



MD 2012 G2 2002.09.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) 2012 (13) G2
(51) Int. Cl.⁷: G 01 N 33/48;
A 01 G 7/00

(12) BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. depozit: a 2001 0033
(22) Data depozit: 2001.02.06

(45) Data publicării hotărârii de
acordare a brevetului:
2002.09.30, BOPI nr. 09/2002

(71) Solicitant: INSTITUTUL DE GENETICĂ AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA,
MD

(72) Inventatori: LUPAȘCU Galina, MD; SOCHIRCĂ Angela, MD

(73) Titular: INSTITUTUL DE GENETICĂ AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA,
MD

(54) Metodă de apreciere a rezistenței soiurilor de mazăre la fuzarioza
radiculară

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la agricultură, și anume la cito-
genetica plantelor și poate fi utilizată la aprecierea
rezistenței soiurilor de mazăre la fuzarioza radi-
culară.

Esența invenției constă în faptul că aprecierea
rezistenței soiurilor de mazăre la fuzarioza radi-
culară se efectuează prin testarea după modificarea
frecvenței aberațiilor cromozomice în celulele
meiotice ale mugurilor floralii de mazăre. Se
consideră rezistente la fuzarioza radiculară soiurile

2
5 de mazăre la care procentul frecvenței aberațiilor
cromozomice în celulele infectate este de 2,0...2,3
ori mai mare decât în cele neinfectate.

Rezultatul invenției constă în sporirea veridi-
cității aprecierii rezistenței soiurilor de mazăre la
fuzarioza radiculară.

10 Revendicări: 1

Descriere:

Invenția se referă la agricultură, și anume la citogenetica plantelor, și poate fi utilizată la aprecierea rezistenței soiurilor de mazăre la fuzarioza radiculară.

Sunt cunoscute metode de apreciere a rezistenței culturilor agricole, inclusiv a mazării, la fuzarioza radiculară prin testarea acestora timp de mai mulți ani pe fond de infecție în condiții de câmp [1]. Aceste metode asigură rezultate obiective, dar au un șir de dezavantaje, dintre care cele mai principale sunt determinate de diferite operațiuni laborioase: prepararea inoculului de *Fusarium* pe boabe de grâu sau ovăz prin autoclavizare și condiții aseptice speciale, semănarea și testarea plantelor timp de 2...4 ani în condiții de câmp. În afară de aceasta, dezvoltarea fuzariozei depinde în mare măsură de condițiile climatice ale anului (pe timp foarte rece sau arșiță boala se dezvoltă mai repede), fapt ce se reflectă asupra exteriorizării semnelor de boală.

Este cunoscută metoda de apreciere a rezistenței plantelor la fitotoxină, prin testarea reacției rădăcinilor și celulelor acestora la filtrate de cultură (FC) [2], care constă în aprecierea activității mitotice în celulele meristematice la acțiunea FC. Pentru aceasta conul de creștere al rădăcinilor se fixează în amestec Carnua (3 părți de alcool etilic de 96°C la 1 parte de acid acetic glacial) și se colorează cu acetocarmin (soluția de 2% de carmin se dizolvă prin fierbere în acid acetic de 45%). Activitatea mitotică în celulele meristematice se cercetează pe frotiuri presate. În 10 câmpuri de vedere ale microscopului se determină numărul de celule în divizare din totalul de 100 celule, iar indicele mitotic se stabilește după formula: (numărul de celule în divizare/1000) x 100%.

Dezavantajul acestei metode constă în faptul că prezența fitotoxinelor (care reprimă activitatea mitotică) și a substanțelor biologic active (care stimulează activitatea mitotică) în cele mai diferite proporții în FC nu asigură rezultate stabile și univoce.

Problema invenției constă în sporirea rapidității, eficienței și veridicității aprecierii rezistenței soiurilor de mazăre la fuzarioza radiculară.

