

Invenția se referă la agricultură, în special la legumicultură, și poate fi utilizată la tratarea semințelor de castravete pentru sporirea termotoleranței sistemului radicular al plantulelor de castravete la temperaturi pozitive înalte în stadiile incipiente ale ontogenezei.

Creșterea, viabilitatea și productivitatea plantelor este afectată de un șir de factori abiotici, inclusiv extremele de temperatură.

Sursele de referință demonstrează că expunerea plantelor în perioada ontogenetică, inclusiv cea juvenilă, acțiunii stresului de temperatură provoacă stresul oxidativ, cu producerea în exces a speciilor reactive de oxigen (SRO), inclusiv a peroxidului de hidrogen ( $H_2O_2$ ), molecule extrem de reactive și dăunătoare pentru celulă, care reacționând cu compușii biochimici ai celulelor vegetale generează afectarea unui șir de procese morfologice, fiziologice și biochimice ale structurilor compartimentare ale celulelor vegetale.

A fost demonstrat că în procesele de protecție împotriva stresului oxidativ și de recuperare a deteriorărilor provocate de acțiunea temperaturilor pozitive ridicate, în celulele plantelor se activează diferite tipuri de mecanisme, printre care menținerea stabilității membranelor celulare și eliminarea SRO prin intermediul inducerii activităților enzimatiche, inclusiv al catalazei, precum și al producerii de compuși antioxidanți, care sunt implicați în activitatea sistemului antioxidant defensiv din celule.

Efectele nocive ale stresului termic pot fi atenuate prin creșterea plantelor de cultură cu ameliorarea termotoleranței utilizând diverse abordări, inclusiv utilizarea regulatorilor de creștere.

Sunt cunoscute procedee pentru sporirea rezistenței la temperaturi pozitive ridicate la castravete, prin aplicarea diferitor compuși chimici [1], [2], [3].

Dezavantajul acestor procedee constă în faptul că pentru inducerea termotoleranței la plantele de castravete s-au aplicat tratamente cu diferite soluții de compuși chimici de natură sintetică pentru stropirea plantulelor întregi sau a aparatului foliar, însă n-au fost efectuate testări cu tratarea semințelor, în vederea sporirii termotoleranței sistemului radicular al plantelor la temperaturi pozitive ridicate în stadiile incipiente ale ontogenezei.

Cea mai apropiată soluție pentru atenuarea daunelor cauzate de stresul de temperatură în stadiile incipiente ale ontogenezei este procedeul de tratare a semințelor de castravete cu soluție de 2 mM de acid salicilic (AS) [4].

Dezavantajele acestei soluții constau în aceea că AS este un regulator de creștere de origine sintetică, eficiența cărui în desfășurarea potențialului de stimulare a germinației semințelor, creșterii și dezvoltării sistemului radicular este variată, determinată de multiplele mecanisme metabolice în care este implicat acesta la diferite specii și soiuri de plante, necesită utilizarea alcoolului etilic pentru prepararea soluțiilor de tratare, ce este irațional și costisitor; evaluarea eficacității utilizării AS la tratarea semințelor de castravete pentru ameliorarea daunelor cauzate de stresul termic a fost efectuată numai pe parcursul a 24 și 48 ore.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în extinderea sortimentului de regulatori de creștere de origine naturală cu efect sporit asupra germinării semințelor de castravete, creșterii și dezvoltării sistemului radicular, majorării termotoleranței acestuia în stadiile incipiente ale ontogenezei, în cazul când radiclele semințelor germinate sunt expuse acțiunii temperaturii pozitive ridicate.

Procedeul de tratare a semințelor de castravete *Cucumis sativus* L. înlătură dezavantajele menționate mai sus prin aceea că include imersarea semințelor de castravete, înainte de germinare, în soluție apoasă de  $5 \times 10^{-5}\%$  de extract obținut din biomasa algei *Spirogira* sp. (Reglalg) prin extragerea cu alcool etilic, la temperatura de  $5^\circ\text{C}$  în decurs de 24 ore.

