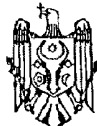


REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) 1166 (13) F1
(51) Int. Cl.⁶: A 01 N 65/00; A 01 C 1/00

(12) BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. depozit: 98-0123 (22) Data depozit: 26.05.98 (31) Nr.: (32) Data: (33) Țara: (30)* Nr. (10)* Brevet nr.	(42) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului:
(71) Solicitant: Universitatea de Stat din Moldova, MD (72) Inventatori: Popa Nicolae, MD; Rudic Valeriu, MD; Movileanu Valeriu, MD; Ganenco Luminița, MD (73) Titular: Universitatea de Stat din Moldova, MD	

(54)
(57) Rezumat:

1
(57) Invenția se referă la genetică, în special la mutageneza experimentală și poate fi utilizată în agricultură.

Esența invenției constă în faptul că metoda include tratarea semințelor înainte de semănat cu mutagen, apoi cu agent antimutagen. Noutatea constă în aceea că în calitate de mutagen se utilizează erbicidul din clasa diazinelor 3-izopropil-1H-2,1,3-benzotiadinul-4(3H)-on-2,2-dioxid, în calitate de agent antimutagen se utilizează extract apos de biomasă de

2
alga *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl CALU-835 cu concentrația de 0,5...5,0 mg/ml, cu care se tratează semințele timp de 6...18 ore, iar efectul antimutagen se depistează peste 1,5...2 luni după tratarea cu mutagen.

5
Rezultatul tehnic constă în sporirea informativității metodei prin efectuarea analizei în stadiul de meioză.

10
Revendicări: 1

MD C2

MD C2

3

Descriere: 98-0123

Metodă de depistare a efectului antimutagen

5 Prezenta invenție se referă la genetică, în special la mutageneza experimentală și poate fi utilizată în agricultură.

Este cunoscută metoda de depistare a efectului antimutagen al extractului din fructe de Bârcoace (*Cotoneaster melanocarpus L.*), care constă în tratarea boabelor de grâu cu acest extract, germinarea lor și studierea nivelului de mutații cromozomiale în celulele meristemice din conul de creștere a radiculelor [1].

Dezavantajul acestei metode constă în iraționalitatea economică a obținerii preparatelor cu efect antimutagen din fructele de Bârcoace, totodată, studiind procesul de inducție a aberațiilor cromozomiale de către pesticidul Granozan și reducerea lor de către extractul de Bârcoace, autorii nu au analizat concomitent și alți indici care corelează într-un mod sau altul cu nivelul de mutație.

Mai apropiată de invenția propusă după esența tehnică și rezultatul obținut este metoda, care include aplicarea extractului din microalga *Spirulina platensis* asupra semințelor de bob după tratarea lor cu erbicidul Lasso și studierea nivelului de mutații cromozomiale în celulele meristemului radicular al semințelor germinate [2].

Dezavantajul acestei metode constă în faptul că efectul citogenetic (mutagen sau antimutagen) se determină nemijlocit în mitoza semințelor germinate după tratarea acestora cu preparatele respective. Acțiunea prolongată a lor pe parcursul creșterii și dezvoltării individuale a plantelor rămâne necunoscută. Acțiunea prolongată a pesticidelor are o mare importanță pentru generațiile viitoare, și anume, în inducerea mutațiilor nocive la descendenți.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în utilizarea unei metode, care ar asigura concomitent atât combaterea efectului primar al pesticidelor imediat după aplicarea lor asupra semințelor înainte de semănat, cât și depistarea acțiunii agenților mutageni și antimutageni pe parcursul dezvoltării individuale a plantelor, îndeosebi în perioada de butonizare și înflorire a lor, când se produc cele mai însemnate procese

MD C2

4

(gametogeneza și fecundarea) prin care se transmit consecințele pozitive sau negative ale acestora următoarei generații.

5 Esența invenției constă în faptul că metoda include tratarea semințelor înainte de semănat cu mutagen, apoi cu agent antimutagen. Noutatea constă în aceea că în calitate de mutagen se utilizează erbicidul din clasa diazinelor 3-izopropil-1H-2,1,3-benzotiadiazin-4(3H)-on-2,2-dioxid, în calitate de agent antimutagen se utilizează extract apos de biomasă de alga *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl CALU-835 cu concentrația de 10 0,5...5,0 mg/ml, cu care se tratează semințele timp de 6...18 ore, iar efectul antimutagen se depistează peste 1,5...2 luni după tratarea cu mutagen.