Esența invenției constă în aceea că în calitate de parametru test al rezistenței mazării la fuzarioza radiculară se utilizează frecvența aberațiilor cromozomice, în special a cromozomilor dispersați, cromozomilor retardați și punților cromatidice, în celulele meiotice, la acțiunea ciupercii *F. oxysporum* (Schlecht.) Syd. et Hans.

Rezultatul invenției constă în reducerea volumului de lucru și termenului de apreciere a gradului de rezistență a soiurilor de mazăre la fuzarioza radiculară.

Metodă de realizare

Se utilizează plante de mazăre cultivate pe fond de infecție *F. oxysporum* (Schlecht.) Syd. et Hans în condiții de câmp.

Aprecierea gradului de atac de fuzarioza radiculară se face în baza suprafeței necrozate de pe rădăcina principală.

În cadrul testărilor citogenetice au fost stabilite activitatea mitotică și frecvența aberațiilor cromozomice în celulele mitotice (în rădăcinițe) și meiotice (în mugurii floral) de mazăre după metoda descrisă în lucrarea "Паушева З.П. Практикум по цитологии растений". М.: Агропромиздат, 1988, с. 142-143, 202-203.

Exemplu

Pentru testarea gradului de rezistență la ciuperca *F. oxysporum* în condiții de câmp s-au utilizat soiurile de mazăre Smaragd, Neosâpaușcișea, Triton și Iujno-Ucrainschi. Prepararea inoculului s-a efectuat prin multiplicarea ciupercii pe semințe de grâu sterilizate în baloane (proporția: 1 parte de semințe la 0,8 părți de apă distilată) prin autoclavizare la 1,5 atm, de 2 ori câte 1 oră. În timpul semănăturii s-a presărat câte 100 g de inocul asupra 100 de boabe, lungimea rândului fiind de 1 m. Experimentul a fost efectuat în 3 repetiții randomizate, în fiecare din ele fiind câte 100 de boabe. Gradul de dezvoltare a fuzariozei radiculare s-a stabilit la a 21-a zi de la răsărirea plantelor în baza scării de 6 trepte: 0 - plantă imună, 1 - foarte rezistentă, 2 - rezistentă, 3 - sensibilă mediu, 4 - sensibilă și 5 - foarte sensibilă.

S-a constatat că soiurile Neosâpaușcișea și Triton au manifestat sensibilitate medie la fuzarioza radiculară: 2,50 grade; soiul Smaragd - sensibilitate sporită: 3,80 grade; iar Iujno-Ucrainschi - rezistentă: 1,83 grade.

Cea mai apropiată soluție de invenția propusă apreciază gradul de rezistență prin testarea lăbilității unor parametri citogenetici în celulele meristematice în prezența fitotoxinelor. În acest scop, s-au stabilit activitatea mitotică și indicele fazic în rădăcinițele soiului de mazăre cu sensibilitate medie Verde 1, la acțiunea FC de *F. oxysporum*. După cum reiese din tab. 1, FC nu a reprimat activitatea mitotică, precum era de așteptat, ci, dimpotrivă, a stimulat-o cu circa 11% (probabil datorită unei cantități considerabile de substanțe biologic active din FC), deși majoritatea celulelor în

MD 2012 G2 2002.09.30

4

5 acest caz nu erau la cele mai active etape mitotice - metafază (M), anafază (A) sau telofază (T), ci abia la începutul mitozei - în profază (P). Totodată, s-a constatat că nivelul mutațional în varianta martor și cea cu FC a fost la același nivel (tab. 2). Cu alte cuvinte, aprecierea rezistenței soiurilor de mazăre la fuzarioza radiculară prin determinarea activității mitotice și nivelului mutațional în celulele meristematice ale rădăcinilor nu asigură rezultate sigure și univoce.

