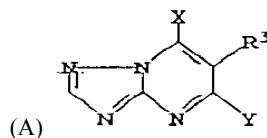


Descriere:

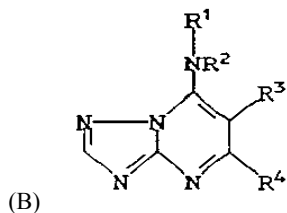
Invenția se referă la derivați ai dihalotriazolpirimidinei, unii fiind noi, la procedeele de obținere a lor, compozițiile cu conținut de astfel de compuși și utilizarea lor ca fungicide.

Este cunoscută obținerea 5,7-diclor-6-metil-1,2,4-triazol [1,5-a]-pirimidinei prin încălzirea 5,7-dihidroxi-6-metil-1,2,4-triazol [1,5-a]-pirimidinei cu cloroxid de fosfor timp de 4 ore la temperatura de 100°C [1]. Însă indicațiile despre activitatea biologică a acestor compuși lipsesc.

De asemenea, sunt cunoscuți compușii cu formula generală



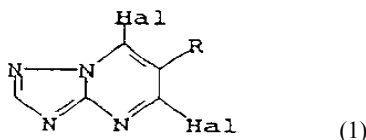
în care R_3 reprezintă grupa aril opțional substituită, X și Y reprezintă atom de clor sau atom de brom, ca compuși intermediari în procesul de obținere a unor derivați de triazolpirimidină cu activitate fungicidă cu formula generală



în care R_1 reprezintă grupa alchil, alchenil, alchinel, alcadienil, cicloalchil, bicicloalchil sau heterociclicil, opțional substituită; R_2 reprezintă atom de hidrogen sau grupă alchil; sau R_1 și R_2 împreună cu atomul de azot reprezintă inelul eterociclic opțional substituit; R_3 are semnificațiile definite anterior și R_4 reprezintă atom de hidrogen sau atom de halogen sau grupa $-NR_5R_6$, în care R_5 reprezintă atom de hidrogen sau grupa: amino, alchil, cicloalchil sau bicicloalchil, și R_6 reprezintă atom de hidrogen sau grupa alchil. Însă indicații despre orice activitate fungicidă a compusului cu formula A în acest document lipsesc.

Recent s-a determinat că unii compuși cu formula A și unii derivați noi de dihalotriazolpirimidină manifestă de sine stătător o activitate fungicidă.

Conform invenției se preconizează o compoziție fungicidă, care conține un purtător și, ca ingredient activ, compusul cu formula generală (1)



în care R reprezintă grupa alchil sau grupa alcoxi, opțional substituită, cu catenă liniară sau ramificată, sau grupa cicloalchil, aril, ariloxi sau heterociclicil, opțional substituită, și Hal reprezintă atom de fluor, clor, brom sau iod.

În cazul în care compușii în compozițiile conform invenției conțin grupa cicloalchil, ea poate include de la 3 până la 8, de preferință de la 3 până la 6 atomi de carbon. Grupă aril poate fi orice grupă hidrocarbonică aromatică, în special, grupa fenil sau naftil. Grupă eterociclică poate fi orice sistem inelar (ciclu) saturat sau nesaturat, ce conține cel puțin un eteroatom, fiind preferabile ciclul cu 3-6 atomi și în special, ciclurile cu 5 și 6 atomi. În particular, sunt preferate ciclurile cu conținut de azot, oxigen sau sulf, cum este piridinilul, pirimidinilul, pirodinilul, furilul, piranilul, morfolinilul și tienilul.

În cazul în care unii din substituenții menționați sunt desemnați ca opțional substituiți, grupele de substituenți, care sunt prezente opțional, pot fi una sau câteva grupe, utilizate de obicei pentru obținerea compușilor pesticizi și/sau modificarea acestor compuși, pentru a influența asupra structurii/activității lor, stabilității, penetrației sau altor proprietăți ale acestora. Exemplele concrete de astfel de substituenți includ, de exemplu, atomi de halogen, grupele nitro, ciano, tiocianato, cianato, hidroxil, alchil, haloalchil, alcoxi, haloalcoxi, amino, alchilamino, dialchilamino, formil, alcoxycarbonil, carboxil, alcanoil, alchiltio, alchilsulfonil, alchilsulfonil, halosulfonil, carbamoil, alchilamido, fenil, feniloxi, benzil și benziloxi, heterociclicil, în special furil și cicloalchil, în particular ciclopropil. În general, pot fi prezenți 0-3 substituenți [2].

Dacă oricare din substituenții menționați reprezintă sau conține grupa alchil, ea poate fi liniară sau ramificată și poate conține până la 12, de preferință până la 6, mai preferat până la 4 atomi de carbon. Dacă oricare din substituenții menționați reprezintă sau conține fragmentul aril sau cicloalchil, fragmentul aril sau cicloalchil propriu-zis poate fi substituit cu unul sau câțiva atomi de halogen, cu una sau câteva grupe nitro, ciano, alchil, haloalchil, alcoxi sau haloalcoxi. În cazul în care se utilizează grupele cicloalchil și heterociclicil, substituenții opționali de asemenea includ grupele care, împreună cu doi atomi de carbon adiacenți ai grupelor cicloalchil sau eterociclicil, formează un inel hidrocarbonic saturat sau nesaturat. Altfel spus, inelul hidrocarbonic saturat sau nesaturat poate fi condensat cu o grupă cicloalchil sau eterociclicil.

De preferință, R reprezintă grupa C_{1-12} -alchil, C_{1-12} -alcoxi, C_{3-8} -cicloalchil, fenil, fenoxi sau naftil sau inelul eterociclic cu 3-6 atomi, fiecare grupă sau inel putând fi substituite prin unul sau câțiva substituenți, selectați din: atomi de halogen, grupele nitro, ciano, hidroxil, C_{1-4} -alchil, C_{1-4} -haloalchil, C_{1-4} -alcoxi, C_{1-4} -haloalcoxi, C_{1-4} -alchilamino, di- C_{1-4} -alchilamino, formil, C_{1-4} -alcoxycarbonil, carboxil, halosulfonil, fenil, fenoxi, benzil și benziloxi sau în cazul în care R reprezintă grupa C_{3-8} -cicloalchil sau inelul eterociclic cu 3-6 atomi, opțional ortocondensată cu inelul benzenic.