Rezultatul tehnic constă în sporirea informativității metodei prin efectuarea analizei în stadiul de meioză.

15 În plus, metoda propusă asigură analizarea paralel cu celulele meristemice (mitotice), în care se determină efectul nemijlocit (inițial) al factorilor mutageni și antimutageni după aplicarea lor, și a celulelor meiotice (microsporocitele), care se formează mult mai tarziu (peste 1,5-2 luni) pe parcursul ontogenezei plantelor, deci 20 dă posibilitate de a depista efectul prolongat (rezultatul final) al acestor factori. Paralel cu aceasta, extractul de *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl CALU-835 sporește activitatea mitotică a celulelor de 1,26 ori și reduce efectul mutagen al erbicidului Bazagran în meioză de 2,1 ori, micșorând astfel acțiunea genotoxică a 25 erbicidelor în perioada dezvoltării individuale a plantelor.

Rezultatul tehnic obținut se datorește faptului că în metoda propusă are loc tratarea semințelor de bob cu soluție de erbicid Bazagran, apoi cu extractul apos de biomasă *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl CALU-835, care conține un complex de substanțe 30 biologic active (fitohormoni, proteine, glucide, vitamine, prostoglaudine, etc.), ce activează procesele fiziologo-biochimice în celule, stimulează potențialul lor mitotic și concomitent inițiază (activează) mecanismele molecular-genetice de reparație a mutațiilor de erbicide. Ca urmare, se declină în mod esențial 35 efectul lor primar și se înlătură consecințele negative asupra eredității următoarei generații, ceea ce este foarte important pentru protecția fondului genetic al plantelor agricole.

Exemplu de realizare a invenției

MD C2

5

Semințele de bob (*Vicia faba L., var. minor*) în număr de 40-50 se scufundă într-un pahar de 150 ml, în care se toarnă 50 ml extract apos de *Spirulina platensis* cu concentrația de 2,5 mg/ml și se lasă timp de 6 ore în condiții de laborator. Paralel se
5 efectuează și varianta cu agent mutagen, utilizând în acest scop erbicidul Bazagran în concentrație de 2,5 mg/ml. În varianta combinată Bazagran-*Spirulina platensis*, semințele după tratarea cu Bazagran (6 ore) se usucă la aer pe hârtie de filtru timp de 6 ore, apoi se tratează cu *Spirulina platensis* timp de 6 ore. În toate
10 variantele după tratare semințele se spală timp de 5 min cu apă distilată și se seamănă în sol la adâncimea de 6-8 cm, la o distanță de 20 cm pe rând, iar între rânduri de 40 cm. Când plantele crescute din aceste semințe ating în dezvoltarea lor faza de butonizare, în calitate de material experimental se folosesc
15 butonii floriferi de diferite dimensiuni în care se pot observa microsporocite la stadiul I sau II al diviziunii meiotice. Butonii recoltați se fixează în soluție Carnua timp de 24-28 ore, apoi fixatorul se înlătură și materialul poate fi păstrat în frigider într-o soluție de alcool cu tăria de 70%, în vase de sticlă ermetic
20 închise. Pentru pregătirea preparatelor din butoni se scot staminele, se separă anterele lor și se pun pe o lamă de microscopie într-o picătură de colorant - soluție carmin - sau orcein-acetică de 1%. Cu ajutorul unor ace de disecție se secționează fiecare anteră și se apasă cu un ac spatulat în așa fel
25 încât să se elibereze celulele-mame ale grăuncioarelor de polen. Sacii polenici goliți de polen se înlătură. Peste material se așază o lamelă de microscopie. Preparatul se trece peste flacăra unui bec de gaz pentru intensificarea hidrolizei și colorării microsporocitelor. Se pregătesc preparatele utilizând procedeul
30 rapid prin presare (squash), în care se analizează anafazele și telofazele primei (A-T I) și celei de-a doua diviziuni ale meiozei (A-T II).

Erbicidul Bazagran în concentrația dată micșorează activitatea mitotică (AM) a celulelor meristematice de 1,34 ori față de acest
35 indice observat în varianta cu *Spirulina platensis* (13,4 și 18,0% respectiv), iar *Spirulina platensis* la rândul său stimulează AM în varianta combinată de 1,26 ori față de Bazagran (16,8 și 13,4%).

