



MD 1261 G2

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) **1261** ⁽¹³⁾ **G2**
(51) **Int. Cl.⁷**: A 01 G 7/00;
A 01 H 1/04

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. depozit: 97-0295 (22) Data depozit: 1997.11.14	(43) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului pe răspunderea solicitantului: 1999.07.31, BOPI nr. 7/99
(71) Solicitant: Institutul de Genetică al Academiei de Științe a Republicii Moldova, MD	
(72) Inventatori: Lupascu Galina, MD; Barbacari Nicolae, MD; Cemertan Igor, MD; Ceban Doina, MD	
(73) Titular: Institutul de Genetică al Academiei de Științe a Republicii Moldova, MD	

(54) **Metodă de apreciere a rezistenței genotipurilor de triticale la fuzarioză**

(57) **Rezumat:**

1
Invenția se referă la agricultură și anume la genetica și ameliorarea plantelor și poate fi utilizată pentru estimarea rezistenței plantelor 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 la tratarea semințelor cu filtratul de cultură al ciupercii *Fusarium graminearum Schwabe*. Plantele de

2
triticale în radicele cărora s-au depistat proteine solubile în apă cu $R_f = 0,19 \dots 0,53$ sunt apreciate drept rezistente la fuzarioză.

5
Rezultatul invenției constă în sporirea exactității și veridicității metodei de apreciere a rezistenței genotipurilor de triticale la fuzarioză.

Revendicări: 1

10

MD 1261 G2

MD 1261 G2

3

Descriere:

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

5 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.

10 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 MgCl₂ 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 H₂O₂ 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].

20 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 ciuperci *Fusarium* sunt foarte contradictorii.

25 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.

30 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.

40 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.

45 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 lacteare 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.

55

MD 1261 G2

4

5

Tabel

Gradul de atacare (\bar{x}) a plantelor de triticales 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;

10 * - 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.

15 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 nedaturate 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 conține 0,01 M $MgCl_2$ și 0,25 M zaharoză în proporție de 1:8.

20 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.

25 Pentru analiza PSA materialul vegetal s-a pregătit în modul următor. Boabele de triticales 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 $t=-20^\circ C$.

35 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 μl 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.

40 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, 45 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%

MD 1261 G2

5

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.

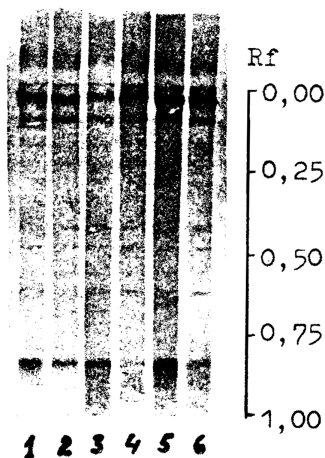
Analiza electroforetică a peroxidazei extrase din radicele de triticale tratate cu filtrat de cultură al ciupercii *Fusarium graminearum Schwabe* a demonstrat că nivelul de sinteză al acestor fermenți este diferit față de varianta de control. De exemplu, la soiul sensibil ADM 6, soiul rezistent AD 3/5 și hibridul ADM 6 x AD 3/5, rezistent la fuzarioză sinteza izoformelor cu $Rf=0,85\dots 1,00$ a scăzut indiferent de nivelul de rezistență a genotipurilor în toate variantele cu prezența filtratului de cultură. Intra-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, $t=6^{\circ}\text{C}$), cât și acțiunea comună a acestora (filtratul de cultură, $t=6^{\circ}\text{C}$), 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 ($Rf=0,31\dots 0,53$) la soiul PRAG 3. Temperatura de 6°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°C , cât și sub acțiunea comună a filtratului de cultură și a temperaturii de 6°C s-au intensificat ușor benzile cu $Rf=0,31\dots 0,53$. La soiul rezistent CAD 2/917, spre deosebire de soiul sensibil PRAG 3, acțiunea comună a filtratului de cultură și a temperaturii de 6°C , care mărește efectul primului a produs sinteza unei proteine noi cu $Rf=0,19$ și a sporit substanțial sinteza proteinelor cu $Rf=0,31\dots 0,53$, 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 $Rf=0,81\dots 0,88$ 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 $Rf=0,19\dots 0,53$, 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.



40

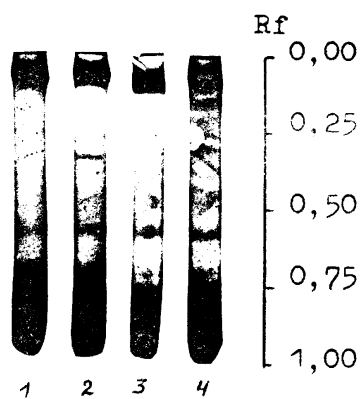
MD 1261 G2

6

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).

5

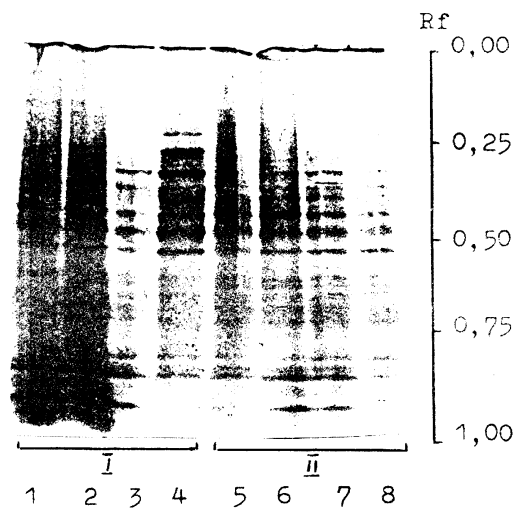
10



15

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).

20



25

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

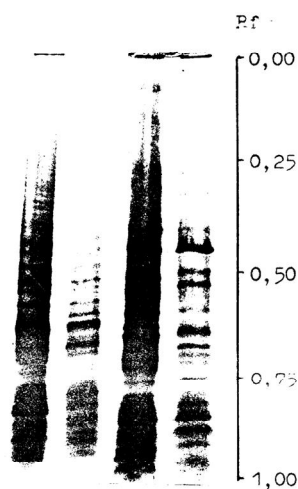
MD 1261 G2

7

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.

5

10



15

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).

20

(57) Revendicare:

Metodă de apreciere a rezistenței genotipurilor de triticale la fuzarioză care include analiza electroforetică a substanțelor proteice în radicele de triticale după tratarea semințelor cu filtrat de cultură al ciupercii *Fusarium graminearum Schwabe*, caracterizată prin aceea că se determină nivelul de sinteză a proteinelor solubile în apă în radicele de triticale și se apreciază ca rezistente plantele la care s-au depistat proteine solubile în apă cu coeficientul de repartiție al proteinelor în gel $R_f = 0,19 \dots 0,53$.

30

(56) Referințe bibliografice:

1. Bleich, A., Schiitzler, E., Schiitzler, G. Zum Auftreten von Krankheiten bei Triticale. Pflanzenschutz . DDR, 1989, v.43, N10, p.204
2. Сафонов, В.И., Сафонова, М.П. Исследование белков и ферментов растений методом электрофореза в полиакриламидном геле. Биохимические методы в физиологии растений, 1971, с.113-116.
3. Promega protocols and application guide (second edition), Promega corporation, 1991, 246 p.
4. Lupașcu, Galina. Identificarea genotipurilor de grâu, seară și triticale rezistente la fuzarioză, Chișinău, 1995, 96 p.

MD C2

8

Şef secție: CRASNOVA Nadejda

Examinator: BAZARENCO Tatiana

Redactor: ANDRIUȚĂ Victoria