



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2008 00243

(22) Data de depozit: 31.03.2008

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: 30.01.2012 BOPI nr. 1/2012

(41) Data publicării cererii:  
30.09.2009 BOPI nr. 9/2009

(73) Titular:  
• INSTITUTUL DE  
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU  
PROTECȚIA PLANTELOR,  
BD. ION IONESCU DE LA BRAD NR. 8,  
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:  
• OANCEA FLORIN, STR.PAȘCANI NR.5,  
BL. D7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:  
US 7041678 B2; CHEN Z.-Y., BROWN R.L.,  
DAMANN K.E., CLEVELAND T.E.,  
"IDENTIFICATION OF MAIZE KERNEL  
ENDOSPERM PROTEINS ASSOCIATED  
WITH RESISTANCE TO AFLATOXIN  
CONTAMINATION BY ASPERGILLUS  
FLAVUS", PHYTOPATHOLOGY NO.9,  
VOL.97, pp.1094-1103, 2007  
THE AMERICAN PHYTOPATHOLOGICAL  
SOCIETY

(54) **PROCEDEU DE SCREENING AL REZISTENȚEI LINIILOR DE  
PORUMB LA CONTAMINAREA CU AFLATOXINE ÎN TIMPUL  
VEGETAȚIEI**

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la un procedeu de selecție preliminară (screening) a rezistenței liniilor de porumb din punctul de vedere al rezistenței la contaminarea cu aflatoxine în timpul vegetației, destinat utilizării în activitatea de ameliorare a culturilor de porumb. Procedeu conform invenției include etapele de măcinare fină a boabelor analizate, extracția totală a proteinelor în tampon citrat pH = 5,5, în raport de 1 parte boabe de porumb la 5 părți tampon, timp de 1 h, separarea extractului de material vegetal prin centrifugare timp de 20 min, la 6000 x g, sterilizarea extractului de boabe prin ultrafiltrare, depunerea aseptică a 0,02 ml extract

sterilizat prin filtrare la suprafața unui godeu de 1 ml dintr-o placă de 24 godeuri, în care se află 0,5 ml dintr-un mediu de cultură gelificat, inocularea axenică a mediului gelificat ce conține extractul proteic cu 0,01 ml suspensie de spori de ciuperci aflatoxigene, incubarea timp de 3 zile la 25°C, urmată de examinarea intensității fluorescenței formate la o lungime de undă de excitație de 350...360 nm și la o lungime de undă de citire de 450...460 nm.

Revendicări: 1



# RO 123387 B1

1 Inventția se referă la un procedeu de selecție preliminară (screening) a liniilor de  
porumb din punctul de vedere al rezistenței la contaminarea cu aflatoxine în timpul vegetației  
3 și este destinat utilizării în activitatea de ameliorare a porumbului.

5 Deși aflatoxinele sunt cei mai periculoși contaminanți biologici ai alimentelor, iar  
porumbul este foarte susceptibil la infecția cu ciuperci aflatoxigene oportuniste din grupul  
7 *Aspergillus section flavi* (mai ales în cursul perioadelor secetoase și călduroase), nu s-au  
realizat încă hibridi comerciali de porumb rezistenți la contaminarea cu aflatoxine, până în  
9 prezent fiind identificate numai câteva linii rezistente ale căror caracteristici agronomice nu  
sunt satisfăcătoare. Întrucât testele de câmp sunt extrem de laborioase și lente, este  
necesară dezvoltarea unor procedee de screening rapid a diferitelor linii de porumb pentru  
11 identificarea în cadrul liniilor care prezintă caracteristici agronomice bune pe cele care sunt  
(potențial) rezistente.

13 Cererea de brevet **US 200500119306** (ca și brevetele **US 7041678** și **US 6825216**  
pe care le perfecționează) descrie un procedeu de screening al materialului vegetal care  
15 conține compuși inhibitori pentru promotorii sintezei micotoxinelor. Acest procedeu de  
screening utilizează cromatografia în strat subțire combinată cu un procedeu de biodeve-  
17 lopare în care sunt folosite mutante transgenice de ciuperci toxigene, cu gena promotor  
pentru sinteza micotoxinelor asociată unei gene raportor p-glucozidază. În cazul porumbului,  
19 rezistența la contaminarea cu aflatoxine în timpul vegetației nu este asociată însă unor  
compuși cu masă moleculară mică, separabili prin cromatografie în strat subțire, ci unor  
21 proteine din bobul de porumb (Chen, Z.Y., Brown, R. L., Damann, K.E., Cleveland, T.E.,  
**2007, Identification of maize kernel endosperm proteins associated with resistance to**  
**23 aflatoxin contamination by Aspergillus flavus**, *Phytopathology*, **97**: 1094-1103; Chen,  
Z.Y., Brown, R. L., Rajasekaran, K., Damann, K.E., Cleveland, T.E., **2006, Identification**  
**25 of a maize kernel pathogenesis-related protein and evidence for its involvement in**  
**resistance to Aspergillus flavus infection and aflatoxin production**, *Phytopathology*,  
**27 96**: 87-95). Pentru screening-ul materialului vegetal din liniile de porumb, este deci necesară  
dezvoltarea unui procedeu prin care să se pună în evidență aceste proteine inhibitoare din  
29 interiorul bobului de porumb.

