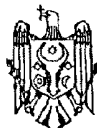




MD 1261 G2

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) **1261** (13) **G2**  
(51) **Int. Cl.<sup>7</sup>**: A 01 G 7/00;  
A 01 H 1/04

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

(21) **Nr. depozit:** 97-0295  
(22) **Data depozit:** 1997.11.14

(43) **Data publicării hotărârii de  
acordare a brevetului pe  
răspunderea solicitantului:**  
1999.07.31, BOPI nr. 7/99

(71) **Solicitant:** Institutul de Genetică al Academiei de Științe a Republicii Moldova, MD  
(72) **Inventatori:** Lupascu Galina, MD; Barbacari Nicolae, MD; Cemertan Igor, MD; Ceban Doina, 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 și anume la  
genetica și ameliorarea plantelor și poate fi utilizată  
pentru estimarea rezistenței plantelor de triticale la  
fuzarioză.

5  
Esența invenției constă în aprecierea rezistenței  
genotipurilor de triticale la fuzarioză prin metoda  
electroforetică după nivelul de sinteză a proteinelor  
solubile în apă în radicelele de triticale la tratarea  
semințelor cu filtratul de cultură al ciupercii  
*Fusarium graminearum* Schwabe. Plantele de

2  
triticale în radicelele cărora s-au depistat proteine  
solubile în apă cu  $R_f = 0,19 \dots 0,53$  sunt apreciate  
drept rezistente la fuzarioză.

Rezultatul invenției constă în sporirea exactității  
și veridicității metodei de apreciere a rezistenței  
genotipurilor de triticale la fuzarioză.

Revendicări: 1

## MD 1261 G2

3

### Descriere:

Invenția se referă la agricultură și anume la genetica și ameliorarea plantelor și poate fi utilizată pentru estimarea rezistenței plantelor de triticeale la fuzarioză.

5 Sunt cunoscute metode de apreciere a rezistenței culturilor cerealiere, inclusiv triticeale, la fuzarioză prin testarea lor timp de mai mulți ani pe fond de infecție în condiții de câmp [1]. Aceste metode, deși asigură rezultate obiective, au o serie de dezavantaje, cele mai esențiale fiind determinate de diferite operațiuni laborioase: prepararea inoculului pe boabe de grâu, semănarea și cultivarea timp de 3...4 ani în câmp. În afară de aceasta, rezultatele testării depind în mare măsură de condițiile climaterice ale anului: pe timp foarte rece sau secetos brunificarea sau necrozarea bazei tulpinii este mai pronunțată decât în condițiile favorabile de dezvoltare a plantelor.

10 Este cunoscută metoda de apreciere a rezistenței plantelor la boli fungice care constă în elucidarea nivelului de sinteză a peroxidazelor în prezența ciupercilor *Fusarium*. Această metodă constă în analiza electroforetică a peroxidazei care se execută în sistem de poliacrilamidă sub formă de placă cu grosimea de 1 mm și lungimea de 8 cm. Ea se efectuează în condiții nedenateurate în gelul omogen de 8% în sistemul Ornstein, Devis. Preparatele se obțin prin mărunțirea materialului vegetal în piuliță cu tampon de 0,005 M tris - OH - tris - HCl, pH - 7,2, ce conține 0,01 M MgCl<sub>2</sub> și 0,25 M zaharoză în proporție de 1:8. Pentru identificarea benzilor de peroxidază gelul se colorează timp de 20 min în soluție de benzidină în tampon acetic, apoi în H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 0,3% timp de 10-15 min și după apariția benzilor se spală în alcool. Gelul se păstrează în soluție slabă de alcool [2].

20 Dezavantajul testului peroxidazic constă în faptul că nivelul de sinteză a acestor fermenți este labil la condițiile de mediu, genotip, etapă a ontogenezei, țesut ș. a. De aceea, rezultatele privitor la sinteza peroxidazelor în condițiile infectării culturilor cerealiere cu ciupercii *Fusarium* sunt foarte contradictorii.

25 Problema invenției constă în sporirea exactității și veridicității metodei de apreciere a rezistenței genotipurilor de triticeale la fuzarioză.

