



MD 1581 G2

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) **1581** ⁽¹³⁾ **G2**
(51) **Int. Cl.⁷**: A 01 H 1/04

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. depozit: 98-0247 (22) Data depozit: 1998.12.08	(43) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului pe răspunderea solicitantului: 2001.01.31, BOPI nr. 1/2001
(71) Solicitant: Institutul de Genetică al Academiei de Științe a Republicii Moldova, MD	
(72) Inventatori: LUPAȘCU Galina, MD; FANDEEV Elvira, MD; JACOTĂ Anatol, MD; BUIUCLI Petru, MD	
(73) Titular: Institutul de Genetică al Academiei de Științe a Republicii Moldova, MD	

(54) **Metodă de apreciere a rezistenței soiurilor de grâu și triticale la fuzarioză**

(57) **Rezumat:**

1
Invenția se referă la biotehnologia plantelor și poate fi utilizată la aprecierea rezistenței soiurilor de grâu și triticale la fuzarioză.

Esența invenției constă în faptul că rezistența soiurilor de grâu și triticale la fuzarioză se determină prin aprecierea frecvenței calusării embriogene pe mediu nutritiv Murashige-Skoog, suplimentat cu acid fuzaric în concentrație 0.05...0,01%, ca factor selectiv, iar ca rezistente sunt apreciate plantele la care frecvența calusării

2
5 embriogene pe acest mediu este egală cu 70,0...82,3%.

Rezultatul invenției constă în reducerea volumului de lucru și a termenului de apreciere a rezistenței soiurilor de grâu și triticale la fuzarioză.

10 Revendicări: 1
Figuri: 1

15

MD 1581 G2

MD 1581 G2

3

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologia plantelor și poate fi utilizată la aprecierea rezistenței culturilor cerealiere la fuzarioză.

Sunt cunoscute metode de estimare a rezistenței culturilor cerealiere, inclusiv grâu și triticale, la fuzarioză prin testarea lor timp de mai mulți ani pe fond de infecție sau în condiții naturale de câmp. Aceste metode, deși asigură rezultate obiective, au un șir de dezavantaje, dintre care cele mai principale sunt determinate de diferite operațiuni laborioase și timpul îndelungat pentru testare. În afară de aceasta, rezultatele aprecierii depind în mare măsură de condițiile climaterice ale anului: pe timp foarte rece sau secetos brunificarea sau necrozarea bazei tulpinii sunt mult mai pronunțate decât în condiții favorabile de dezvoltare a plantelor [1].

În ultimul timp pentru aprecierea rezistenței culturilor cerealiere la fuzarioză se propun diferite metode biotehnologice. Printre ele putem menționa aprecierea embrionilor imaturi de grâu și triticale pe mediu cu filtrat de cultură *Fusarium* sau toxine sintetice DON și NIV.

Dezavantajul acestui test constă în faptul că nu asigură corelații stabile între reacția embrionilor imaturi la metabolizii de *Fusarium* (filtrat de cultură, toxine pure) și atacarea plantelor de fuzarioză în condiții de câmp [2].

Astfel, problema pe care o rezolvă invenția este elaborarea unei metode rapide și eficiente de apreciere a rezistenței plantelor de grâu și triticale la fuzarioză.

Esența invenției constă în faptul că rezistența soiurilor de grâu și triticale se determină prin aprecierea frecvenței calusării embriogene pe mediu nutritiv Murashige - Skoog, suplimentat cu acid fuzaric în concentrație de 0.05...0,01%, ca factor selectiv, iar ca rezistente sunt apreciate plantele la care frecvența calusării embriogene pe mediu este egală cu 70...82,3%.

Rezultatul invenției constă în reducerea volumului de lucru și termenului de apreciere a rezistenței soiurilor de grâu și triticale la fuzarioză.

Metoda se realizează în modul următor.

În experiență se utilizează embrioni imaturi, cât și plante mature de grâu comun, grâu dur și triticale.

Aprecierea gradului de atacare în condiții de câmp se face în baza suprafeței brunificate sau necrozate de la baza tulpinii la etapa de coacere a plantelor.

În cadrul testărilor biotehnologice embrionii imaturi s-au plasat pe mediul Murashige-Skoog (MS), suplimentat cu filtrat de cultură (FC) *Fusarium oxysporum* - una din ciupercile cele mai virulente în patogeneza putregaiului de rădăcină fuzariotic, sau cu acid fuzaric. Calusarea embriogenă a fost evaluată la 21 zile de la plasarea embrionilor imaturi pe mediu.

