate a permis determinarea dimensiunilor ciclurilor oxidative și ale succesiunii de unire a monozaharidelor între ele.

40 În baza rezultatelor metilării și hidrolizei parțiale a floridanozidei H s-a constatat că lanțul glucidic al glicozidei este ramificat și la glucoză, în pozițiile 2 și 4, care este unită nemijlocit de aglicon, sunt unite două molecule de ramnoză.

O moleculă de glucoză este unită de aglicon în poziția C<sub>26</sub>, ceea ce s-a stabilit prin scindarea fermentativă a glicozidei.

45 Datele spectrale C<sup>13</sup>RMN au confirmat această structură. În spectru s-au observat deplasări chimice în câmp slab ale atomilor C<sub>2</sub> și C<sub>4</sub> ai moleculei de glucoză, ale atomilor C<sub>3</sub> și C<sub>26</sub> ai agliconului (efectul glicozidării).

Tipurile de substituție în resturile monozaharidice și aglicon s-au stabilit, de asemenea, în urma analizei spectrale ENO (efectul nucleu Overhauser) în sistemul de coordonare (ROESY).

50 În spectrul floridanozidei H s-au evidențiat picuri de corelație în coordonate a deplasărilor chimice a H-1 a glucopiranozidei și H-3 a agliconului, H-1 a ramnopiranozidei terminale și H-2 a glucopiranozidei, H-1 a celei de-a doua ramnopiranozide terminale și H-4 a glucopiranozidei, H-1 a glucopiranozidei terminale și H-26 a agliconului.

## MD 4036 C1 2010.05.31

4

Rezultatul invenției constă în aceea că a fost obținută o glicozidă nouă, care sporește legarea semințelor la hibridizare la distanță; concomitent contribuie la extinderea asortimentului de glicozide steroidice care pot fi utilizate în agricultură în calitate de substanțe biologice active de proveniență naturală.

### 5 Procesul de obținere a floridanozidei H

3-O-[[ $\alpha$ -L-ramnopiranozil(1 $\rightarrow$ 2)]-[[ $\alpha$ -L-ramnopiranozil(1 $\rightarrow$ 4)]- $\beta$ -D-glucopiranozidă]-(25R)-colest-5-en-3 $\beta$ ,19,22 $\beta$ ,26-tetraol-[26-O- $\beta$ -D-glucopiranozidă] a fost obținută prin următorul procedeu: semințele de *Physalis floridana* Rydb. (0,5 kg) uscate la aer liber au fost mărunțite, degresate cu cloroform (2 ori x 1 litru) și supuse extragerii complete în soluție de 70% de etanol apos la încălzire (3 ori x 1 litru). Extractele obținute au fost unite, evaporate până la soluție apoasă, care a fost extrasă cu butanol (4 ori x 150 ml). Extractele butanolice concentrate în condiții de vid până la sediment uscat au fost diluate în 50 ml de etanol. Din soluția obținută au fost precipitate glicozidele sumare cu acetonă. Sedimentul a fost separat prin filtrare și uscat în condiții de vid. Masa glicozidelor sumare obținute constituie 10,5 g sau 2,1% din masa materiei prime inițiale. Prin aplicarea filtrării pe gel Sefadex G-25 și cromatografierii pe o coloană cu silicagel L 40/100  $\mu$ m suma de glicozide a fost separată în fracții a câte 10 ml. Controlul asupra separării a fost efectuat prin cromatografierea în strat subțire și relevarea componentelor cu reactivi Sanie și H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. S-au obținut 0,08 g de floridanozidă H, ce constituie 0,16% din greutatea produsului vegetal inițial.

Hiosciamozida G a fost obținută din semințe de *Hyosciamus niger* L. conform celei mai apropiate soluții.

#### Exemplu de realizare a invenției

În experiment se utilizează combinația de hibridizare a grâului de toamnă (*Triticum aestivum* – soiul Moldova-5) cu secară (*Secale cereale* – soiul Zimbreni-70).