Mai preferabil, R reprezintă grupa C_{1-6} -alchil, C_{1-6} -alcoxi, C_{3-8} -cicloalchil, fenil, fenoxi sau naftil sau inelul eterociclic cu 3-6 atomi, fiecare grupă sau inel substituindu-se prin unul sau câțiva substituenți, selectați din atomi de halogen, grupele C_{1-4} -alchil, C_{1-4} -haloalchil, C_{1-4} -alcoxi, C_{1-4} -haloalcoxi, halosulfonil, fenil, fenoxi și benziloxi.

Cea mai preferată este subgrupa compușilor cu formula I, în care R reprezintă grupa propil, butil, etoxi, ciclopentil, ciclohexil, fluorfenil, clorfenil, bromfenil, diclorfenil, clorfluorfenil, metilfenil, propilfenil, butilfenil, dimetilfenil, trifluorometilfenil,

metoxifenil, etoxifenil, dimetoxifenil, dietoxifenil, trimetoxifenil, trifluormetoxifenil, clorsulfonilfenil, bifenil, fenoxifenil, benziloxifenil, fluorfenoxi, clorfenoxi, metilfenoxi, dimetilfenoxi, naftil sau tienil și Hal reprezintă atom de clor sau brom.

Se propune de asemenea un procedeu de obținere a compoziției, care include combinarea compusului cu formula I, definită mai sus, cu cel puțin un purtător. O astfel de compoziție poate include un compus sau un amestec de câțiva compuși conform invenției.

Compoziția conform invenției conține, de preferință, de la 0.5 până la 95% greutate de ingredient activ.

Ca purtător în compoziția conform invenției poate fi orice material, cu care se formulează ingredientul activ, pentru a facilita aplicarea pe locul tratat, care, de exemplu, poate fi plantă, semințe sau sol, sau pentru a facilita depozitarea, transportarea sau manipularea. Purtătorul poate fi solid sau lichid, inclusiv material, care în condiții obișnuite este în stare gazoasă, însă poate fi comprimat până la stare lichidă, în acest caz utilizându-se oricare din purtătorii uzuali, folosiți la formulările compozițiilor fungicide.

Purtătorii solizi potriviți includ argile și silicați naturali și sintetici, de exemplu, silicați naturali, cum sunt solurile de diatomită; silicați de magneziu, de exemplu, talc; silicați de magneziu-aluminiu, de exemplu, atapulgite și vermiculite; silicați de aluminiu, de exemplu, caolinite, montmorillonite și mică; carbonat de calciu; sulfat de calciu; sulfat de amoniu; oxizi hidrogenați sintetici de siliciu și silicați sintetici de calciu sau aluminiu; elemente, de exemplu, carbonul și sulfurul; rășini naturale și sintetice, de exemplu, rășini de cumaronă, clorură de polivinil și polimeri, și copolimeri de stiren; policlorfenoli solizi; bitum; ceară, de exemplu, ceară de albine, ceară de parafină și ceară minerală clorată, și îngrășăminte solide, de exemplu, superfosfați.

Purtătorii lichizi potriviți includ: apă; alcoolii, de exemplu, izopropanol și glicoli; cetone, de exemplu, acetonă, cetonă metilelică, cetonă metilizobutolică și ciclohexanonă; eteri; hidrocarburi aromatice sau alifaticе, de exemplu, benzen, toluen și xilen; fracții de petrol, de exemplu, gaz lampant și uleiuri minerale ușoare; hidrocarburi clorurate, de exemplu, tetraclorometan, perclor-etilenă și tricloretan. Sunt potrivite, de asemenea, amestecurile de diferite lichide.

Compozițiile fungicide deseori se formulează și se transportă în formă concentrată, care apoi se diluează de către consumator înainte de aplicare. Prezența unor cantități mici de purtător, care reprezintă un surfactant, facilitează acest procedeu de diluție. De aceea, de preferință, cel puțin un purtător în compoziția conform invenției este un surfactant. De exemplu, compoziția poate include doi purtători, cel puțin unul din ei fiind surfactant.

Surfactantul poate fi un emulgator, dispersant sau umectant; el poate fi neionic sau ionic. Exemplele de surfactanți potriviți includ săruri de sodiu sau calciu ale acizilor poliarilici și acizi ligninsulfonici; produse de condensare ale acizilor alifatici sau amide sau amine alifaticе, ce conțin cel puțin 12 atomi de carbon în moleculă, cu oxid de etilenă și/sau oxid de propilenă; esteri ai acizilor alifatici și glicerinei, sorbitolului, zaharozei sau pentaeritritolului, condensării acestora cu oxid de etilenă sau/si oxid de propilenă; produse de condensare ale alcoolilor șirului alifatic sau alchilfenolilor, de exemplu, p-octilfenol sau p-octilcresol cu oxid de etilenă și/sau oxid de propilenă; sulfații sau sulfonații acestor produse de condensare; săruri ale metalelor alcaline sau alcalino-pământoase, de preferință, săruri de sodiu; esteri ai acidului sulfuric sau sulfonic, care conțin cel puțin 10 atomi de carbon în moleculă, de exemplu, lauril sulfat de sodiu, alchil-sulfați secundari de sodiu, săruri de sodiu ale uleiului de ricin sulfonat și alchilarilsulfonați de sodiu, cum este dodecilbenzen-sulfonatul și polimeri ai oxidului de etilenă și copolimeri ai etilenoxidului și propilenoxidului.