Pentru aprecierea efectului tratării semințelor de castravete cu Reglalg, semințele sunt plasate pentru germinare la întuneric la temperatura de  $25^\circ\text{C}$  și umiditatea aerului de 70...80% în decurs de 24 ore, imersarea semințelor germinate cu lungimea radiclei de cca 1 cm în apă cu valori ale temperaturilor de la  $43^\circ\text{C}$  în decurs de 10...20 min, cu expunerea ulterioară la întuneric la temperatura de  $25^\circ\text{C}$  și umiditatea aerului de 70...80% în decurs de 4 zile și aprecierea gradului de afectare a sistemului radicular la temperatura de  $43^\circ\text{C}$  prin determinarea activității componentelor sistemului antioxidant defensiv.

După 4 zile de cultivare, plantulele întregi de castravete se cântăresc, se separă rădăcinile, care de asemenea se cântăresc și se plasează în congelator la temperatura de  $-33...-34^\circ\text{C}$ , fiind ulterior folosite pentru determinarea unor indici importanți ai sistemului antioxidant defensiv, inclusiv activitatea catalazei, conținutul total de polifenoli, conținutul total de flavonoide, conținutul dialdehidei malonice. Modificările valorilor acestor indici demonstrează rolul activităților componentelor sistemului antioxidant defensiv în lichidarea SRO, produse în condițiile temperaturii pozitive ridicate de  $+43^\circ\text{C}$  în decurs de 10...20 min respectiv, și posibilitatea de majorare a termotoleranței sistemului radicular al plantulelor de castravete cu ajutorul preparatului Reglalg, care manifestă un efect benefic veridic asupra proprietăților antioxidante din rădăcini, precum și asupra creșterii și dezvoltării plantulelor.

Rezultatul tehnic al invenției constă în faptul că soluția apoasă de Reglalg cu concentrația de  $5 \times 10^{-5}\%$  substanță activă, utilizată la tratarea semințelor de castravete înainte de germinare, reprezintă un mijloc eficient în sporirea germinației, creșterii și dezvoltării sistemului radicular, majorarea termotoleranței acestuia, precum și activarea componentelor sistemului antioxidant defensive din rădăcini, induse de acțiunea temperaturii pozitive ridicate, iar modificările adaptive ale activităților antioxidante din rădăcini sunt funcționale pe parcursul perioadei de 96 ore după expunerea la acțiunea temperaturilor pozitive ridicate, față de 24 și 48 ore în cea mai apropiată soluție cu utilizarea regulatorului de creștere sintetic AS.

Criteriile ce argumentează avantajele procedeei propuse:

- utilizarea în calitate de RC a unui preparat de origine naturală, Reglalg, față de utilizarea RC sintetic – AS în cea mai apropiată soluție;
- aplicarea preparatului Reglalg pentru tratarea semințelor de castravete asigură un efect benefic veridic în sporirea germinației, creșterii și dezvoltării sistemului radicular; majorarea termotoleranței acestuia, precum și activarea componentelor sistemului antioxidant defensive din rădăcini, induse de acțiunea temperaturii pozitive ridicate;
- durata efectului benefic al eficacității utilizării soluției apoase de Reglalg cu concentrația de  $5 \times 10^{-5} \%$  substanță activă la tratarea semințelor de castravete pentru ameliorarea daunelor cauzate de stresul temperaturilor pozitive ridicate și pentru majorarea termotoleranței sistemului radicular cu ajutorul acestui preparat a constituit 96 ore, față de 24 și 48 de ore în cea mai apropiată soluție cu utilizarea regulatorului de creștere sintetic AS.

Invenția este argumentată prin următoarele exemple.

Pentru efectuarea cercetărilor au fost utilizate semințe de castravete *Cucumis sativus* L., soiul Concurrent, prealabil selectate, bine spălate și dezinfectate.

