

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

Sunt cunoscute metode de apreciere a rezistenței culturilor cerealiere, inclusiv triticale, 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.

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 nedaturate 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].

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 ciuperca *Fusarium* sunt foarte contradictorii.

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

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

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

Metoda se efectuează în modul următor. În experiență se utilizează soiuri (genotipuri) de triticale 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.

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 umectată 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.

Exemplu. Boabele de triticale (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 lapte-țeară 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.

Tabel

Gradul de atacare ( $\bar{x}$ ) a plantelor de triticale 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 nedenate 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 triticale 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 umectată 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% coomassie albastru (R250) timp de 2 ore. Decolorarea gelului se efectuează în soluție de 7% acid acetic glacial. Fotografiera 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  $Rf=0,85-1,00$  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  $Rf=0,31$  la genotipul sensibil AD 206 și intensificarea puternică a benzii cu  $Rf=0,18$  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,  $t=6^\circ C$ ), cât și acțiunea comună a acestora (filtratul de cultură+ $t=6^\circ C$ ), 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 ( $Rf=0,31-0,53$ ) la soiul PRAG 3. Temperatura de  $6^\circ C$  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  $6^\circ C$ , cât și sub acțiunea comună a filtratului de cultură și a temperaturii  $6^\circ C$  s-au intensificat ușor benzile cu  $Rf=0,31-0,53$ . La soiul rezistent CAD 2/917, spre deosebire de soiul sensibil PRAG 3, acțiunea comună a filtratului de cultură și a temperaturii de  $6^\circ C$ , care mărește efectul primului a produs sinteza unei proteine noi cu  $Rf=0,19$  și a sporit substanțial sinteza proteinelor cu  $Rf=0,31-0,53$ , 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  $Rf=0,81-0,88$  și a fost identificată o creștere puternică a cantității de proteină ce corespunde benzii cu  $Rf=0,46$ .

Datele obținute permit de a concluziona că apariția sau intensificarea puternică a benzilor electroforetice sub acțiunea FC *Fusarium graminearum Schwabe* în limitele  $Rf=0,19-0,53$ , 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.

Fig. 1 - Influența filtratului de cultură (FC) al ciupercii *Fusarium graminearum Schwabe* asupra sintezei peroxidazelor în radicele de triticale

1, 2 - ADM 6 (martor, FC); 3,4 - AD 3/5 (martor, FC);

5, 6 - ADM 6 x AD 3/5 (martor, FC).

Fig. 2 - Sinteza peroxidazelor în radicele de triticale sub acțiunea FC al ciupercii *F. graminearum Schwabe*

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

Anexa 2

Fig. 3 - Electroforegrama proteinelor solubile în apă sintetizate în radicele de triticale în condiții optime și stresogene

1 - CAD 2/917; II - PRAG 3; 1 - martor; 2 - FC; 3 - t=6°C; 4 - FC + t=6°C; 5 - martor; 6 - FC; 7 - t=6°C; 8 - FC+ t=6°C.

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).