Compozițiile conform invenției pot fi formulate, de exemplu, sub formă de prafuri umectante, dusturi, granule, soluții, concentrate emulsionate, emulsii, concentrate suspensionate și aerosoli. Prafurile umectante conțin, de obicei, 25, 50 sau 75% greutate de ingredient activ și în aditie la purtătorul solid inert mai conțin, de obicei, 3-10% greutate de dispersant și, în caz de necesitate, 0-10% greutate stabilizator sau/si alte suplimente, cum sunt substanțele penetrante sau liante. Dusturile, de obicei, se formulează sub formă de concentrat de praf, cu un conținut similar conținutului prafului umectant, însă fără dispersant, și pot fi diluate în câmp cu alt purtător solid, obținându-se compoziția, ce conține 0.5-10% greutate de ingredient activ. Dimensiunile granulelor constituie, de obicei, 10-100 BS mesh. (1.676-0.152 mm) și se prepară prin tehnologia de aglomerare sau impregnare. De obicei, granulele conțin 0.5-75% greutate de ingredient activ și 0-10% greutate suplimente, cum sunt stabilizatorii, surfactanții, modificatorii de eliberare lentă și lianții. Așa-numitele "prafuri uscate fluide" constau din granule relativ mici cu o concentrație relativ înaltă de ingredient activ. Concentratele emulsionate, de obicei, conțin în aditie la solvent și, în caz de necesitate, la co-solvent, 1-50% greutate de ingredient activ, 2-20% greutate/vol. de emulgator și 0-20% greutate/vol. de alte suplimente, cum sunt stabilizatorii, penetranții și inhibitorii coroziei. În componența concentratelor suspensionate, pentru a obține un produs fluid stabil, care nu se sedimentează, se includ 10-75% greutate de ingredient activ, 0.5-15% greutate de dispersanți, 0.1-10% greutate suspensoizi, cum sunt coloizii de protecție și agenții tixotropi, 0-10% greutate de alte suplimente, cum sunt substanțele antispumante, inhibitorii coroziei, stabilizatorii, penetranții și aglutinanții, și apă sau lichid organic, în care ingredientul activ este practic insolubil; unele substanțe organice solide sau săruri neorganice pot fi prezente în preparat dizolvate, pentru a preveni sedimentarea sau în calitate de antiigel pentru apă.

Dispersiile apoase și emulsiile, de exemplu, compozițiile obținute prin diluarea prafului umectabil sau a concentratului, conform invenției, cu apă, de asemenea, cad sub incidența invenției. Emulsiile menționate pot fi de tipul apă-în-ulei sau ulei-în-apă și pot avea consistența "maionezei".

Compozițiile conform invenției pot conține și alte ingrediente, de exemplu, alți compuși cu proprietăți erbicide, insecticide sau fungicide.

Un interes deosebit pentru majorarea termenului de activitate protectoare a compușilor conform invenției prezintă utilizarea purtătorului, ce ar asigura o eliberare lentă a compușilor cu activitate fungică în mediul plantelor, care necesită o astfel de protecție. Așa preparate cu eliberare lentă se pot introduce în sol la rădăcina viței de vie sau pot include un component adeziv, care face posibilă aplicarea lor nemijlocit pe tuplina viței de vie.

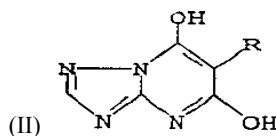
Unii din compușii cu formula I, cum s-a menționat anterior, sunt noi. Invenția preconizează, de asemenea, și compusul cu formula I, definit mai sus, cu condiția că

(I) dacă R reprezintă grupa aril opțional substituită, ambele grupe Hal nu reprezintă atomi de clor sau atomi de brom, și

(II) dacă R reprezintă grupa metil, ambele grupe Hal nu reprezintă atomi de clor.

În continuare invenția propune un procedeu de preparare a compusului cu formula I, definit anterior, care include:

a) reacția compusului cu formula generală



în care R are semnificațiile definite mai sus, cu un agent de clorurare sau de bromurare, pentru formarea compusului cu formula I, în care Hal reprezintă atom de clor sau brom;

b) opțional, reacția compusului cu formula I, obținut în etapa a), cu un agent de fluorurare, pentru a obține compusul cu formula I, în care Hal reprezintă atom de fluor; și

c) opțional, reacția compusului cu formula I, obținut în etapa a), cu NH₃ și apoi cu diiodmetan în prezența unui agent de diazotare pentru a obține compusul cu formula I, în care cel puțin un Hal reprezintă atom de iod.

Procedeele în etapa a) se poate realiza în prezența solventului. Solvenții potriviți includ hidrocarburi halogenate, cum este diclorometanul. În plus, excesul de agent de clorurare sau de bromurare poate servi ca solvent. Agenții de clorurare potriviți includ oxiclaură, triclorură și pentaclorură de fosfor. Agenții de bromurare potriviți includ oxibromură, tribromură și pentabromură de fosfor. Reacția se efectuează la temperatura în banda de valori de la 0°C până la temperatura de reflux al amestecului de reacție, de preferință temperatura reacției constituie de la 20°C până la temperatura de reflux al amestecului de reacție.

Procedeele în etapa b) se realizează în prezența solventului. Solvenții potriviți includ sulfolanul, dimetilformamida sau amestecul de acetoneitril și crown-eter. Dacă în calitate de solvent se utilizează sulfolanul sau dimetilformamida, drept co-solvent este avantajoasă utilizarea toluenului în scopul dehidrării agentului de fluorurare. Reacția, de obicei, se desfășoară la o temperatură în banda de valori de la temperatura camerei (circa 15°C) până la temperatura de reflux al amestecului de reacție, de preferință temperatura reacției constituie de la 40°C la temperatura de reflux al amestecului de reacție. Agenții de fluorurare potriviți includ fluoruri de metale alcaline, în special, fluorură de potasiu, pentafluorură de stibiu și trifluorură de dietilaminosulf.

Reacția cu NH₃ în etapa c) se realizează în prezența solventului. Solvenții potriviți includ eteri, cum este dioxanul, eterul dietilic și tetrahidrofuranul; hidrocarburi halogenate, cum este diclorometanul și, în special, toluenul. Reacția se efectuează avantajos la o temperatură în banda de valori de la 20°C până la temperatura de reflux al amestecului de reacție, de preferință, temperatura reacției constituie de la 40°C până la temperatura de reflux al amestecului de reacție. De asemenea, preferențială este efectuarea reacției în prezența bazei și excesul de NH₃ servește ca bază. Ca agent de diazotare, utilizat în etapa c), poate fi orice alchilester al acidului azotic, de preferință izopentil-nitrit. În cazul în care se utilizează alchilesterul acidului azotic, acesta poate servi drept co-solvent cu diiodmetanul. Această reacție se desfășoară la temperatura de la 60°C până la 120°C, de preferință de la 70°C până la 110°C. Ambele etape, în procedeele etapei c), se pot efectua într-un reactor.

