



MD 2716 G2 2005.03.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **2716** ⁽¹³⁾ **G2**
(51) **Int. Cl.**⁷: A 01 N 43/08, 43/12,
45/00;
A 01 C 1/06;
C 07 J 71/00

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. depozit: a 2004 0087 (22) Data depozit: 2004.04.13	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2005.03.31, BOPI nr. 3/2005
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE GENETICĂ AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD	
(72) Inventatori: LUPAȘCU Galina, MD; SAȘCO Elena, MD; MASCENCO Natalia, MD; CHINTEA Pavel, MD	
(73) Titular: INSTITUTUL DE GENETICĂ AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD	

(54) **Antistresant pentru grâul comun de toamnă**

(57) **Rezumat:**

1
Invenția se referă la agricultura și poate fi aplicată la cultivarea grâului comun de toamnă în condiții nefavorabile.

In calitate de antistresant pentru graul comun de toamnă se propune soluția apoasă de extract sumar

2
5 de glicozide steroidice din semințe de *Trigonella foenum graecum* L. cu concentrația de 10^{-5} ... 10^{-3} %.

Rezultatul constă în sporirea rezistenței complexe a graului comun de toamnă la fuzarioză și temperatură scăzută.

Revendicări: 1

10

MD 2716 G2 2005.03.31

Descriere:

Invenția se referă la agricultura și poate fi aplicată la cultivarea grâului comun de toamnă în condiții nefavorabile.

5 Este cunoscut faptul că fuzarioza radiculară prezintă unul din factorii biotici stresanți pentru creșterea și dezvoltarea culturilor cerealiere spicoase, din care face parte și grâul comun de toamnă. Se cunoaște, de asemenea, că dezvoltarea fuzariozei radiculare este favorizată de factori abiotici (inclusiv termici) stresanți și că există o corelație strânsă pozitivă între rezistența la fuzarioză și temperatură joasă. Stresul produs de fuzarioza plantelor cerealiere spicoase se manifestă printr-un șir de particularități fiziologice, inclusiv prin micșorarea bruscă a unor factori importanți, așa ca
10 conținutul de hidroxiprolină și pigmenți fotosintetici, ceea ce conduce la slăbirea plantulelor. În legătură cu cele menționate, este necesară aplicarea unor exoinductori ai rezistenței complexe (antistresanți) la fuzarioză și temperatură joasă pentru plantele de grâu.

Este cunoscută utilizarea substanțelor biologic active, și anume a glicozidei steroidice Moldstim în calitate de antistresant la fuzarioză și temperatură scăzută [1]. Dezavantajul acestui antistresant pentru grâu constă în aceea că nu prezintă efect stabil la acțiunea temperaturii scăzute.

15 Problema pe care o rezolvă invenția constă în sporirea gradului de rezistență a plantelor de grâu comun de toamnă la condițiile nefavorabile, în particular la fuzarioză și temperatură joasă, la etapa ontogenetică de maximă vulnerabilitate – germinație-plantulă.

Problema se soluționează prin aceea că pentru sporirea rezistenței complexe a plantelor de grâu la fuzarioză și temperatură scăzută se propune soluția apoasă de extract sumar de glicozide steroidice (GSS) izolate din semințe de *Trigonella foenum-graecum L.* cu concentrația de 10^{-5} ... 10^{-3} %.

Noutatea invenției constă în utilizarea GSS izolate din semințe de *Tr.foenum-graecum L.* pentru sporirea rezistenței complexe la fuzarioză și temperatură scăzută a plantelor de grâu comun de toamnă la etapa timpurie de dezvoltare.

25 Rezultatul invenției constă în sporirea rezistenței complexe a grâului comun de toamnă la fuzarioză și temperatură scăzută. Preparatul este de proveniență naturală, ieftin și larg accesibil. Procedul de obținere a GSS din semințe de *Tr.foenum-graecum L.* este descris în Kiyosava S., Huton M. Detection of prototype compounds of diosgenin and other spirostanol glycosids. Chem. pharm. Bull., 1968, v. 16, p. 1162-1164.

30 Este cunoscută utilizarea extractului sumar din semințe de *Tr.foenum-graecum L.* pentru cultivarea materialului săditor al culturilor pomicele (MD 2319 F 2003.12.31). Însă GSS din semințe de *Tr.foenum-graecum* nu au fost cercetate și utilizate în calitate de antistresant pentru culturi agricole.