Se elimină anterele din florile de grâu (castrarea formei materne). Peste 3...4 zile după castrare (pe măsură ce pistilul se maturizează) florile se tratează cu soluție apoasă de floridanozidă H extrasă din semințe de *Physalis floridana* Rydb. în concentrații de 0,001; 0,005 și 0,01% (invenție).

Peste 5...10 min după tratare, perioadă în care are loc absorbția completă a soluției, se aplică spicele de secară cu polen (forma paternă). Se utilizează concentrațiile 0,01...0,001% de soluție apoasă de hiosciamozida G (3-O-[[ $\beta$ -D-glucopiranozil (1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -D-glucopiranozil(1 $\rightarrow$ 4)]-[[ $\beta$ -D-glucopiranozil(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ -D-galactopiranozidă]-(25R)-5 $\alpha$ -furostan-3 $\beta$ , 22 $\alpha$ , 26-triol-[26-O- $\beta$ -D-glucopiranozidă] (cea mai apropiată soluție).

Florile tratate cu apă distilată au servit drept martor. Rezultatele studierii impactului floridanozidei H asupra capacității de legare a semințelor în hibridizare la distanță (Moldova-5 x Zimbreni-70) sunt prezentate în tabel.

35

Tabel

Influența glicozidelor steroidice asupra legării boabelor în hibridizare la distanță dintre grâul comun de toamnă (soiul Moldova-5) cu secară (Zimbreni-70)

Nr. d/o	Variantă	Flori polenizate, buc.	Boabe obținute, buc.	Legarea boabelor față de flori, %	Legarea boabelor față de martor, %
1.	Martor, apă distilată	140	1	0,77	100,0
2.	Floridanozida H-0,01%	120	3	2,5	324,93
3.	Floridanozida H-0,005%	168	21	12,5	1623,37
4.	Floridanozida H-0,001%	192	7	3,6	474,02
5.	Floridanozida G-0,01%	214	5	2,34	303,9
6.	Hiosciamozida G-0,005%	240	4	1,7	220,7
7.	Hiosciamozida G-0,001%	240	5	2,1	270,1

40 Rezultatele din tabel denotă, că glicozida 3-O-[[ $\alpha$ -L-ramnopiranozil(1 $\rightarrow$ 2)]-[[ $\alpha$ -L-ramnopiranozil(1 $\rightarrow$ 4)]- $\beta$ -D-glucopiranozidă]-(25R)-colest-5-en-3 $\beta$ ,19,22 $\beta$ ,26-tetraol-[26-O- $\beta$ -D-glucopiranozidă] – floridanozida H, sporește cantitatea boabelor legate în hibridizările distanțe de 16 ori în comparație cu martorul și de 5,3 ori în comparație cu cea mai apropiată soluție, ce permite de a lărgi spectrul variațiilor genice pentru a obține noi forme productive de plante și soiuri.

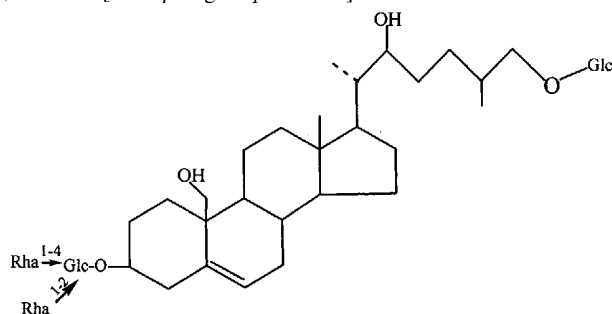
45

## MD 4036 C1 2010.05.31

5

### (57) Revendicări:

3-O-[[ $\alpha$ -L-ramnopiranozil(1 $\rightarrow$ 2)]- $\alpha$ -L-ramnopiranozil(1 $\rightarrow$ 4)]- $\beta$ -D-glucopiranozidă)-(25R)-colest-  
5-en-3 $\beta$ ,19,22 $\beta$ ,26-tetraol-[26-O- $\beta$ -D-glucopiranozidă] cu formula structurală:



10

unde Glc – glucoza, Rha – ramnoza,  
care sporește legarea semințelor la hibridizarea la distanță.