Compușii cu formula II se pot obține prin interacțiunea 3-amino-1,2,4-triazolului cu esterul acidului malonic potrivit în condiții alcaline, conform metodei Y. Makisumi, Chem. Pharm. Bull., 9, 801, 1961.

În continuare invenția propune utilizarea compușilor cu formula generală I, definiți mai sus, sau a compozițiilor menționate și procedeul de combatere a fungilor în focar (locus), care include tratarea focarului, ce poate reprezenta, de exemplu, plantele afectate de fungi, semințele acestor plante sau mediul în care cresc aceste plante sau vor crește, cu așa compuși sau compoziții. Culturile, care pot fi protejate de fungi, includ vița de vie, cerealele, cum este grâul, ovăzul, merii și tomatele. Durata protecției, de obicei, depinde de compusul individual selectat și de o diversitate de factori externi, cum sunt clima, impactul căreia se atenuază prin utilizarea unei formulări potrivite.

Exemple de realizare a invenției

Exemplul 1

Obținerea 5,7-diclor-6-(2-clorfenil)-1,2,4-triazol[1,5-a]-pirimidinei

(R=2-clorfenil; Hal=Cl)

Se fuzionează 5,7-dihidroxi-6-(2-clorfenil)-1,2,4-triazol[1,5-a]-pirimidina (6.2 g; 0.026 M) cu 30 ml oxiclaură de fosfor și suspensia obținută se conduce în reflux timp de 3 ore. Excesul de oxiclaură de fosfor se separă prin distilare de la soluția limpede obținută și uleiul vâscos format se dizolvă în 50 ml de diclorometan. Pentru descompunerea urmelor de impurități de oxiclaură de fosfor în soluția de diclorometan se adaugă lent 50 ml de apă cu gheață. Apoi se separă stratul organic, se usucă deasupra sulfatului de sodiu și solventul se separă prin distilare, obținându-se 6.62 g de 5,7-diclor-6-(2-clorfenil)-1,2,4-triazol[1,5-a]-pirimidină sub formă de cristale de culoare gălbuie, t. top. 153°C.

Randamentul: 85% din cel prevăzut teoretic.

Exemplul 2

Obținerea 5,7-dibrom-6-(2-clorfenil)-1,2,4-triazol[1,5-a]-pirimidinei

(R=2-clorfenil; Hal=Br)

5,7-dihidroxi-6-(2-clorfenil)-1,2,4-triazol[1,5-a]-pirimidina (15 g; 0.057 M) se adaugă în porții mici, la temperatura de circa 100°C, în topitură de oxibromură de fosfor (exces, 40 g). După o reacție inițială viguroasă, se obține un ulei foarte vâscos limpede, care se expune la temperatura de 120°C pentru 2 ore. Amestecul se răcește la temperatura camerei și "sticla" obținută, în porții, se adaugă într-un amestec de apă și diclorometan. Stratul organic se separă, se usucă cu sulfat de sodiu și solventul se izolează prin distilare sub vid, obținându-se 19.93 g de 5,7-dibrom-6-(2-clorfenil)-1,2,4-triazol[1,5-a]-pirimidină, sub formă de cristale de culoare gălbuie, t. top. 212°C.

Randamentul: 90% din cel calculat teoretic.

Exemplele 3-52

Prin procedee similare celui descris în exemplul 1 au fost obținuți alți compuși conform invenției, prezentați în tabelul 1. În acest tabel compușii sunt indicați cu referință la formula I.

Tabelul 1

Exemplul nr.	R	Hal	T. top. (°C)
1	2	3	4
3	4-OC ₂ H ₅ fenil	Cl	138
4	3-OCH ₃ fenil	“	151
5	2-OCH ₃ fenil	“	143
6	2-SO ₂ Cl fenil	“	234
7	3-CF ₃ fenil	“	160
8	4-CH(CH ₃) ₂ fenil	“	122
9	4-OCF ₃ fenil	“	194
10	naft-2-il	“	192
11	4-F fenil	“	206
12	4-OC ₆ H ₅ fenil	“	160
13	4-bifenilil	“	170
14	3,4-(OCH ₃) ₂ fenil	“	185
15	4-OCH ₂ C ₆ H ₅ fenil	“	170
16	2-F fenil	“	173
17	3-F fenil	“	227
18	2-Br fenil	“	176
19	4-Br fenil	“	190
20	2-OCH ₂ C ₆ H ₅ fenil	“	amorf
21	2,3-(OCH ₃) ₂ fenil	“	150
22	3-Br fenil	“	205
23	naft-1-il	“	202
24	2,3-(OC ₂ H ₅) ₂ fenil	“	63
25	3,4-Cl ₂ fenil	“	205
26	tien-2-il	“	160
27	tien-3-il	“	130
28	3,4,5-(OCH ₃) ₃ fenil	“	180
29	2-CH ₃ fenil	“	160
30	3-Cl fenil	“	220
31	3,4-(CH ₃) ₂ fenil	“	185
32	ciclopentil	“	150
33	ciclohexil	“	205-209
34	2-F fenil	Br	195
35	2,4-Cl ₂ fenil	Cl	160
36	4-C(CH ₃) ₃ fenil	“	147
37	2-Cl, 6-F fenil	“	115
38	4-OCH ₃ fenil	“	138
39	2-CF ₃ fenil	“	128
40	4-Br fenil	Br	228-230
41	2-Cl, 6-F fenil	Br	170
42	4-CF ₃ fenil	“	246
43	3-F fenil	“	254
44	2-CF ₃ fenil	“	192
45	2-F fenoxi	Cl	145
46	2-CH ₃ fenoxi	“	152
47	2-Cl fenoxi	“	178-182
48	2,6-(CH ₃) ₂ fenoxi	“	144-146
49	3-CH ₃ fenoxi	“	135-137
50	etoxi	“	102-105
51	izopropil	“	135-137
52	izobutil-3-il	“	120-122

Exemplul 53

Activitatea fungicidă a compușilor conform invenției s-a studiat prin testele ce urmează.

a) Activitatea antisporulantă contra manei (făinării false) a viței de vie (Plasmopara Viticola; PVA)