Exemplu de realizare.

Soiurile de grâu comun, grâu dur și triticale se seamănă în câmp la sfârșitul decadei a 3-a din septembrie, câte 50 boabe în randuri de 1,5 m, distanța dintre ele - 40 cm, în 3 repetări. În perioada de coacere a boabelor (luna iunie) se estimează gradul de atacare a plantelor după scara de 5 grade (0 - imun; 0,1 - rezistent; 1 - rezistent mediu; 2 - sensibil; 3 - sensibil puternic). Aprecierea s-a făcut la 20-30 plante.

Filtratul de cultură *Fusarium oxysporum* s-a obținut prin cultivarea ciupercii timp de 14 zile în mediul Czapek modificat, care are următoarea compoziție (g): 2 NaNO₃; 1 KH₂PO₄; 0,5 MgSO₄ · 7H₂O; 0,5 KC1; 0,01 Fe₂(SO₄)₃ · 7H₂O; 20 zaharoză; până la 11 apă distilată [3].

Acidul fuzaric s-a obținut din FC în felul următor. FC se separă de miceliu prin filtrare, apoi se acidulează până la pH 3,5 cu soluție de acid clorhidric de HCl de 2N. Se adaugă butanol în proporția 1:5. Amestecul se agită în pâlnia de decantare timp de 10 min. După separarea straturilor fracția superioară butanolică se trece în vaporizator. Se produce distilarea până la obținerea precipitatului. Precipitatul se dizolvă în 0,2 ml H₂O sau C₂H₅OH, pentru obținerea acidului fuzaric în formă cristalină. FC se aduce la pH 4 cu soluție HCl de 2N, se agită minuțios cu etilacetat, luat în raport de 1:5. Amestecul se sedimentează în pâlnia de decantare, se separă etilacetatul și se evaporază. Precipitatul obținut se dizolvă într-o cantitate mică de apă, se alcalinizează cu bicarbonat de sodiu până la pH 8-8,5. Preparatul se purifică agitându-l prin scuturare de 2 ori, cu un volum înjumătățit de eter. După aceasta FC se separă, se acidulează din nou până la pH 4, se adaugă 5 volume de eter și din nou se agită minuțios prin scuturare. Eterul se toarnă în cești de evaporare. După evaporarea eterului se formează cristale de acid fuzaric de culoare roză.

La 14-16 zile de la polenizare s-au luat boabe de grâu și triticale, s-au sterilizat în soluție de 20% apă clorată filtrată timp de 20 min, s-au clătit de 3 ori în apă distilată, s-au prelevat embrionii și s-au plasat pe mediul MS, suplimentat cu FC sau acid fuzaric, câte 50 embrioni în 5 repetări.

Mediul MS are următoarea compoziție (g): 1,65 NH₄NO₃; 1,9 KNO₃; 0,44 CaCl₂ · 2H₂O; 0,37 MgSO₄ · 7H₂O; 0,17 KH₂PO₄; 0,00013 KI; 0,0062 H₃BO₃; 0,0223 MnSO₄ · 4H₂O; 0,0086 ZnSO₄ ·

MD 1581 G2

4

7H₂O; 0,00025 Na₂MgO₄ · 2H₂O; 0,000025 CuSO₄ · 5H₂O; 0,000025 CaCl₂ · 6H₂O; 0,028 FeSO₄ · 7H₂O; 0,0373 Na₂EDTA 2H₂O; 0,1 mezoinozită; 0,0005 acid nicotinic, 0,0005 piridoxină HCl; 0,0001 tiamină HCl; 0,002 glicină; 20 zaharoză, 8 agar.

În condiții *in vitro* inițial s-a analizat reacția a 7 soiuri de triticale la acțiunea FC și acidului fuzaric (tab.1). S-a constatat că FC în concentrația 5% provoacă stimularea calusării embriogene. O inhibare vădită a acesteia are loc în concentrațiile 10-20%, dar totodată s-a produs o stimulare puternică a creșterii rădăcinii și tulpinii, fapt determinat, probabil, de prezența substanțelor biologice active în FC. Concentrațiile 30 și 40% sunt prea inhibitoare pentru calusarea embriogenă și diferențiază greu genotipurile după sensibilitatea la FC. Acidul fuzaric în concentrațiile 5·10⁻³ și 1·10⁻²% a inhibat destul de puternic calusarea embriogenă, separând bine genotipurile după reacția la această toxină, ultimele 2 concentrații sunt prea puternice, făcând, astfel, imposibilă sau foarte redusă calusarea pentru unele genotipuri (M 371/86, AD 206, PRAG 3). Din cele expuse reiese că acidul fuzaric în concentrațiile 5·10⁻³, 1·10⁻²% este un factor de selecție bun pentru diferențierea genotipurilor de triticale după sensibilitatea la fuzarioză.