### (56) Referințe bibliografice:

1. MD 3738 G2 2008.11.30

Șef Secție:	COLESNIC Inesa
Examinator:	GORDIENCO Maria
Redactor:	LOZOVANU Maria

## RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: a 2009 0131	(85) Data fazei naționale PCT:	
(22) Data depozit: 2009.10.01	(86) Cerere internațională PCT:	
Prioritatea invocată : (31) nr.:            32) data :            33) țara : (51) : <b>Int. Cl.: A01N 45/00</b> (2006.01) <b>C07J 51/00</b> (2006.01) <b>A01P 21/00</b> (2006.01) <b>A01C 1/00</b> (2006.01) Alți indici de clasificare: <b>Titlul : 3-O-<math>\{</math><math>\alpha</math>-L-ramnopiranozil (1<math>\rightarrow</math>2)]-<math>\{</math><math>\alpha</math>-L-ramnopiranozil (1<math>\rightarrow</math>4)]-<math>\beta</math>-D-glucopiranozidă]-</b> <b>(25R)-colest-5-en-3<math>\beta</math>,19,22<math>\beta</math>,26-tetraol-[26-O-<math>\beta</math>-D-glucopiranozidă], care sporește legarea</b> <b>semințelor la hibridizarea la distanță</b>		
(71) Solicitantul : INSTITUTUL DE GENETICĂ ȘI FIZIOLOGIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD Termeni caracteristici : - glicozidă steroidică, legarea semințelor, hibridizare la distanță -steroid glycoside,seed distant, hybridization setting -стероидный гликозид, завязываемость семян, отдаленная гибридизации		
I. Minimul de documente consultate (sistema clasificării și indici de clasificare Int. Cl.		
(MD, EA, SU, inclusiv și colecția „nepublică”) <b>Int. Cl.: A01N 45/00</b> (2006.01) <b>C07J 51/00</b> (2006.01) <b>A01P 21/00</b> (2006.01) <b>A01C 1/00</b> (2006.01)            (MD, EA, SU, inclusiv și colecția „nepublică”)		
(MD, EA, SU, inclusiv și colecția „nepublică”) MD Perioada: 1993-2009.10.01 EA Perioada: 1996- 2009.10.01 SU Perioada: 1972-1993 ESP@CENET - WORLDWIDE (WO, EP, CH, DE, GB, FR, US, JP...)		
II. Documente considerate ca relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	MD 3738 G2 2009.07.31	1
A	<URL: <a href="http://www.cnaa.acad.md/files/institutions/ig/prof...">http://www.cnaa.acad.md/files/institutions/ig/prof...</a> >	1
A	MD 2226 G2 2003.08.31	1
A	SU 1473317 A1 1988.12.15	1
<input type="checkbox"/> Documentele următoare sunt indicate <b>in continuare a rubricii II</b>		<input type="checkbox"/> Informația referitoare la brevete paralele se <b>anexează</b>
* categoriile speciale ale documentelor consultate:		P - document publicat înainte de data de depozit dar după data priorității invocate
A - document care definește stadiul anterior general		T - document publicat după data de depozit sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune in evidența principiul sau teoria care conține baza invenției
E - document anterior dar publicat la data de depozit național reglementar sau după		X - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând

aceasta data	activitate inventivă
<b>L</b> - document care poate pune în discuție data priorității invocate, poate contribui la determinarea datei publicării altor divulgări sau pentru un motiv expres ( se va indica motivul)	<b>Y</b> - 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
<b>O</b> - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expunere sau orice altă	<b>&amp;</b> - document care face parte din aceeași familie de documente
Data finalizării documentării	2010.03.11
Examinatorul,	GORDIENCO Maria

## RAPORT DE DOCUMENTARE

<b>Informația referitoare la brevete paralele</b>		<b>(21) Nr depozit:</b>	
Date de identificare ale documentelor citate in raport	Data publicării	<b>Brevete paralele</b>	Data publicării
1	2	3	4