Exemplu

35 Au fost utilizate GSS din semințe de *Tr.foenum-graecum L.* obținute prin metoda de percolare pe coloana cu Al_2O_3 , utilizând în calitate de eluent sistemul de solvenți cloroform-metanol în raportul 8:2 (părți de volum) pentru purificarea de substanțe balaste. Frațiile ce conțin GSS au fost amestecate, evaporate până la uscare în distilatorul rotativ în vid și recristalizate din soluția de 80% de etanol apos. Analiza în strat subțire (cromatografierea în strat subțire pe placa „Silufol”, sistemul de solvenți 1) a demonstrat prezența a 8 glicozide steroidice majore în urma revelării plăcilor cu H_2SO_4 concentrat și reactivul Sanie. Caracteristica fizico-chimică a GSS este următoarea: substanță cu
40 cristale mici, de culoare gălbuie, bine solubilă în soluții apoase de alcooli cu greutate moleculară mică, amestecuri de solvenți ai cloroformului, alcoolilor și apei în diverse raporturi. Glicozidele steroidice sumare sunt higroscopice, temperatura de topire se află în intervalul 102...134°C; spectrul IF conține benzi de absorbție la $\lambda=852, 900, 922, 987 \text{ cm}^{-1}$. Cromatograma în strat subțire conține 8
45 glicozide steroidice majore.

Pentru prepararea mediului nutritiv Cszapek s-au dizolvat în apă distilată, mg/L: KNO_3 – 2000; KH_2PO_4 – 1000; $MgSO_4$ – 500; KCl – 500; $FeSO_4$ – 10; zaharoză – 20000, volumul aducându-se până la 1 L. Mediul dat a fost sterilizat prin autoclavare timp de 20 min la 0,5 atm. În condiții aseptice în mediu a fost introdus miceliul ciupercii *F.oxysporum*, provocatoare a putregaiului de rădăcină la
50 grâul comun de toamnă. Cultivarea ciupercii s-a produs în termostat la temperatura de 22...24°C timp de 21 de zile (Методы экспериментальной микологии. Киев, Наукова думка, 1982, p. 296), astfel obținându-se filtrat cultural (FC) al ciupercii *F.oxysporum* care a fost separat de miceliul ciupercii prin hartie de filtru.

În calitate de material de cercetare au servit soiurile de grâu comun de toamnă Cubani 101 x
55 Auriu și Moldova x Moldova 3, testate în condiții de laborator. Conform variantelor cercetate semințele de grâu au fost muiate timp de 18 ore în apă distilată (martor) și soluții apoase ale GSS de *Tr.foenum-graecum* în concentrațiile 10^{-2} ... 10^{-6} %, iar pentru Moldstim (analog de structură) s-au utilizat soluțiile apoase cu eficiență maximă, și anume cele de 10^{-4} ... 10^{-3} %. Boabele s-au cultivat timp de 6 zile în vase Petri, pe hârtie de filtru umectată cu apă distilată (martor) sau FC. Experimentul a

MD 2716 G2 2005.03.31

4

fost efectuat în 3 repetări câte 40 boabe în fiecare. Au fost studiați indicii de creștere: lungimea rădăcinii embrionare și lungimea tulpiniței (mm).

Rezultatele au fost prelucrate statistic în pachetul de soft STATISTICA (SUA). Veridicitatea deosebirilor între variante a fost supusă testului t. Datele sunt prezentate în tabelele 1...4.

- 5 După cum rezultă din datele prezentate, FC *F. oxysporum* a diminuat considerabil creșterea rădăcinii și a tulpiniței la ambele soiuri de grâu comun în condiții de temperatură diferite. Astfel, la soiul Cubani 101 x Auriu în condiții termice suboptimale (14...16°C) lungimea rădăcinii și lungimea tulpiniței s-au micșorat cu 39,0% și respectiv cu 33,1%, iar la soiul Moldova x Moldova 3 – cu 48,4% și respectiv 33,1%. În condiții termice nefavorabile (4...6°C) acțiunea FC asupra creșterii rădăcinii și tulpiniței a fost mai puternică (cu o singură excepție). Astfel, la soiul Cubani 101 x Auriu lungimea rădăcinii și lungimea tulpiniței au diminuat cu 51,3% și respectiv cu 53,9%, iar la soiul Moldova x Moldova 3 – cu 44,7% și respectiv cu 44,8%. Aceasta denotă că acțiunea asociată a FC și temperaturii de 4...6°C are influență reprimantă mai puternică asupra creșterii grâului. Tratarea boabelor cu GSS (10⁻⁵...10⁻³%) și cu Moldstim (10⁻⁴, 10⁻³%) a condus la sporirea creșterii rădăcinii și a tulpiniței la soiul Cubani 101 x Auriu la temperatura de 14...16°C. Pentru soiul Moldova x Moldova 3 s-a constatat că la această temperatură toate variantele cu glicozide steroidice au fost eficiente în sporirea rezistenței la acțiunea FC *F. oxysporum*. În ceea ce privește efectele GSS asupra creșterii grâului la temperatura de 4...6°C s-a constatat că la soiul Cubani 101 x Auriu tratarea boabelor cu GSS în concentrațiile 10⁻⁴, 10⁻³% a contribuit la sporirea creșterii rădăcinii cu 28,6% și respectiv cu 20,2%, în comparație cu varianta FC. Concentrația 10⁻⁴% de GSS a avut efect pozitiv și asupra creșterii tulpiniței, sporind lungimea acesteia cu 35,9% în comparație cu varianta FC.