Testul antisporulant direct cu utilizarea pulverizării pe frunze. Suprafața inferioară a frunzelor întregii vițe de vie (Cabernet Sauvignon) se inoculează prin pulverizarea unei suspensii apoase, care conține 2.5×10^4 zoosporangi/ml cu 2 zile înainte de tratarea cu compusul testat. Plantele inoculate se expun pentru 24 ore într-o încăpere cu umiditate înaltă, apoi 24 ore la temperatura și umiditatea de seră. Pe suprafețele inferioare ale frunzelor infectate se pulverizează o soluție de material activ în raport de 1:1 apă/acetona, cu un conținut de 0.04% “Tween-20” (marcă de comerț; surfactant-esterul polioxietilenic al sorbitantului). Plantele se tratează utilizând linia automată de pulverizare cu ajutorul. Concentrația compusului constituie 1000 ppm. în volumul pulverizat de 700 l/ha. După pulverizare plantele se reîntorc în condiții normale de seră pentru 96 ore și apoi se transferă într-o încăpere cu umiditate înaltă pentru 24 ore, pentru a induce sporularea până la estimarea rezultatelor. Estimarea se efectuează în baza indicelui în procente al suprafeței frunzei, acoperite cu spori, comparativ cu plantele de control.

b) Activitatea directă contra fitoftorozei tomatelor (Phytophthora infestans: PIP)

Testul de protecție directă cu pulverizare pe frunze. Pe suprafețele superioare ale frunzelor de tomate cu două frunzișoare se pulverizează compusul testat în doză de 1000 ppm. cu pulverizatorul, după cum s-a descris în a). După 24 ore în condiții normale de seră, suprafețele superioare ale frunzelor se inoculează prin pulverizare cu o suspensie apoasă, ce conține 2×10^5 zoospori/ml. Plantele inoculate se mențin 24 ore într-o încăpere cu umiditate înaltă și 5 zile într-o încăpere cu condiții pentru creștere. Evaluarea se bazează pe indicele în procente al suprafeței afectate a frunzei, comparativ cu frunzele de control.

c) Activitatea protectoare directă contra manei (făinării false) a viței de vie (Plasmopara viticola; PVP)

Este un test direct cu utilizarea pulverizării pe frunze. Pe suprafața inferioară a frunzelor întregii vițe de vie (Cabernet Sauvignon) se pulverizează compusul testat în doză de 1000 ppm., utilizând linia automată de pulverizare, după cum este descris în a), și după următoarea perioadă de 24 ore, în condiții normale de seră, suprafețele inferioare ale frunzelor se inoculează prin pulverizare cu o suspensie apoasă, ce conține 2.5×10^4 zoosporangi/ml. Plantele inoculate se expun pentru 24 ore într-o încăpere cu umiditate înaltă, 5 zile, în condiții normale de seră și apoi se reîntorc, pentru 24 ore, în condiții de umiditate înaltă. Estimarea se efectuează după indicele în procente al suprafeței frunzei acoperite cu spori, comparativ cu suprafața pe frunzele de control.

d) Activitatea contra putregaiului precoce al tomatelor (Alternaria solani; AS)

Prin acest test se determină activitatea profilactică de contact a compusului testat, aplicat prin pulverizare pe frunze. Germeții tomatelor (Outdoor Girl) se cresc până la etapa, în care se desface a doua frunză veritabilă. Plantele se tratează, utilizând linia automată de pulverizare, după cum este descris în a). Compușii testați se aplică sub formă de soluții sau suspensii în amestec de acetonă și apă (50:50 vol./vol.), cu un conținut de 0.04% surfactant (marca de comerț "Tween"-20). Peste o zi după tratare, germeții se inoculează prin pulverizarea suprafețelor superioare ale frunzelor cu suspensia A. Solani conidia, cu un conținut de 10^4 spori/ml. După inoculare, 4 zile plantele se mențin umede într-o încăpere umedă la temperatura de 21°C. Boala se estimează peste 4 zile după inoculare în baza indicelui în procente al ariei suprafeței frunzei, acoperite cu leziuni.

e) Activitatea protectoare directă contra mucegaiului sur al leguminoaselor (Botrytis cinerea; BCB)

Prin test se determină protecția directă prin pulverizare pe frunze. Suprafețele superioare ale frunzelor de plante leguminoase (The Sutton) se pulverizează cu compus testat în doză de 100 ppm., utilizând linia de pulverizare automată, așa cum este descris în a). Peste 24 ore după pulverizare frunzele se inoculează cu o suspensie apoasă cu un conținut de 10^5 conidii/ml. După inoculare, timp de 4 zile, plantele se mențin umede într-o încăpere umedă la temperatura de 21°C. Boala se estimează peste 4 zile după inoculare în baza indicelui în procente al ariei suprafeței, acoperite cu leziuni.

f) Activitatea contra pătării grâului (Leptosphaeria nodorum; LN)

Este un test terapeutic, utilizând pulverizarea pe plante. Frunzele de grâu (Norman) în etapa de o frunză se inoculează prin pulverizarea unei suspensii apoase, ce conține 1×10^6 spori/ml. Plantele inoculate se expun pentru 24 ore într-o încăpere cu umiditate înaltă până la tratare. Plantele se pulverizează cu soluția de compus testat în doză de 1000 ppm., utilizând linia automată de pulverizare, așa cum este descris în a). După uscare plantele se mențin timp de 6-8 zile la temperatura de 22°C și umiditate moderată, apoi se estimează. Estimarea se bazează pe densitatea leziunilor pe frunză, comparativ cu plantele de control.

g) Activitatea contra ruginii brune a grâului (Puccinia recondita; PR)

Este un test protector direct prin pulverizare pe frunze. Germeții de grâu (Avalon) se cultivă până la etapa de 1-1.5 frunze. Apoi pe frunze se pulverizează compusul testat în doză de 1000 ppm., utilizând linia automată de pulverizare, după cum este descris în a). Compușii testați se aplică sub formă de soluții sau suspensii în amestec de acetonă și apă (50:50 vol./vol.), cu un conținut de 0.04% surfactant (marca înregistrată "Tween-20"). Peste 18-24 ore după tratare, germeții se inoculează prin pulverizare pe plante, din toate părțile, cu o suspensie apoasă de spori, ce conține 10^5 spori/ml. După inoculare, timp de 18 ore, plantele se mențin în condiții de umiditate înaltă, la temperatura de 20-22°C. Apoi plantele se mențin în condiții de seră, apropiate mediului ambiant, adică la o umiditate relativă moderată și la temperatura de 20°C. Boala se estimează la 10 zile după inoculare în baza indicelui în procente al suprafeței, acoperite cu pustule sporulate, comparativ cu plantele de control.