Esența invenției constă în aprecierea rezistenței genotipurilor de triticeale la fuzarioză prin metoda electroforetică după nivelul de sinteză a proteinelor solubile în apă în radicelele de triticeale după tratarea semințelor cu filtratul de cultură al ciupercii *Fusarium graminearum* Schwabe. Plantele de triticeale în radicelele cărora s-a depistat un nivel înalt de sinteză a proteinelor solubile în apă cu Rf=0,19...0,53 sunt apreciate drept rezistente la fuzarioză.

30 Rezultatul invenției constă în sporirea exactității și veridicității metodei de apreciere a rezistenței genotipurilor de triticeale la fuzarioză.

Metoda se efectuează în modul următor. În experiență se utilizează soiuri (genotipuri) de triticeale rezistente (CAD 2/917, AD 1365) și sensibile (PRAG 3, AD 206) la fuzarioză. Pentru infectare în condiții de câmp se folosește inoculul, constituind un amestec de izolate ale ciupercilor speciilor *Fusarium*, cultivat pe grâu sterilizat, iar pentru infectare în condiții de laborator - filtratul de cultură al izolatului N16 *Fusarium graminearum* Schwabe. În câmp într-un rând de 1,5 m se seamănă câte 50 boabe peste care se presoară câte 100 g inocul. Aprecierea gradului de atacare se face în funcție de aria suprafeței brunificate sau necrozate de la baza tulpinii la etapa de coacere a plantelor.

40 În cadrul testării în condiții de laborator boabele se tratează timp de 20 ore cu filtrat de cultură (FC) *Fusarium graminearum*, după care ele se cultivă în cutii Petri pe hârtie de filtru umețată cu același lichid. Analiza electroforetică a peroxidazei extrase din radicele a fost determinată în gel de poliacrilamidă [2]. Analiza electroforetică a proteinelor solubile în apă (PSA) extrase din radicele s-a determinat în gel de SDS-poliacrilamidă [3]. S-au identificat spectrul și intensitatea benzilor pentru fiecare variantă.

45 Exemplu. Boabele de triticeale (soiurile CAD 2/917 și PRAG 3) se seamănă în câmp la sfârșitul decadei trei a lunii septembrie câte 50 în rânduri de 1,5 m, distanța între ele fiind de 40 cm, în 3 repetări. Peste boabe se presoară 100 g inocul. În perioada de coacere a plantelor - faza de lapteceară a boabelor (luna iunie), se estimează gradul de atacare a plantelor conform sistemului de 5 puncte (0 - foarte rezistent; 0,1 - rezistent; 1 - rezistent mediu; 2 - sensibil; 3 - foarte sensibil) [4]. Estimarea se face la 20...30 plante în fiecare repetare. Rezultatele sunt expuse în tabel.

55

## MD 1261 G2

4

5

Tabel

Gradul de atacare ( $\bar{x}$ ) a plantelor de triticales pe fond de infecție

| Soi       | Anul | $\bar{x} \pm S_x$ | V, % |
|-----------|------|-------------------|------|
| CAD 2/917 | 1995 | 1,11±0,15         | 76,3 |
|           | 1996 | 0,93±0,11         | 72,1 |
|           | 1997 | 0,93±0,06         | 38,9 |
| PRAG 3    | 1995 | 1,59±0,12*        | 55,5 |
|           | 1996 | 2,31±0,12*        | 32,5 |
|           | 1997 | 2,44±0,05*        | 13,1 |

$\bar{x}$  - valoarea medie a gradului de atacare;  $s_x$  - eroarea valorii medii; V, % coeficient de variație;

\* - deosebire distinctă la nivelul de  $P < 0,05$ .

După cum rezultă din datele prezentate, deși nivelul de atacare a genotipurilor studiate a variat pe ani, soiul PRAG 3 a fost mult mai sensibil decât soiul CAD 2/917.