În baza rezultatelor obținute, în continuare s-a procedat la testarea calusării embriogene a unui set taxonomic de cereale mai larg - grâu comun, grâu dur și triticale pe mediu MS, suplimentat cu acid fuzaric (0,01%). Din cele prezentate în tab. 2 reiese că în condiții optime (variante martor) formele de triticale și cea de grâu dur au avut o capacitate morfogenetică mult mai înaltă decât cele de grâu comun. Sub acțiunea acidului fuzaric a scăzut puternic frecvența calusării la toate formele aflate în studiu, diferența de martor fiind cea mai mare la genotipurile Godreiforme 333 x Aisberg, Inghen 8 (16,8; 31,5%). O capacitate morfogenetică maximă în prezența acidului fuzaric au avut-o genotipurile de grâu comun și cele de triticale MAM 10/6 x Ciulpan (70,0-82,3% din martor).

După cum rezultă din datele prezentate în tab.3, în condiții naturale de câmp nivelul atacului de fuzarioză a variat destul de puternic - între 0,32 (MAM 10/6 x Ciulpan) și 2,30 (Gordeiforme 333 x Aisberg) grade.

Prin analiza corelațională s-a stabilit o dependență negativă puternică ($r = -0,737$) între rata calusării embriogene pe mediul cu acid fuzaric și gradul de atacare de fuzarioză a plantelor în condiții de câmp (fig. 1). Adică, cu cât sensibilitatea la fuzarioză în condiții de câmp este mai mare, cu atât capacitatea de calusare embriogenă pe mediu cu acid fuzaric în concentrație de 0,05...0,01% este mai mică. Cu alte cuvinte, acele genotipuri care posedă un grad înalt de calusare embriogenă pe mediu cu acid fuzaric sunt mai puțin atacate de fuzarioză.

Astfel, capacitatea de calusare embriogenă poate servi drept metodă de apreciere a rezistenței culturilor de grâu și triticale la fuzarioză.

Tabelul 1

Acțiunea filtratului de cultură a ciupercii *F.oxysporum* și acidului fuzaric asupra calusării embriogene la triticale

Genotip	Martor	Filtrat de cultură, %					Acid fuzaric, %			
		5	10	20	30	40	5·10 ⁻³	1·10 ⁻²	1,5·10 ⁻²	2·10 ⁻²
AD 113	91,5	93,1	73,1	56,0	15,1	0	74,1	58,7	45,1	1,2
CAD 2/917	62,5	64,8	48,3	32,7	12,5	1,2	58,1	49,7	31,4	6,4
M 371/86	78,0	80,4	61,4	48,7	14,6	0	63,1	52,3	28,6	0
AD 1365	98,0	98,6	56,8	40,5	18,7	3,1	83,4	65,8	44,9	1,3
AD 206	28,6	35,5	15,6	12,3	8,7	0	21,8	12,6	3,4	0
PRAG 3	68,9	70,3	26,4	14,3	4,6	0	61,3	55,7	16,7	0
CP 3	100,0	98,5	81,3	61,4	19,4	2,6	94,5	79,8	48,5	1,5

MD 1581 G2

5

Tabelul 2

Frecvența calusării embriogene în cultura embrionilor imaturi de grâu și triticales (a 21 zi)

NN Genotipul	Martor (MS)			Acid fuzaric (0,01%)			% față de martor
	$\bar{X} \pm m_{\frac{-}{x}}$, grad	S	V,%	$\bar{X} \pm m_{\frac{-}{x}}$, grad	S	V,%	
<u>Grau comun</u>							
1. Moldovenesc	32,58±2,86	8,16	8,8	22,80±2,91	24,14	4,9	70,0
2. Bălți 5 x Odeschii 117	18,56±1,64	135,51	62,7	13,95±3,55	30,76	39,8	75,2
3. Bălți 5 x Codreanca	15,31±4,34	18,60	28,2	12,27±4,49	30,19	44,8	80,1
<u>Grau dur</u>							
4. Gordeiforme 333 x Aisberg	62,25±5,80	249,58	25,4	10,45±2,01*	36,15	57,5	16,8
<u>Triticale</u>							
5. Inghen 8	72,76±2,05	1565,96	63,5	22,89±4,31*	160,78	24,7	31,5
6. MAM 10/6 x Ciulpan	62,34±3,51	81,93	12,4	51,33±2,68	28,20	23,2	82,3
7. (6TA 502 x CAD 2) x AD verde	53,80±4,33	69,43	15,5	27,64±3,31*	39,85	22,8	51,4
8. AD 1467 x Bocolo	50,60±3,14	124,18	22,0	27,93±1,14*	66,23	29,1	55,2