h) Activitatea contra manei (făinării adevărate) a ovăzului (Erysiphe graminis f. sp. hordei; EG)

Este un test terapeutic, utilizând pulverizarea pe frunze. Frunzele germenilor de ovăz (Golden Promise) se inoculează prin aplicarea prafului de conidii ale manei cu o zi înainte de tratare cu compusul testat. Plantele inoculate se expun toată noaptea la temperatură și umiditate obișnuită de seră, până la tratare. Pe plante se pulverizează compusul testat în doză de 1000 ppm., utilizând linia automată de pulverizare, așa cum este descris în a). După uscare plantele se reîntorc în încăpere la 20-25°C și umiditate moderată pe un termen de 7 zile, apoi se estimează. Aprecierea se bazează pe indicele în procente al suprafeței frunzei, acoperite cu sporulări, comparativ cu frunzele plantelor de control.

i) Activitatea contra pirculariozei orezului (Pyricularia oryzae; PO)

Este un test terapeutic direct cu utilizarea pulverizării pe frunze. Pe frunzele germenilor de orez (Aichiaishi, circa 30 germeni în ghiveci) se pulverizează o suspensie apoasă, ce conține 10^5 spori/ml, cu 20-24 ore înainte de tratare cu compusul testat. Plantele inoculate se expun pentru o noapte la o umiditate înaltă și apoi se lasă să se usuce până la pulverizarea compusului testat în doză de 1000 ppm., utilizând linia automată de pulverizare, după cum este descris în a). După tratare plantele se mențin într-o încăpere specială pentru cultivarea orezului, la 25-30°C și umiditate înaltă. Estimarea se realizează peste 4-5 zile după tratare și se bazează pe densitatea leziunilor necrotice, comparativ cu plantele de control.

j) Activitatea contra pătării grâului in vitro (Pseudocercospora herpotrichoides; PHI)

Cu acest test se determină in vitro activitatea compușilor contra fungilor, care provoacă pătarea grâului. Compusul testat se dizolvă, se trece în suspensie în acetonă și se adaugă în 4 ml alicote de bulion de dextroză de cartof diluat în jumătate, plasat în cutii Petri cu 25 celule, obținându-se concentrația finală de 50 ppm. de compus și 2.5% acetonă. Fiecare celulă se inoculează cu o bucățică de agar/miceliu cu diametrul de 6 mm, luat dintr-o cultură de 14 zile de P. herpotrichoides. Cutiile se incubează la 20°C timp de 12 zile până la determinarea creșterii miceliilor.

k) Activitatea contra Fusarium in vitro (Fusarium culmorum; FSI)

Cu acest test se determină in vitro activitatea compușilor contra speciilor Fusarium, care provoacă putrezirea tulpinii și rădăcinilor. Compusul testat se dizolvă sau se trece în suspensie în acetonă și se adaugă în topitură de agar de dextroză de cartofi în concentrație înjumătățită, obținându-se concentrația finală de 50 ppm. de compus și 2.5% acetonă. După gelificarea agarului cutiile se inoculează cu bucățele de agar și miceliu cu diametrul de 6 mm, luate de la o cultură de 7 zile de Fusarium sp. Cutiile se incubează la 20°C timp de 5 zile și se determină creșterea radială de la bucățele.

Gradul de suprimare a bolii în toate testele descrise se exprimă în procente, comparativ sau cu obiectele de control netratate, sau cu obiectele de control, pulverizate cu diluant, conform criteriilor:

0 - suprimarea bolii în mai puțin de 50%;

1 - suprimarea bolii în circa 50-80%;

2 - suprimarea bolii în mai mult de 80%.

Rezultatele acestor teste sunt expuse în tabelul 2.

Tabelul 2

Exemplul nr.	Activitatea fungicidă										
	PVA	PIP	PVP	AS	BCB	LN	PR	EG	PO	PHI	FSI
1		1		1	2		2			2	2
4			1	1	2		1			2	2
5			2	2	2		1			2	2
7				1	1		2			2	2
8		2			2		2		1	2	2
9		1		2	2		2			2	2
10				2	2		2			2	1
11		2			2		2			2	2
12		2			2		2				1
13										2	2
14										2	1
15		2		1	2	1	1				
16		2		2	1					2	2
17		2		2	2					2	2
18		2		2	2					2	2
19		2		2						2	2
20	2				2		2				1
21		2		2						2	2
23				2	2					1	1
24				2	2	1				2	2
25				1	1	1					1
26				1	2				1	2	2

Exemplul 54

a) Activitatea antisporulantă contra manei viței de vie (*Plasmopara viticola*; PVA)

Este un test antisporulant direct cu utilizarea pulverizării pe frunze. Suprafața inferioară a frunzei de viță de vie (Cabernet Sauvignon) cu înălțimea de circa 8 cm se inoculează cu o suspensie apoasă, ce conține 5×10^4 zoosporangi/ml. Plantele inoculate se expun pentru 24 ore la o temperatură de 21°C într-o încăpere cu umiditate înaltă, apoi timp de 24 ore într-o seră la temperatura de 20°C și o umiditate relativă de 40%. Pe suprafața inferioară a frunzelor se pulverizează soluția de compus testat 1:1 apă/acetona, cu un conținut de 0.04% "Tween-20". Plantele se pulverizează din pulverizatorul cu două ajutaje. Concentrația compusului constituie 600 ppm. și volumul pulverizat 750 l/ha. După uscare plantele se reîntorc în seră la 20°C și umiditate relativă de 44% pentru 96 ore și apoi se transferă într-o încăpere cu umiditate înaltă, pentru 24 ore, în scopul inducerii sporulării. Estimarea se bazează pe indicele în procente al ariei frunzei, acoperite cu spori, comparativ cu spori pe frunzele de control.

b) Activitatea protectoare directă contra fitoforozei tomatelor (*Phytophthora infestans*; PIP)