Tabelul 1

- 25 Acțiunea GSS din *Trifolium-graecum* și Moldstimului asupra creșterii grâului comun de toamnă (soiul Cubani 101 x Auriu) în condiții termice suboptimale (14...16°C)

Nr d/r	Varianta, concentrația (%)	Lungimea rădăcinii, mm			Lungimea tulpiniței, mm		
		x±m _x	% față de martor	% față de FC	x±m _x	% față de martor	% față de FC
1	Martor	102,9±3,1	100,0	163,9	74,3±2,1	100,0	149,5
2	FC <i>F.oxysporum</i>	62,8±1,5*	61,0	100,0	49,7±1,4*	66,9	100,0
3	FC + GSS, 10 ⁻⁶	62,0±1,7*	60,2	98,7	48,9±1,6*	65,8	98,4
4	FC +GSS, 10 ⁻⁵	71,0±2,1 ^{*v}	71,0	113,1	59,4±1,5 ^{*v}	79,9	119,5
5	FC+GSS, 10 ⁻⁴	95,1±1,9 ^v	92,4	151,4	71,8±1,1 ^v	96,6	144,5
6	FC +GSS, 10 ⁻³	85,4±1,8 ^{*v}	83,0	136,0	63,6±1,3 ^{*v}	85,6	128,0
7	FC +GSS, 10 ⁻²	67,5±1,5*	65,6	107,5	56,3±1,5*	75,8	113,3
8	FC +Moldstim, 10 ⁻⁴	98,8±2,2 ^v	96,0	157,3	72,5±1,5 ^{*v}	97,6	145,9
9	FC +Moldstim, 10 ⁻³	82,8±2,4 ^{*v}	80,5	131,8	62,1±2,0 ^{*v}	83,6	125,0

* - suport statistic al testului t în raport cu martorul;

v – suport statistic al testului t în raport cu FC *F. oxysporum* la nivel de 5%.

MD 2716 G2 2005.03.31

5

Tabelul 2

Acțiunea GSS din *Tr.foenum-graecum* L. și a Moldstimului asupra creșterii grâului comun de toamnă (soiul Cubani 101 x Auriu) în condiții termice nefavorabile (4...6°C)

5

Nr. d/r	Varianta, concentrația (%)	Lungimea rădăcinii, mm			Lungimea tulpiniței, mm		
		$x \pm m_x$	% față de martor	% față de FC	$x \pm m_x$	% față de martor	% față de FC
1	Martor	100,5±2,4	100,0	205,5	70,7±1,4	100,0	216,9
2	FC <i>F.oxysporum</i>	48,9±1,4*	48,7	100,0	32,6±1,0*	46,1	100,0
3	FC +GSS, 10 ⁻⁶	51,8±1,1*	51,6	105,9	35,6±0,5*	50,4	109,2
4	FC +GSS, 10 ⁻⁵	50,3±0,9*	50,0	102,9	34,3±0,5*	48,5	105,2
5	FC +GSS, 10 ⁻⁴	62,9±1,4* ^v	62,6	128,6	44,3±0,9* ^v	62,7	135,9
6	FC +GSS, 10 ⁻³	53,9±1,1* ^v	53,6	110,2	35,2±0,7*	49,8	108,0
7	FC +GSS, 10 ⁻²	47,0±1,0*	46,8	96,1	32,7±1,0*	46,2	100,3
8	FC +Moldstim, 10 ⁻⁴	49,7±1,1*	49,4	101,6	34,9±0,6*	49,4	107,1
9	FC +Moldstim, 10 ⁻³	52,8±1,1* ^v	52,5	108,0	38,0±0,7* ^v	53,7	116,6

* - suport statistic al testului *t* în raport cu martorul;

v- suport statistic al testului *t* în raport cu FC *F.oxysporum* la nivel de 5%.