Analiza electroforetică a peroxidazei a fost efectuată în sistem de poliacrilamidă sub formă de plăci cu grosimea de 1 mm și lungimea de 8 cm. Cercetările s-au efectuat în condiții nedaturate în gelul omogen de 8% în sistemul Ornstein, Devis. Preparatele au fost obținute prin mărunțirea materialului vegetal (radicele) în piuliță cu tampon 0,005 M tris - OH - tris - HCl, pH=7,2, ce conținea 0,01 M  $MgCl_2$  și 0,25 M zaharoză în proporție de 1:8.

Pentru identificarea benzilor de peroxidază a fost pregătită următoarea soluție. La 50 ml apă distilată s-a adăugat 1,15 ml  $CH_3COOH$  glacial și 92 mg de benzidină. Soluția se agită, se acoperă cu capac și se menține pe baia de apă la  $t=60...80^\circ C$  timp de 20 min. După dizolvarea benzidinei se adaugă 2,72 g  $CH_3COONa$ , se răcește la temperatura camerei și se adaugă apă distilată până la obținerea volumului de 100 ml. Gelul se colorează în această soluție timp de 20 min, apoi în  $H_2O_2$  de 0,3% timp de 10-15 min. Pentru pătrunderea probelor în gel, inițial s-a aplicat curent electric de 200 V, iar peste 30 min, în scopul separării benzilor, curentul a fost mărit până la 400 V. După apariția benzilor, gelul a fost spălat și păstrat în soluție slabă de alcool.

Pentru analiza PSA materialul vegetal s-a pregătit în modul următor. Boabele de triticales au fost tratate timp de 20 ore cu FC al izolatului N16 *Fusarium graminearum* Schwabe și  $H_2O$ , după care s-au plasat în cutii Petri pe hârtie de filtru umețată cu aceste soluții. S-au menținut timp de 24 ore la  $t=24^\circ C$  pentru inițierea creșterii, apoi o jumătate din vase a fost transferată în frigider la  $t=6^\circ C$ , iar cealaltă jumătate a fost lăsată pentru 48 de ore la  $t=24^\circ C$  la întuneric. După expirarea timpului s-au prelevat 124 mg radicele, din fiecare variantă, s-au fixat în azot lichid la  $t=-20^\circ C$ .

Extragerea proteinelor. Materialul congelat (0,5 g) a fost mărunțit într-un mojar 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% SDS; 2,5% 2-mercaptoetanol; 10% glicerol; 0,0012% bromfenol albastru.

Prepararea probelor pentru electroforeză. 50  $\mu l$  extract de proteine se amestecă cu un volum egal de soluție-tampon pentru extragere. Probele se incubează 5 min la  $t=95^\circ C$ , 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%

## MD 1261 G2

5

Coomassie albastru (R250) timp de 2 ore. Decolorarea gelului se efectuează în soluție de 7% acid acetic glacial. Fotografierea gelului s-a efectuat pe filmul fotografic Mikrat-300.

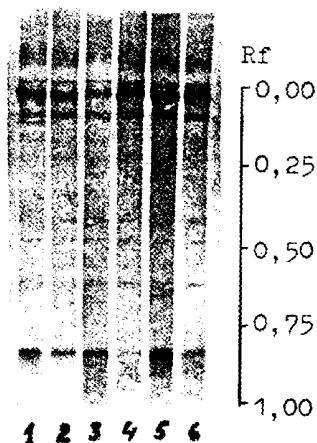
Analiza electroforetică a peroxidazei extrase din radicele de triticale tratate cu filtrat de cultură al ciupercii *Fusarium graminearum* Schwabe a demonstrat că nivelul de sinteză al acestor fermenți este diferit față de varianta de control. De exemplu, la soiul sensibil ADM 6, soiul rezistent AD 3/5 și hibridul ADM 6 x AD 3/5, rezistent la fuzarioză sinteza izoformelor cu  $R_f=0,85 \dots 1,00$  a scăzut indiferent de nivelul de rezistență a genotipurilor în toate variantele cu prezența filtratului de cultură. Într-un alt caz sub influența filtratului de cultură al ciupercii menționate s-a produs apariția unei izoforme noi cu  $R_f=0,31$  la genotipul sensibil AD 206 și intensificarea puternică a benzii cu  $R_f=0,18$  la hibridul rezistent AD 206 x AD 1365.