31 Problema tehnică pe care o rezolvă invenția de față este stabilirea unui test rapid,  
pretabil la lucrul în serie mare, prin care să se poată realiza diferențierea certă a liniilor de  
porumb care au un în interiorul bobului un conținut ridicat de compuși proteici inhibitori ai  
33 dezvoltării ciupercilor aflatoxigene și/sau al producerii de aflatoxine.

35 Procedeu de screening al rezistenței liniilor de porumb la contaminarea cu aflatoxine  
în timpul vegetației, conform invenției, înlătură dezavantajele menționate mai sus, pentru că  
este alcătuit din următoarele etape: măcinarea fină a boabelor analizate; extracția totală a  
37 proteinelor din boabele de porumb în tampon citrat pH 5,5, în raport de 1 parte boabe la  
5 părți tampon, timp de 1 oră; separarea extractului de materialul vegetal extras prin centri-  
39 fugare timp de 20 min, la 6.000 x g; sterilizarea prin ultrafiltrare a extractului din boabe; depu-  
nerea aseptică a 0,02 ml extract sterilizat prin filtrare la suprafața unui godeu de 1 ml dintr-o  
41 placă de 24 godeuri, în care se află 0,5 ml dintr-un mediu de cultură gelificat constituit din  
0,45...0,55 părți K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,45...0,55 părți MgSO<sub>4</sub>, 0,25...0,3 părți complex zinc:gelatin-  
43 peptonă 1:12, 0,25...0,3 părți peptonă, 0,45...0,55 părți extract de drojdie, 28...32 părți  
zaharoză, 2,8...3,2 părți dimetil-β-ciclodextrină, 0,048...0,052 părți cloramfenicol,  
45 0,00018...0,0022 părți dichloran, 16...18 părți agar, 2...2,4 părți iota-caragenan, apă distilată  
până la 1000 părți, părțile fiind exprimate în greutate; inocularea axenică a mediului gelificat  
47 și cu extract proteic cu 0,01 ml de suspensie de spori de ciuperci aflatoxigene, suspensie cu

# RO 123387 B1

un conținut de spori de  $10^7$  spori per ml; incubarea timp de 3 zile, la 25°C a mediului de cultură gelificat care conține extract proteic din boabele analizate și spori de ciuperci aflatoxigene; examinarea la un fluorimetru cu cititor de plăci cu 24 de godeuri a intensității fluorescenței formate, la o lungime de undă de excitare de 350...360 nm și la o lungime de undă de citire de 450...460 nm.

Prin aplicarea invenției, se obțin următoarele avantaje:

- evidențierea rapidă a liniilor de porumb ale căror boabe conțin în endosperm compuși (proteici) macromoleculari cu capacitate ridicată de inhibare a creșterii și/sau producerii de aflatoxine de către ciupercile aflatoxigene;

- posibilitatea utilizării oricăror tulpini de ciuperci aflatoxigene (inclusiv a celor izolate din arealul de testare ulterioară a rezistenței liniilor de porumb în câmp) datorită mediului de cultură folosit, care asigură producerea sporită de aflatoxine de către toate tulpinile aflatoxigene (pentru că acest mediu are un conținut ridicat de zinc și de prolină/hidroxi-prolină, compuși care stimulează exprimarea genelor implicate în biosinteza aflatoxinelor și care rezultă din metabolizarea complexului zinc-gelatin-peptonă sub acțiunea exo-proteazelor produse de ciupercile cultivate pe mediu agarizat);

- exprimarea cantitativă a nivelului de inhibare a producerii de aflatoxine de către compușii inhibitori prezenți în boabele de porumb (mediul de cultură utilizat amplifică fluorescența aflatoxinelor, reducerea acestei fluorescențe față de o probă martor tratată numai cu apă distilată sterilă în loc de extract proteic total sterilizat este o expresie cantitativă a efectului inhibitor);

- posibilitatea lucrului în serie, pe mai multe linii deodată și în mai multe repetiții, datorită utilizării plăcilor cu godeuri.