Tabelul 1
Activitatea mitotică și indicele fazic în rădăcinile soiului de mazăre Verde 1 la acțiunea FC de *F. oxysporum*

Varianta	Numărul total de celule studiate	Numărul de celule în mitoză	Activitatea mitotică,	Frecvența (%) în:			
				P	M	A	T
Martor	11825	1665	14,7±0,3	50,8	26,0	14,5	8,7
FC	13181	3373	25,6±0,4*	62,2	18,7	9,3	5,8

* - deosebire distinctă de martor la nivelul de 5%;

P – profază, M – metafază, A – anafază, T - telofază

10

Tabelul 2
Nivelul mutațional și spectrul aberațiilor cromozomice în rădăcinile soiului de mazăre Verde 1 induse de FC de *F. oxysporum*

Varianta	Numărul de celule studiate în anafază-telofază	Numărul de celule cu aberații	Nivelul mutațional, %	Tipurile de aberații, %		
				Cromozomi dispersați	Punți cromatidice	Alte tipuri
Martor	203	14	6,9±1,8	-	92,9	7,1
FC	436	30	6,9±1,2	6,7	93,3	-

15

Tabelul 3
Nivelul aberațiilor cromozomice în celulele meiotice de mazăre la acțiunea ciupercii *F. oxysporum* în diferite condiții de mediu

Soiul	Varianta	Numărul de celule studiate	Numărul de celule normale	Numărul de celule cu aberații	Frecvența aberațiilor, %	De câte ori în raport cu martorul
a. 1995						
Smaragd (S)	Martor	2605	2256	73	2,8	
	Infecție	2055	1386	669	32,6	11,6
Iujno-Ucrainschi (R)	Martor	2816	2753	63	2,2	
	Infecție	1723	1635	88	5,1	2,3
a. 1997 – termenul 1						
Smaragd	Martor	1781	1768	13	0,7	
	Infecție	544	521	23	4,2	5,8
Iujno-Ucrainschi	Martor	863	832	31	3,7	
	Infecție	601	552	49	8,2	2,2
a. 1997 – termenul 2						
Smaragd	Martor	742	717	25	3,5	
	Infecție	836	727	109	15,0	4,3
Iujno-Ucrainschi	Martor	816	774	42	5,2	
	Infecție	1235	1106	129	10,5	2,0

S - sensibil; R - rezistent

20

MD 2012 G2 2002.09.30

5

Tabelul 4
Spectrul aberațiilor cromozomice în celulele meiotice de mazăre la acțiunea ciupercii *F. oxysporum* în diferite condiții de mediu

Soiul	Varianta	Numărul total de aberații	Fragmente solitare, %	Fragmente duble, %	Cromozomi dispersați, %	Cromozomi retardați, %	Punți cromatidice, %	Alte tipuri de aberații, %
a. 1995								
Smaragd	M	73	30,1	2,7	49,3	0,0	15,1	2,7
	I	669	49,6	3,0	8,5	0,3	38,0	0,6
Iujno-Ucrainschi	M	63	26,1	0,0	13,0	17,4	43,5	0,0
	I	88	27,3	2,3	27,3	9,1	34,1	0,0
a. 1997 – termenul 1								
Smaragd	M	13	-	-	30,8	23,1	46,1	-
	I	23	4,3	-	34,8	34,8	13,0	13,0
Iujno-Ucrainschi	M	31	6,4	-	12,9	54,8	25,8	-
	I	49	4,1	-	16,3	28,6	51,0	-
a. 1997 – termenul 2								
Smaragd	M	25	16,0	-	-	28,0	56,0	-
	I	109	24,8	2,7	17,4	37,6	13,8	3,7
Iujno-Ucrainschi	M	42	-	-	21,4	38,1	40,5	-
	I	129	2,3	-	13,9	26,4	57,4	-