#### Exemplul I

Identificarea concentrației de substanță activă de Reglalg a soluțiilor cu efect maxim asupra germinării și creșterii plantulelor de castravete la etapele incipiente ale ontogenezei.

Pentru determinarea concentrației cu efect maxim în studiu au fost incluse soluții apoase cu diferite concentrații de substanță biologic activă Reglalg. Înainte de germinare, semințele au fost imersate timp de 24 ore la  $+5^{\circ}\text{C}$  în apă distilată (martor) sau în soluții apoase cu concentrația de  $8,33 \times 10^{-5}$ ;  $5,0 \times 10^{-5}$ ;  $3,33 \times 10^{-5}$  și  $2,5 \times 10^{-5}$  de substanță biologic activă Reglalg.

Preparatul Reglalg (Autorizație AA NR 0448 eliberată din 21.02.2003 de Centrul de Stat pentru Atestarea Produselor Chimice și Biologice de Protecție și Stimulare a Plantelor. Grupa a 4-a de toxicitate) prezintă un complex de substanțe biologic active, obținute din biomasa algei filamentoase verzi *Spirogira* sp., crescută în mediu organic timp de 10...12 zile, uscată până la umiditatea de 5...7% și fărâmițată până la starea de praf, totodată înainte de extragere biomasa se tratează cu cloroform, apoi cu apă, iar extragerea finală se realizează cu alcool etilic în raport de 1:(4...6) (la 250 g se adaugă 100...150 ml alcool etilic) cu diluția ulterioară cu apă. Soluția finală conține 5% de substanță uscată.

Apoi semințele se extrag din soluțiile de incubare și sunt aranjate în cutii Petri pe hârtie de filtru, umectată cu apă distilată, și plasate pentru germinare în termostat la  $25^{\circ}\text{C}$ , la întuneric și umiditatea aerului de 70...80% pe parcursul a 4 zile.

Pentru identificarea celei mai eficiente concentrații de substanță activă de Reglalg utilizată, plantulele cu vârsta de 4 zile au fost cântărite. Rezultatele sunt prezentate în tabel.

Tabel

Concentrațiile utilizate de substanță biologic activă Reglalg	Biomasa, g/ 1 plantă	Biomasa, % față de Martor
H <sub>2</sub> O distilată (martor)	0,26495 ± 0,0043	100
<i>Reglalg</i> , $8,3 \cdot 10^{-5}$	0,25906 ± 0,0011	97,78
<b><i>Reglalg</i>, <math>5 \cdot 10^{-5}</math></b>	<b>0,28226 ± 0,0381</b>	<b>106,53</b>
<i>Reglalg</i> , $3,3 \cdot 10^{-5}$	0,26977 ± 0,0701	101,8
<i>Reglalg</i> , $2,5 \cdot 10^{-5}$	0,26515 ± 0,1032	100,07

Din datele prezentate în tabel este evident că efect maxim asupra germinării și creșterii plantulelor s-a înregistrat în varianta în care semințele se tratează cu soluție cu concentrația de  $5 \times 10^{-5} \%$  substanță activă de Reglalg, ce a asigurat sporirea acumulării biomasei proaspete cu 6,5% comparativ cu plantulele martor.

#### Exemplul II

Aprecierea eficacității aplicării soluției cu concentrația de  $5 \times 10^{-5} \%$  substanță activă de Reglalg asupra creșterii sistemului radicular și majorării termotoleranței acestuia, datorită sporirii activităților componentelor sistemului antioxidant defensiv, implicate în lichidarea cantităților excesive de SRO, inclusiv de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, formate în condițiile acțiunii temperaturilor pozitive ridicate.