Din cele menționate reiese că filtratul de cultură produce inhibarea/stimularea peroxidazelor sau apariția unor noi izoforme, indiferent de nivelul de rezistență a genotipurilor și nu poate deci servi ca test de estimare a rezistenței.

Analiza electroforetică a proteinelor solubile în apă în radicele de triticale în funcție de genotip și condiții a demonstrat că acțiunea factorilor stresogeni (filtratul de cultură,  $t=6^\circ\text{C}$ ), cât și acțiunea comună a acestora (filtratul de cultură,  $t=6^\circ\text{C}$ ), 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 soiul CAD 2/917 și a proteinelor cu masă moleculară mare-medie ( $R_f=0,31 \dots 0,53$ ) la soiul PRAG 3. Temperatura de  $6^\circ\text{C}$  a produs o inhibare pronunțată a sintezei tuturor proteinelor solubile în apă la soiul CAD 2/917. La soiul PRAG 3 sub acțiunea separată a filtratului de cultură, temperaturii de  $6^\circ\text{C}$ , cât și sub acțiunea comună a filtratului de cultură și a temperaturii  $6^\circ\text{C}$  s-au intensificat ușor benzile cu  $R_f=0,31 \dots 0,53$ . La soiul rezistent CAD 2/917, spre deosebire de soiul sensibil PRAG 3, acțiunea comună a filtratului de cultură și a temperaturii de  $6^\circ\text{C}$ , care mărește efectul primului a produs sinteza unei proteine noi cu  $R_f=0,19$  și a sporit substanțial sinteza proteinelor cu  $R_f=0,31 \dots 0,53$ , adică a celor cu masă moleculară mare și medie.

Rezultate similare s-au obținut și în cazul altor genotipuri de triticale - AD 206 (sensibil) și AD 1365 (rezistent). Sub influența FC a scăzut sinteza tuturor proteinelor la soiul sensibil, iar la cel rezistent, împreună cu scăderea intensității majorității benzilor s-a păstrat nivelul de sinteză a celor cu  $R_f=0,81 \dots 0,88$  și a fost identificată o creștere puternică a cantității de proteină ce corespunde benzii cu  $R_f=0,46$ .

Datele obținute permit de a concluziona că apariția sau intensificarea puternică a benzilor electroforetice sub acțiunea FC *Fusarium graminearum* Schwabe în limitele  $R_f=0,19 \dots 0,53$ , ce caracterizează proteinele cu greutate 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.



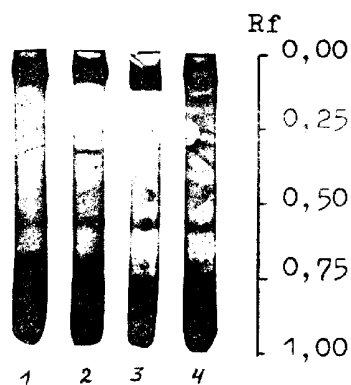
## MD 1261 G2

6

Fig. 1 - Influența filtratului de cultură (FC) al ciupercii *Fusarium graminearum* Schwabe asupra sintezei peroxidazelor în radicele de tritiale  
1, 2 - ADM 6 (martor, FC); 3,4 - AD 3/5 (martor, FC);  
5, 6 - ADM 6 x AD 3/5 (martor, FC).

5

10



15

Fig. 2 - Sinteza peroxidazelor în radicele de tritiale sub acțiunea FC al ciupercii *F. graminearum* Schwabe  
1, 2 - AD 206 (martor, FC); 3,4 - AD 206 x AD 1365 (martor, FC).