Tabelul 3

10 Acțiunea GSS din *Tr.foenum-graecum* L. și a Moldstimului asupra creșterii grâului comun de toamnă (soiul Moldova x Moldova 3) în condiții termice suboptimale (14...16°C)

Nr d/r	Varianta, concentrația (%)	Lungimea rădăcinii, mm			Lungimea tulpiniței, mm		
		$x \pm m_x$	% față de martor	% față de FC	$x \pm m_x$	% față de martor	% față de FC
1	Martor	98,5±2,7	100,0	193,9	75,1±1,8	100,0	163,6
2	FC <i>F.oxysporum</i>	50,8±1,4*	51,6	100,0	45,9±1,2*	66,9	100,0
3	FC +GSS, 10 ⁻⁶	64,1±1,5* ^v	65,1	126,2	55,5±1,2* ^v	65,8	120,9
4	FC +GSS, 10 ⁻⁵	66,3±1,1* ^v	67,3	130,5	54,1±0,9* ^v	79,9	117,9
5	FC +GSS, 10 ⁻⁴	79,2±2,2* ^v	80,4	155,9	64,7±1,4* ^v	96,6	141,0
6	FC +GSS, 10 ⁻³	71,8±1,7* ^v	72,9	141,3	60,0±1,1* ^v	85,6	130,7
7	FC +GSS, 10 ⁻²	60,5±1,4* ^v	61,4	119,1	56,0±1,2* ^v	75,8	122,0
8	FC +Moldstim, 10 ⁻⁴	80,3±1,6* ^v	81,5	158,1	65,3±1,3* ^v	97,6	142,3
9	FC +Moldstim, 10 ⁻³	68,3±1,6* ^v	69,3	134,5	60,5±1,3* ^v	83,6	131,8

* - suport statistic al testului *t* în raport cu martorul;

v – suport statistic al testului *t* în raport cu FC *F.oxysporum* la nivel de 5%.

Tabelul 4

15 Acțiunea GSS din *Tr.foenum-graecum* L. și a Moldstimului asupra creșterii grâului comun de toamnă (soiul Moldova x Moldova 3) în condiții termice nefavorabile (4...6°C)

Nr. d/r	Varianta, concentrația (%)	Lungimea rădăcinii, mm			Lungimea tulpiniței, mm		
		$x \pm m_x$	% față de martor	% față de FC	$x \pm m_x$	% față de martor	% față de FC
1	Martor	81,7±2,4	100,0	180,8	61,2±1,2	100,0	181,1
2	FC <i>F.oxysporum</i>	45,2±1,3*	55,3	100,0	33,8±0,7*	55,2	100,0
3	FC +GSS, 10 ⁻⁶	39,0±1,2*	47,7	86,3	28,3±0,9*	46,2	83,7
4	FC +GSS, 10 ⁻⁵	43,0±0,8*	50,0	88,5	31,7±0,7*	51,8	93,8
5	FC +GSS, 10 ⁻⁴	55,0±1,2* ^v	49,0	121,7	40,9±1,0* ^v	66,8	121,0
6	FC +GSS, 10 ⁻³	43,5±1,0*	50,8	91,8	33,3±0,6*	54,4	98,5
7	FC +GSS, 10 ⁻²	43,3±1,0*	53,0	95,8	32,6±0,4*	53,3	96,5
8	FC +Moldstim, 10 ⁻⁴	49,3±0,6* ^v	60,3	109,1	39,3±0,6* ^v	64,2	116,3
9	FC +Moldstim, 10 ⁻³	47,4±1,1*	58,0	104,9	39,9±1,0* ^v	65,2	118,0

MD 2716 G2 2005.03.31

6

* - suport statistic al testului **t** în raport cu martorul;

v- suport statistic al testului **t** în raport cu FC *F. oxysporum* la nivel de 5%.

5 La soiul Moldova x Moldova 3 a avut efect pozitiv concentrația $10^{-4}\%$ de GSS, contribuind la creșterea rădăcinii și a tulpiniței cu 21,7% și respectiv cu 21,0% în raport cu varianta FC.

10 Deci, tratarea boabelor de grâu comun de toamnă cu soluții apoase ($10^{-5}\dots 10^{-3}\%$) de glicozide steroidice sumare din *Tr. foenum-graecum L.* conduce la sporirea rezistenței plantelor la acțiunea asociată a ciupercii *F. oxysporum* și temperaturii scăzute de 4...6°C la etapa de germinație-plantă juvenilă, prin sporirea creșterii rădăcinii embrionare și a tulpiniței, ceea ce denotă caracterul antistresogen al GSS din *Tr. foenum-graecum L.*

15

(57) Revendicare:

Aplicarea soluției apoase de extract sumar de glicozide steroidice din semințe de *Trigonella foenum graecum L.* cu concentrația de $10^{-5}\dots 10^{-3}\%$ în calitate de antistresant pentru graul comun de toamnă.

20

(56) Referințe bibliografice:

1. RU 2069940 C1 1996.12.10

Director Departament:

CRECETOV Veaceslav

Examinator:

GUȘAN Ala

Redactor:

LOZOVANU Maria