Conform invenției propuse și rezultatelor obținute în exemplul 1, înainte de germinare, semințele au fost imersate timp de 24 ore la  $+5^{\circ}\text{C}$  în apă distilată (martor) sau în soluție cu concentrația de  $5 \times 10^{-5} \%$  substanță activă de *Reglalg*, cu efect maxim asupra germinării și creșterii plantulelor de castravete (vezi tabelul), apoi semințele sunt extrase din soluția de incubare și aranjate în cutii Petri pe hârtie de filtru, umectată cu apă distilată, care sunt plasate în termostat la  $+25^{\circ}\text{C}$ , la întuneric și umiditatea aerului de 70...80% în decurs de 24 ore pentru germinare. După aceasta, se selectează semințele germinate cu lungimea radiclei de circa 1 cm. O parte din semințele germinate cu

lungimea radiclei de circa 1 cm tratate cu *Reglalg*, cât și cu apă distilată (martor) au fost expuse acțiunii temperaturii pozitive ridicate de +43°C prin imersarea lor în baia cu apă cu temperatura indicată pe parcursul a 10, și respectiv, 20 min, iar altă parte din semințele germinate cu lungimea radiclei de circa 1 cm tratate cu *Reglalg* și cu apă distilată (martor) au fost imersate în baia cu apă cu temperatura optimă de +25°C pe parcursul a 10 și, respectiv, 20 min. Semințele extrase din baia cu apă cu temperatura de +43°C, cât și +25°C se aranjează în cutii Petri pe hârtie de filtru, umectată cu apă distilată, și din nou se plasează în termostat la temperatura de +25°C, la întuneric și umiditatea aerului de 70...80% pentru continuarea creșterii plantulelor pe parcursul a 4 zile (96 ore), față de 24 și, respectiv, 48 ore în cea mai apropiată soluție cu utilizarea AS. Ulterior, plantulele întregi de castravete au fost fotografiate și cântărite, apoi au fost separate rădăcinile, care de asemenea se cântăresc. După aceasta rădăcinile se plasează în congelator la temperatura de - 33°C...-34°C și se utilizează pentru determinarea activității componentelor sistemului antioxidant defensiv. Despre nivelul statutului antioxidant defensiv din rădăcini s-a judecat după gradul de modificare a activității catalazei, conținutului total de polifenoli (CTP), conținutului total de flavonoide (CTF) și conținutului dialdehidei malonice (DAM).

Invenția se explică prin desenele din fig. 1...8, care reprezintă:

- fig. 1, creșterea plantulelor de castravete în ontogeneză în dependență de tratarea semințelor cu apă distilată (martor) sau cu soluție apoasă cu concentrația de  $5 \times 10^{-5}$  % substanță biologic activă *Reglalg* și expunerea ulterioară a lor acțiunii șocului termic de +43°C și temperaturii optime de +25°C cu durata de 10 și, respectiv, 20 minute;
- fig. 2, acumularea biomasei proaspete plantulelor de castravete cu vârsta de 4 zile în dependență de tratarea semințelor cu apă distilată (martor) sau cu soluție apoasă cu concentrația de  $5 \times 10^{-5}$ % substanță biologic activă *Reglalg* și expunerea ulterioară a lor acțiunii șocului termic de +43°C și temperaturii optime de +25°C cu durata de 10 și, respectiv, 20 minute;
- fig. 3, dezvoltarea sistemului radicular al plantulelor de castravete cu vârsta de 4 zile în dependență de tratarea semințelor cu apă distilată (martor) sau cu soluție apoasă cu concentrația de  $5 \times 10^{-5}$ % substanță biologic activă *Reglalg* și expunerea ulterioară a lor acțiunii șocului termic de +43°C și temperaturii optime de +25°C cu durata de 10 și, respectiv, 20 minute;
- fig. 4, acumularea biomasei rădăcinilor plantulelor de castravete cu vârsta de 4 zile în dependență de tratarea semințelor cu apă distilată (martor) sau cu soluție apoasă cu concentrația de  $5 \times 10^{-5}$ % substanță biologic activă *Reglalg* și expunerea ulterioară a lor acțiunii șocului termic de +43°C și temperaturii optime de +25°C cu durata de 10 și, respectiv, 20 minute;
- fig. 5, activitatea catalazei în rădăcinile plantulelor de castravete cu vârsta de 4 zile în dependență de tratarea semințelor cu apă distilată (martor) sau cu soluție apoasă cu concentrația de  $5 \times 10^{-5}$ % substanță biologic activă *Reglalg* și expunerea ulterioară a lor acțiunii șocului termic de +43°C și temperaturii optime de +25°C cu durata de 10 și, respectiv, 20 minute;
- fig. 6, conținutul total de polifenoli în rădăcinile plantulelor de castravete cu vârsta de 4 zile în dependență de tratarea semințelor cu apă distilată (martor) sau cu soluție apoasă cu concentrația de  $5 \times 10^{-5}$ % substanță biologic activă *Reglalg* și expunerea ulterioară a lor acțiunii șocului termic de +43°C și temperaturii optime de +25°C cu durata de 10 și, respectiv, 20 minute;
- fig. 7, conținutul total de flavonoide în rădăcinile plantulelor de castravete cu vârsta de 4 zile în dependență de tratarea semințelor cu apă distilată (martor) sau cu soluție apoasă cu concentrația de  $5 \times 10^{-5}$ % substanță biologic activă *Reglalg* și expunerea ulterioară a lor acțiunii șocului termic de +43°C și temperaturii optime de +25°C cu durata de 10 și, respectiv, 20 minute;
- fig. 8, conținutul dialdehidei malonice în rădăcinile plantulelor de castravete cu vârsta de 3 zile în dependență de tratarea semințelor cu apă distilată (martor) sau cu soluție apoasă cu concentrația de  $5 \times 10^{-5}$ % substanță biologic activă *Reglalg* și expunerea ulterioară a lor acțiunii șocului termic de +43°C și temperaturii de +25°C cu durata de 10 și, respectiv, 20 minute.