20

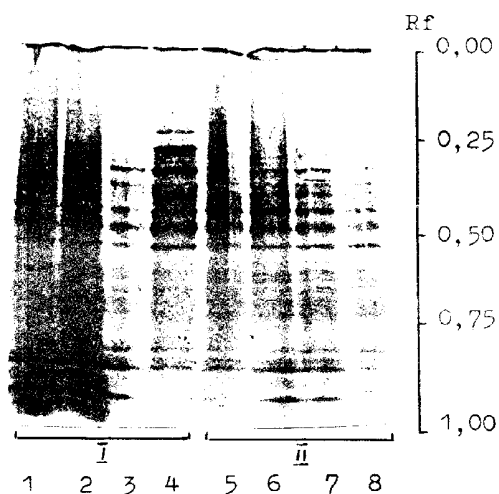


Fig. 3 - Electroforegrama proteinelor solubile în apă sintetizate în radicelele de tritiale în condiții optime și stresogene

25

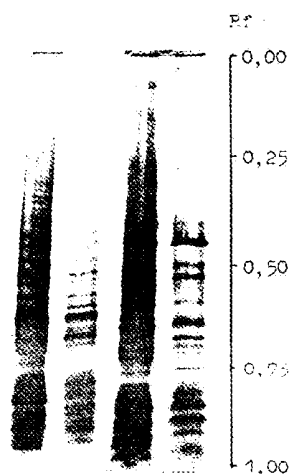
## MD 1261 G2

7

1 - CAD 2/917; II - PRAG 3; 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 +  $t=6^{\circ}\text{C}$ .

5

10



15

Fig. 4 - Influența filtratului de cultură al ciupercii *F. graminearum* Schwabe asupra spectrului electroforetic al proteinelor solubile în apă la genotipuri de triticale cu rezistență diferită la fuzarioză

1, 2 - AD 206 (martor, FC); 3, 4 - AD 1365 (martor, FC).

20

### (57) Revendicare:

Metodă de apreciere a rezistenței genotipurilor de triticale la fuzarioză care include analiza electroforetică a substanțelor proteice în radicele de triticale după tratarea semințelor cu filtrat de cultură al ciupercii *Fusarium graminearum* Schwabe, **caracterizată prin aceea** că se determină nivelul de sinteză a proteinelor solubile în apă în radicele de triticale și se apreciază ca rezistente plantele la care s-au depistat proteine solubile în apă cu coeficientul de repartiție al proteinelor în gel  $R_f=0,19\ldots 0,53$ .

30

### (56) Referințe bibliografice:

1. Bleich, A., Schiitzler, E., Schiitzler, G. Zum Auftreten von Krankheiten bei Triticale. Pflanzenschutz . DDR, 1989, v.43, N10, p.204
2. Сафонов, В.И., Сафонова, М.П. Исследование белков и ферментов растений методом электрофореза в полиакриламидном геле. Биохимические методы в физиологии растений, 1971, с.113-116.
3. Promega protocols and application guide (second edition), Promega corporation, 1991, 246 p.
4. Lupașcu, Galina. Identificarea genotipurilor de grâu, secară și triticale rezistente la fuzarioză, Chișinău, 1995, 96 p.

## **MD C2**

8

**Şef secţie:** CRASNOVA Nadejda

**Examinator:** BAZARENCO Tatiana

**Redactor:** ANDRIUŢĂ Victoria

## RAPORT DE DOCUMENTARE

|                                                                                                 |                                 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| (21) Nr. depozit: 97-0295                                                                       | (85) Data fazei naționale PCT:  |
| (22) Data depozit: 14.11.1997                                                                   | (86) Cerere internațională PCT: |
| (30) Priorități recunoscute :                                                                   |                                 |
| (31) nr.:            32) data :            33) țara: :                                          |                                 |
| (54) <b>Titlul</b> : Metodă de apreciere a rezistenței genotipurilor de triticales la fuzarioză |                                 |
| Termeni caracteristici în limba română:                                                         |                                 |
| II. D O C U M E N T A R E<br>ÎN LITERATURA DE BREVETE DE INVENȚII                               |                                 |
| Indicii clasificărilor de brevete :                                                             |                                 |
| (51) Int. Cl. :                                                                                 |                                 |
| MD Perioada                                                                                     | Brevete:                        |
|                                                                                                 | Cereri publicate:               |
|                                                                                                 | Cereri nepublicate:             |
|                                                                                                 | Certificate MU:                 |
| BEA Perioada:                                                                                   | Brevete:                        |
|                                                                                                 | Cereri:                         |
|                                                                                                 | Rapoarte de documentare         |
| Data                                                                                            | Examinator , Rojnevschi Maria   |