Acesta este un test direct, în care se utilizează pulverizarea pe frunze. Pe plantele de tomate cu două frunze desfăcute (First in the Field) se pulverizează compusul testat în doză de 600 ppm., după cum este descris în a). După uscare plantele se expun în condiții de seră la temperatura de 20°C și umiditatea relativă de 40%. Apoi suprafețele superioare ale frunzelor se inoculează cu o suspensie apoasă, ce conține 2×10^5 zoosporangi/ml. Plantele inoculate se mențin timp de 24 ore la temperatura de 18°C într-o încăpere cu umiditate înaltă și apoi 5 zile în camera de creștere la 15°C și umiditate relativă de 80%, durata luminoasă a zilei fiind de 14 ore. Estimarea se bazează pe indicele în procente al suprafeței afectate a frunzei, comparativ cu frunzele de control.

c) Activitatea contra fitoforozei precoce a tomatelor (*Alternaria solani*; AS)

Este un test profilactic direct, ce utilizează pulverizarea pe frunze. Germeții de tomate (Outdoor Girl) în stadiul de desfăcere a frunzei a doua se pulverizează cu compusul testat în doză de 600 ppm., așa cum este descris în a). După uscare plantele se expun pentru 24 ore în seră la temperatura de 20°C și umiditatea relativă de 40% cu inocularea ulterioară a suspensiei apoase de conidii *A. solani*, ce conține 1×10^4 conidii/ml, pe suprafața superioară a frunzelor. După 4 zile de aflare în încăperea cu umiditate înaltă la temperatura de 21°C se estimează boala conform indicelui suprafeței afectate a frunzei, comparativ cu frunzele de control.

d) Activitatea protectoare directă contra mucegaiului sur al leguminoaselor (*Botrytis cinerea*; BCB)

Acesta este un test protector direct cu utilizarea pulverizării pe frunze. Plantele leguminoase (The Sutton) cu două perechi de frunze se pulverizează cu compusul testat în doză de 600 ppm., după cum este descris în a). După uscare, plantele se mențin timp de 24 ore în seră la temperatura de 20°C și umiditatea relativă de 40%. Apoi suprafața superioară a frunzelor se inoculează cu o suspensie apoasă, ce conține 1×10^6 conidii/ml. Plantele se mențin 4 zile la temperatura de 20°C într-o încăpere cu umiditate înaltă. Estimarea se efectuează conform indicelui în procente al suprafeței frunzei, afectate de boală, comparativ cu frunzele de control.

e) Activitatea contra pătării grâului (*Leptosphaeria nodorum*; LN)

Este un test terapeutic direct cu utilizarea pulverizării pe frunze. Germeții de grâu (Norman) în stadiul de o frunză se inoculează cu o suspensie apoasă, ce conține 1.5×10^6 conidii/ml. Plantele inoculate se expun pentru 24 ore la temperatura de 20°C într-o încăpere cu umiditate înaltă, cu pulverizarea ulterioară a compusului testat, după cum este descris în a). După uscare plantele se mențin 6-8 zile în seră la 22°C și umiditatea relativă 70%. Estimarea se efectuează după densitatea leziunilor pe frunză, comparativ cu leziunile frunzelor plantelor de control.

f) Activitatea in vitro contra pătrării grâului (Pseudocercospora herpotrichoides; PHI)

Acest test determină in vitro activitatea compușilor contra fungilor, care provoacă pătrarea grâului. Compusul testat se dizolvă sau se trece în suspensie în acetonă și se adaugă în alicote de câte 4 ml de bulion de dextroză de cartofi în jumătate de concentrație, plasate în cutii Petri cu 25 secții, obținându-se concentrația finală de compus testat cu 10 ppm. și 0.825% acetonă. Inoculatul fungic constă din fragmente de miceliu P. herpotrichoides, cultivate în bulion de dextroză de cartofi în jumătate de concentrație în baloane ce pot fi agitate, și se adaugă în bulion în cantitate de 5×10^4 fragmente de miceliu/ml bulion. Cutiile Petri se incubează la temperatura de 20°C pentru 10 zile până la estimarea creșterii miceliilor.

g) Activitatea contra Rhizoctonia in vitro (Rhizoctonia solani; RSI)

Prin acest test in vitro se determină activitatea compușilor contra Rhizoctonia solani, care provoacă putrezirea rădăcinii și a tulpinilor. Compusul testat se dizolvă și se adaugă în alicote de câte 4 ml de bulion de dextroză de cartofi în jumătate de concentrație, turnate în cutiile Petri cu 25 secții, obținându-se concentrația finală a compusului de 10 ppm. și 0.825% acetonă. Inoculatul fungic constă din fragmente de micelii R. solani, cultivate în bulion de dextroză de cartofi în jumătate de concentrație în baloane pentru culturi, și se adaugă în bulion în cantitate de 5×10^4 fragmente/ml bulion. Cutiile Petri se incubează la 20°C pentru 10 zile până la determinarea creșterii miceliului.

h) Activitatea contra rapănului mărlului in vitro (Venturia inaequalis; VII)

Prin acest test in vitro se determină activitatea compușilor contra Venturia inaequalis, care provoacă rapănul mărlului. Compusul testat se dizolvă și se trece în suspensie în acetonă și se adaugă în alicote de câte 4 ml de bulion de dextroză de cartofi în jumătate de concentrație, turnate în cutiile Petri cu 25 secții, obținându-se concentrația finală a compusului de 10 ppm. și 0.825% acetonă. Inoculatul fungic constă din fragmente de micelii și spori V. inaequalis, cultivați pe agar de malț și introduși în bulion în cantitate de 5×10^4 germeni/ml. Cutiile se incubează la temperatura de 20°C pentru 20 zile până la estimarea creșterii miceliului. Gradul de suprimare a bolii în toate testele menționate mai sus se exprimă ca indice în comparație cu obiectele netratate de control sau cu obiectele de control, tratate cu diluant, conform criteriilor:

0 = combaterea bolii în mai puțin de 50%,

1 = combaterea bolii în 50-80%,

2 = combaterea bolii în mai mult de 80%.

Rezultatele testelor sunt expuse în tabelul 3.