Activitatea catalazei, enzimă-cheie de protecție antioxidantă, s-a determinat în rădăcinile păstrate în congelator, care se fărâmițează cu sticlă pisată în prezența soluției tampon 0,05 M Na – fosfat, pH=6,8, în raport 1:5, apoi extractele omogenizate se agită 20 min, după care se centrifughează la 15000 g timp de 15 min, la temperatura de 2°C. În supernatantele obținute s-a măsurat activitatea catalazei prin metoda spectrofotometrică, monitorizând descompunerea H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> la  $\lambda = 240$  nm [Beers R. F., Sizer W. J. Biol. Chem., 1952, vol.195, p.133-140].

Conținutul total de polifenoli (CTP) și flavonoide (CTF) s-a evaluat în rădăcinile păstrate în congelator, care au fost fărâmițate cu sticlă pisată în prezența soluției apoase etanolice de 60% în raport de 1:10, ulterior extractele omogenizate se agită 4 ore, se centrifughează la 15000 g timp de 15 min, la temperatura de 2°C. În supernatante se determină conținutul total de polifenoli (CTP) cu utilizarea reactivului Folin Ciocâlțu la  $\lambda = 530$  nm și conținutului total de flavonoide (CTF) la  $\lambda = 415$  nm [Md. Irshad et al. Intern. J. Medic. Chemistry, vol. 2012, Articol ID 157125, 6 p. doi:10.1155/2012/157125].

Evaluarea conținutului dialdehidei malonice (DAM), un produs al peroxidării acizilor grași nesaturați din fosfolipide. Acumularea DAM din celule este condiționată de acțiunea șocului termic și este asociată cu diminuarea conținutului de fosfolipide din membranele celulare, reprezentând un indice ce determină integritatea membranelor celulare [Doblinski P. M.F. et al. Braz. arch. biol. technol., 2003, vol. 46, no.2, p.193-198].

După nivelul indicilor menționați, inclusiv activitatea catalazei, CTP, CTF și DAM se apreciază gradul de afectare a sistemului radicular al plantulelor de castravete crescute din semințe tratate cu Reglalg sau apă distilată (martor) și expuse ulterior acțiunii temperaturii pozitive ridicate de +43°C în decurs de 10 și, respectiv, 20 min comparativ cu plantulele tratate cu temperatura optimă de +25°C.