* - deosebire distinctă de martor la nivelul de 5%

Tabelul 3

Nivelul atacului fuzariozei în condiții de câmp asupra unor forme de grâu și triticales (1977)

Denumirea genotipului	$\bar{X} \pm m_{\frac{-}{x}}$, grad	S	V,%
<u>Grau comun</u>			
1. Moldovenesc	0,55±0,10	0,21	83,9
2. Bălți 5 x Odeschii 117	0,46±0,10	0,20	98,3
3. Bălți 5 x Codreanca	1,65±0,11	0,24	29,7
<u>Grau dur</u>			
4. Gordeiforme 333 x Aisberg	2,30±0,11	0,22	20,4
<u>Triticale</u>			
5. Inghen 8	1,40±0,11	0,25	35,9
6. MAM 10/6 x Ciulpan	0,32±0,09	0,16	-
7. (6TA 502 x CAD 2) x AD verde	1,20±0,09	0,17	34,2
8. AD 1467 x Bocolo	1,15±0,08	0,13	31,9

MD 1581 G2

6

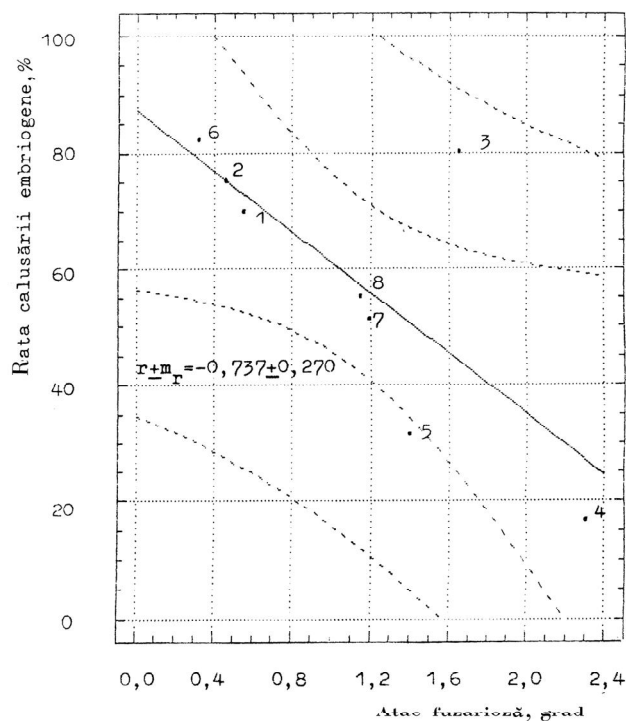


Fig. 1. Dependența corelațională între rata calusării embriogene pe mediu cu acid fuzaric (0,01%) și nivelul de atac al plantelor de grâu și triticale de fuzarioză în condiții de câmp (1977)

(57) Revendicare:

Metodă de apreciere a rezistenței soiurilor de grâu și triticale la fuzarioză prin aprecierea frecvenței calusării embriogene pe mediu nutritiv Murashige-Skoog, suplimentat cu filtrat de cultură *Fusarium oxysporum* ca factor selectiv, **caracterizată prin aceea că** în calitate de factor selectiv în mediul nutritiv se adaugă acid fuzaric în concentrație de 0,05...0,01%, iar ca rezistente sunt apreciate plantele la care frecvența calusării embriogene pe acest mediu este egală cu 70,0...82,3%.

(56) Referințe bibliografice:

1. Lupașcu G. Identificarea genotipurilor de grâu, secară și triticale rezistente la fuzarioză. Chișinău, 1995, 96 p.
2. Ittu M., Hagima I., Moraru I., Răducanu F. Reacția unor genotipuri de grâu și triticele la toxine, filtrate de cultură și culturi de *Fusarium*. Testarea *in vivo* și relația între rezultatele obținute *in vivo* și *in vitro*. Probl. genet. teor. aplic., 1995, vol. XXVII, n.1, p. 1-14.
3. Методы экспериментальной микологии (справочник). Киев. Наукова думка, 1982, 550 с.

Examinator:

ROJNEVSCHI Maria

Redactor:

ANDRIUȚĂ Victoria