Tabelul 3

Exemplul nr.	PVA	PIP	AS	BCB	LN	PHI	RSI	VII
27			2	1			2*	2*
28		2	2	2		2*	2*	2*
29	1		1	2		2*	2*	2*
30			2	2		2*	2*	2*
31			1	2		2*	2*	2*
32		2	2	1		2*	2*	2*
33		2	2	2		2*	2*	2*
34		2	2			2	1	2
35		2			1	2	1	2
36		1				2	2	2
37			1	1		2		2
38				2		2	1	2
39		2				2		2
40		2	2	2		2	1	2
2		2		2	1	2		2

* înseamnă doza de compus testat = 30 ppm.

Exemplul 55

Determinarea valorilor CMI (concentrația minimă de inhibare) a compușilor contra diferiților fungi fitopatogeni

Valorile CMI se determină prin testele cu diluții în serie, utilizând placa de microtitrare cu 48 alveole. Diluția compușilor testați în soluție nutritivă și distribuirea în alveole este realizată de procesorul-robot TECAN RSP 5000.

Compușii se diluează până la următoarele concentrații : 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39, 0.20, 0.10 și 0.05 μg/ml.

Pentru prepararea soluției nutritive sucul V8 (marcă de comerț) se neutralizează cu carbonat de calciu și se centrifughează. Supernatantul se diluează cu apă distilată (1:5) până la concentrația finală. Fungii (Alternaria solani, Botrytis cinerea, Pseudocercospora herpotrichoides, Micronectriella nivalis, Gaeumannomyces graminis) se adaugă în alveole sub formă de picături de suspensie cu spori. Apoi plăcile de microtitrare se incubează la temperatura de 20°C pentru 6-8 zile. Valoarea CMI se definește ca cea mai joasă concentrație în seria de diluții fără creșterea miceliilor și se determină prin inspecția vizuală a plăcilor.

Rezultatele acestor teste sunt prezentate în tabelul 4.

Tabelul 4

Exemplul nr.	Valoarea CMI (ppm.)				
	Alternaria solani	Botrytis cinerea	Pseudocercospora herpotrichoides	Micronectriella nivalis	Gaeumannomyces graminis
1			25.0	1.56	3.13
3			6.25	0.78	0.20
6		>100.0			
9			12.5	0.78	0.10
11			3.13	0.39	0.20
13			>100.0	6.25	0.39
14			25.0	6.25	0.78
17			25.0	12.5	0.78
19			12.5	6.25	0.10
26			6.25	0.78	0.39
29			12.5	6.25	1.56
31			12.5	3.13	0.78
35			6.25	0.39	0.39
36			3.13	0.39	0.78
41	50.0	25.0			
42	>100.0	>100.0			
43	>100.0	>100.0			
44	>100.0	>100.0			

Exemplul 56

Determinarea concentrației minime inhibitoare de compuși testați în testul cu diluții în serie cu fungii fitopatogeni *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*.

Testul cu diluțiile în serie se efectuează cu utilizarea plăcilor de microtitrare cu 24 sau 48 alveole pe placă. Compușii testați se utilizează sub formă de suspensie apoasă 1000 µg/ml, cu un conținut de 20% acetonă, care apoi se sterilizează printr-un filtru de 0.2 µm. Diluția suspensiei fungicide sterile și picurarea ulterioară în alveole se efectuează cu procesorul-robot TECAN RSP 5000. Banda de valori ale concentrațiilor testate s-a stabilit de la 100 µg/ml până la 0.05 µg/ml. Se efectuează 12 diluții. Soluția nutritivă se selectează conform necesităților nutritive ale patogenului. Inoculatul se adaugă în alveole cu picătura (50 µl) de suspensie de spori (5×10^8 ml).

Estimarea

Peste 6-12 zile de incubare la temperaturi potrivite se estimează vizual valoarea CMI. Cea mai mică concentrație în şirul de diluții fără creșterea miceliului se determină ca valoarea CMI.

Rezultatele sunt expuse în tabelul 5.

Tabelul 5

Exemplul nr.	Valoarea CMI (ppm.)		
	Alternaria solani	Botrytis cinerea	Rhizoctonia solani
48	25.0	>100.0	>100.0
49	25.0	6.25	>100.0
50	12.5	25.0	100.0
51	12.5	12.5	25.0

Exemplul 57

Testarea în câmp cu *Cercospora arachidicola* a arahidelor

15 semințe de arahide se însămânțează în ghiveciuri umplute cu substrat de sol. Când pe plante se desfac 4 frunze adevărate (peste 12-14 zile după însămânțare), ele se tratează cu un pulverizator manual cu fungicide și compuși testați. Compușii testați se aplică în concentrație de 500 µg/ml în amestec, ce conține 10% acetonă și 0.05% de Triton×155 în apă. Cantitatea totală de amestec pulverizat constituie 1000 l/ha. Pentru tratare se utilizează 6 ghiveciuri. Peste 2 zile după tratare ghiveciurile se expun în câmp, alături de plantele de arahide, pe care fungii *Cercospora arachidicola* formează sectoare de sporulare. Estimarea se efectuează peste 15 zile după tratare prin determinarea procentului infectării suprafeței frunzei. Eficacitatea în procente se calculează utilizând formula Abbott.

Tratarea arahidelor în câmp cu *Puccinia arachidis*

15 semințe de arahide se însămânțează în ghiveciuri umplute cu substrat de sol. Când pe plante se desfac 4 frunze adevărate, ele se tratează cu un pulverizator manual, cu fungicide și compuși testați. Compușii testați se utilizează în concentrația de 500 µg/ml în amestec, ce conține 10% acetonă și 0.05% Triton×155 în apă. Cantitatea totală de amestec pulverizat constituie 1000 l/ha. Tratarea se repetă de 6 ori. Peste 2 zile după tratare ghiveciurile se expun în câmp alături de plantele, pe frunzele cărora fungii *Puccinia arachidis* formează pustule sporulante. Estimarea se efectuează peste 19 zile după tratare prin determinarea indicelui în procente al suprafeței infectate a frunzei. Eficacitatea în procente se calculează utilizând formula Abbott.

Rezultatele sunt expuse în tabelul 6.

Tabelul 6

Exemplul nr.	Procentul eficacității	
	<i>Puccinia arachidis</i>	<i>Cercospora arachidicola</i>
7	25	58
8	17	33
9	25	50
11	25	33
12	33	67
16	42	50
25	42	25
38	42	42