Datele prezentate în figurile 1...4, cu privire la plantulele de castravete crescute din semințe tratate cu apă distilată (martor) sau cu soluție apoasă cu concentrația de  $5 \times 10^{-5}\%$  substanță activă de Reglalg cu expunerea ulterioară a radiclelor acțiunii temperaturii pozitive ridicate de +43°C cu durata de 10 și, respectiv, 20 min demonstrează, că în variantele cu aplicarea Reglalg plantulele integre (vezi figura 1) și, în particular, sistemul radicular (vezi figura 3), vizual sunt mai viguroase, comparativ cu plantulele martor, tratate cu apă distilată, atât cele expuse temperaturii optime de +25°C, cât și temperaturii pozitive ridicate de +43°C. Aceste rezultate au fost confirmate și prin valorile sporite ale acumulării biomasei proaspete a plantulelor integre (vezi figura 2) și a rădăcinilor (vezi figura 4), care atestă eficiența aplicării Reglalg, atât la valoarea temperaturii de +25° C, cât și a celei de +43° C. Acest fapt relevă rolul preparatului Reglalg în sporirea termotoleranței sistemului radicular al plantulelor față de temperaturile pozitive ridicate pe parcursul perioadei de 96 ore, în comparație cu perioada de 24 și 48 ore cu utilizarea AS în cea mai apropiată soluție.

Plantulele, crescute din semințe conform invenției propuse, se caracterizează prin conținut mai înalt de compuși polifenolici (vezi figura 6) și flavonoide (vezi figura 7) în rădăcini, comparativ cu plantulele martor, ceea ce demonstrează rolul compușilor respectivi în sporirea termotoleranței plantulelor. După nivelul activității catalazei (vezi figura 5) în rădăcinile plantulelor de castravete din varianta martor s-a stabilit că aplicarea temperaturii pozitive ridicate de +43°C cu durata de 10 și, respectiv, 20 min induce majorarea activității catalazei, datorită producerii în exces a SRO, cauzate de acțiunea temperaturii pozitive ridicate. Iar aplicarea Reglalg la tratarea semințelor înainte de expunerea lor acțiunii temperaturii pozitive ridicate implică diminuarea nivelului activității catalazei în rădăcini, comparativ cu martorul, datorită acțiunii benefice a preparatului, ce favorizează micșorarea deteriorărilor provocate de SRO, inclusiv a  $H_2O_2$ , induse de acțiunea temperaturii pozitive ridicate. După conținutul DAM în rădăcinile plantulelor de castravete (vezi figura 8), crescute din semințe tratate cu apă (martor) s-a stabilit că în condițiile aplicării ȘT de +43°C cu durata de 10 și, respectiv, 20 min are loc inducerea majorării conținutului DAM, iar aplicarea Reglalg, reduce efectul stresului oxidativ în rădăcinile plantulelor de castravete, provocat de acțiunea șocului termic, comparativ cu martorul, ceea ce demonstrează acțiunea benefică a Reglalg în diminuarea deteriorărilor din membranele celulare radiculare, cauzate de acțiunea șocului termic la temperatura de +43°C.

Așadar, aplicarea soluției apoase cu concentrația de  $5 \times 10^{-5}\%$  substanță activă de Reglalg la tratarea semințelor de castravete majorează acumularea biomasei proaspete a plantulelor cu 6,5% comparativ cu martorul, asigură inducerea unui efect benefic veridic asupra creșterii sistemului radicular cu majorarea termotoleranței acestuia față de acțiunea temperaturii pozitive ridicate. Totodată, perioada de evaluare a efectului benefic al aplicării preparatului Reglalg în inducerea majorării termotoleranței sistemului radicular, datorită modificărilor adaptive ale activităților componentelor sistemului antioxidant defensiv din rădăcini, a constituit 96 ore după acțiunea temperaturii pozitive ridicate, față de 24 și 48 de ore în cea mai apropiată soluție cu utilizarea AS.