M – martor; I - infecție

5

Deoarece frecvența aberațiilor cromozomice în meioză este un indiciu sensibil la acțiunea factorilor stresogeni de mediu, s-a procedat la cercetarea acestora în celulele meiotice la soiuri cu rezistență diferită la fuzarioza radiculară pe fond de infecție cu inoculul *F. oxysporum*: Smaragd (sensibil) și Iujno-Ucrainschi (rezistent). Pentru cercetarea meiozei au fost utilizați muguri floralii tineri de mazăre, fixați după Carnua, iar preparatele s-au colorat cu acetocarmin. Fotografiile au fost cercetate la microscopul МВМ-1, la mărirea 10×40. După cum rezultă din datele prezentate în tab. 3 la acțiunea infecției de *F. oxysporum* în diferite condiții de mediu (care influențează în mare măsură activitatea ciupercii) la soiul sensibil Smaragd incidența aberațiilor cromozomice a crescut de 11,6, 5,8 și 4,3 ori, iar la soiul rezistent Iujno-Ucrainschi – de 2,3, 2,2 și 2,0 ori în comparație cu martorul, corespunzător, în anii 1995 și 1997 (termenul 1 și 2 de semănare). Cu alte cuvinte, la soiul rezistent stabilitatea aparatului cromozomic, manifestată prin frecvența aberațiilor cromozomice, este mult mai pronunțată decât la soiul sensibil. Totodată, se remarcă că cele mai labile aberații cromozomice la acțiunea ciupercii *F. oxysporum* sunt aberațiile de tip cromozomi dispersați, cromozomi retardați și punți cromatidice (tab. 4).

20

Datele obținute ne permit să tragem concluzia că frecvența scăzută a aberațiilor cromozomice în celulele meiotice de mazăre la acțiunea ciupercii *F. oxysporum* (de 2,0...2,3 ori mai sporită în raport cu martorul) poate servi în calitate de parametru test al rezistenței acestei culturi la fuzarioza radiculară.

25

(57) Revendicare:

5 Metodă de apreciere a rezistenței soiurilor de mazăre la fuzarioza radiculară ce include
testarea după modificarea parametrilor citogenetici sub acțiunea fitotoxinei, **caracterizată prin aceea**
că în calitate de fitotoxină se utilizează *Fusarium oxysporum* (Schlecht.) Syd. Et Hans., iar testarea
se efectuează după modificarea frecvenței aberațiilor cromozomice în celulele meiotice ale mugurilor
florali, totodată se consideră rezistente la fuzarioza radiculară soiurile de mazăre la care procentul
frecvenței aberațiilor cromozomice în celulele infectate este de 2,0...2,3 ori mai mare decât în cele
neinfectate.
10

(56) Referințe bibliografice:

1. Вэдэнеску С.Н. Технологические и селекционные способы защиты овощного гороха от фузариозных заболеваний в условиях промышленного овощеводства Молдавии.//Автореф. дис....канд. с.-х. наук. Минская обл., Самохваловичи, 1984, с. 20
2. Методы экспериментальной микологии. Справочник. Киев, Наукова думка, 1982, с. 325

Şef Secție:

GUŞAN Ala

Examinator:

BANTAŞ Valentina

Redactor:

LOZOVANU Maria

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: a 2001 0033	(85) Data fazei naționale PCT:
(22) Data depozit: 2001.02.06	(86) Cerere internațională PCT:
Prioritatea invocată : (31) nr.: 32) data : 33) țara : (51) ⁷ : G 01 N 33/48; A 01 G 7/00 Alți indici de clasificare: Titlul : Metodă de apreciere a rezistenței soiurilor de mazăre la fuzarioza radiculară. (71) Solicitantul : Institutul de Genetică al Academiei de Științe a Republicii Moldova, MD Termeni caracteristici :	
I. Minimul de documente consultate (sistema clasificării și indici de clasificare Int. Cl. (7))	
Int. Cl. ⁷ : G 01 N 33/48; A 01 G 7/00 (MD) 1994 - 2002 (EA) 1996-2001 SU din fond BRIT	
II. Documente considerate ca relevante	
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si indicarea pasajelor pertinente
	Numărul revendicării vizate
☐ 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 cand 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 2002.06.06	
Examinatorul Bantaș Valentina	

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