MD C2

6

Aceste date sunt similare cu cele prezentate la cel mai apropiat analog la indicele respectiv. In ceea ce privește rezultatele ce caracterizează nivelul de mutații cromozomiale (NM) indus de către *Spirulina platensis*, Lasso și Bazagran în mitoză și meioză, ele sunt mult mai distincte, deși legitatea corelativă între ele se menține. Astfel NM induse de *Spirulina platensis* în meioză este numai de 1,9% față de 11,4% în mitoză. Erbicidul Bazagran a indus mutații cromozomiale în 16,4% de ana-telofaze (A-T) ale meiozei, ceea ce este de circa 2 ori mai puțin în comparație cu NM induse de Lasso în A-T mitozei. Totodată extractul de *Spirulina platensis* a redus efectul citogenetic al Bazagranului de 2,1 ori (7,9 și 16,4% respectiv), ceea ce corelează pozitiv cu datele obținute la analogul cel mai apropiat în mitoză, însă la un nivel mai scăzut. Deci, substanțele biologice active (SBA) din extractul de *Spirulina platensis* reduc semnificativ nivelul de mutații indus atât de erbicidul Lasso în mitoză, cât și de Bazagran în meioză. De aici rezultă că SBA din extractul de *Spirulina platensis* inițiază și activează procesele de reparație a mutațiilor cromozomiale induse de Lasso și Bazagran, totodată stimulează și potențialul mitotic al celulelor inhibitate de către aceste preparate. Putem concluziona că extractele apoase din *Spirulina platensis* pot servi în calitate de agenți antimutageni ce reduc semnificativ efectul genotoxic al pesticidelor.

Așadar, procedeul propus asigură posibilitatea de a depista atât efectul mutagen mult mai intarziat (prolongat) al pesticidelor, cât și efectul antimutagen al SBA extrase din *Spirulina platensis*, reducând astfel consecințele negative condiționate de utilizarea pesticidelor în agricultură și, concomitent, asigurând protecția fondului genetic al plantelor de cultură.

(57) (57) **Revendicare (ări):** Metodă de depistare a efectului antimutagen care include tratarea semințelor înainte de semănat cu mutagen, apoi cu agent antimutagen pe bază de biomasă de alga *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl CALU-835 caracterizată prin aceea că în calitate de mutagen se utilizează erbicidul din clasa diazinelor 3-izopropil-1H-2,1,3-benzotiadiazinul-4(3H)-on-2,2-dioxid, în calitate de agent antimutagen se utilizează extract apos de biomasă de alga *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl CALU-835 cu concentrația de 0,5...5,0 mg/ml, cu care se tratează semințele timp de 6...18 ore, iar efectul antimutagen se depistează peste 1,5...2 luni după tratarea cu mutagen.

MD C2

7

(56) Referințe bibliografice:

Șef secție: CRECETOV Veaceslav

Examinator:

Redactor:

(70) Către Universitatea de Stat din Moldova

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: 98-0123	(85) Data fazei naționale PCT: . . (86) Data cererii PCT:
(22) Data depozit: 26.05.1998	
(30) Priorități recunoscute :	
(31) nr. : (10)*	(32) data: (33) țara:
(54) titlul: Metodă de depistare a efectului antimutagen Termeni caracteristici :	
I. D O C U M E N T A R E IN LITERATURA TEHNICO - ȘTIINȚIFICE	
Lucrări consultate (autori, titluri, editura, țara și data publicării)	
II. D O C U M E N T A R E ÎN LITERATURA DE BREVETE DE INVENȚII	
Indicii clasificărilor de brevete :	
(51) Int. Cl. : A 01 N 65/00; A 01 C 1/00	
M D Perioada :	Brevete : Cereri publicate : Cereri nepublicate: Brevete/Cereri:
R U Perioada :	Brevete:
F R Perioada :	Brevete:
GB Perioada :	Brevete:
D E Perioada :	Brevete: Cereri A.P. Cereri acceptate
U S Perioada :	Brevete:
S U Perioada :	Brevete/Cereri/:
P C T Perioada :	Brevete:
E P Perioada :	Brevete: Cereri:
Alte colecții :	
Data	Examinator