Se dă, în continuare, un exemplu de realizare a invenției.

**Exemplu.** Se iau câte 20 g boabe de porumb din 7 linii de porumb consanguinizate, care au caracteristici agronomice bune. Boabele se usucă în curent de aer cald la 50...60°C și se macină fin într-o râșniță de cafea. Din măcinișul boabelor din fiecare linie se cântăresc la balanța tehnică câte 5 g de porumb, care se aduc fiecare separat în câte un erlenmayer de 100 ml în care se amestecă cu 25 ml de tampon citrat pH 5,5. În fiecare erlenmayer cu amestec măciniș-tampon citrat se introduce câte o bară de agitare magnetică. Se pun erlenmayerele pe un agitator magnetic cu mai multe posturi și se mențin sub agitare timp de 1 oră. Amestecul de material vegetal și tampon citrat se trece în tuburi de centrifugă de 50 ml, care se echilibrează două câte două și se supun apoi centrifugării timp de 20 min, la 6.000 x g. Din supernatant se iau 0,1 ml în care se determină proteina totală prin metoda biuretului. Restul de supernatant se sterilizează prin ultrafiltrare pe filtre microbiologice. Din fiecare supernatant filtrat se iau aseptice câte 0,02 ml de extract sterilizat, care se depun aseptice la suprafața unui godeu de 1 ml dintr-o placă de 24 godeuri, în care se află 0,5 ml dintr-un mediu de cultură gelificat. Fiecare linie se lucrează în trei repetiții. În cele trei godeuri care mai rămân pe placă se depun 0,02 ml tampon citrat steril.

Fiecare godeu cu mediul gelificat și cu extract proteic (sau martor tampon citrat) se inoculează axenic cu 0,01 ml suspensie conținând  $10^7$  spori de ciuperci aflatoxigene per ml. Se acoperă placa și se incubă timp de 3 zile, la 25°C. După 3 zile se citește intensitatea fluorescenței godeurilor la un fluorimetru cu cititor de plăci cu 24 de godeuri (de exemplu LB 970, Berthold Technologies). Se lucrează la o lungime de undă de excitare de 355 nm și la o lungime de undă de citire a fluorescenței de 460 nm. Intensitatea fluorescenței formate se raportează la cea a martorului cu tampon citrat, iar raportul se normalizează în funcție de conținutul proteic total determinat pentru fiecare extract.

# RO 123387 B1

1           Mediul gelifiat de mai sus se prepară după cum urmează: într-un flacon erlenmayer  
de 500 ml gradat se introduc pe rând 0,05 g  $K_2HPO_4$ , 0,5 g  $MgSO_4$ , 0,025 g complex  
3 zinc:gelatin-peptonă 1:12, 0,025 g peptonă, 0,5 g extract de drojdie, 3 g zaharoză, 0,3 g  
dimetil-p-ciclodextrină, 1,8 g agar, 0,2 g iota-caragenan, cântărite cu precizie analitică. Se  
5 adaugă 90 ml apă distilată. Se încălzește la fierbere până la dizolvarea completă a tuturor  
ingredientelor și apoi se menține pe baie de apă la 55...60°C. Peste soluția menținută la 55°C  
7 se adaugă 5 ml dintr-o soluție apoasă 0,1% de cloramfenicol (masă/volum) și 0,1 ml dintr-o  
soluție alcoolică (20% alcool etilic în apă, volum/volum) de 0,2% (masă/volum) dichloran. Se  
9 verifică pH-ul care trebuie să fie de  $6,3 \pm 0,2$ . Se corectează dacă este nevoie cu soluții de  
KOH 1N sau  $H_2SO_4$  1N. Se aduce volumul final la 1000 ml, se astupă paharul erlenmayer  
11 cu dop de vată, și apoi se autoclavează la 121°C, timp de 30 min. Mediul autoclavat se  
răcește și apoi se lichefiază prin încălzire pe baie de apă. Mediu lichefiat se distribuie aseptice  
13 în godeurile plăcii cu 24 de godeuri, câte 1 ml per godeu și se așteaptă să se răcească.

15           Dimetil- $\beta$ -ciclodextrina folosită în mediul de mai sus a provenit de la Fluka, CAS  
Number: 51166-71-3.

17           Complexul zinc:gelatin-peptonă 1:12 utilizat în mediul de mai sus se prepară după  
cum urmează: 8,14 g de oxid de zinc (Sigma Aldrich de puritate farmaceutică USP) se  
omogenizează cu 500 ml apă distilată. În omogenat se adaugă 16,2 g de gelatin-peptonă  
19 (Laboratoarele Conda, cat. 1606) și se încălzește pe baie de apă cu reflux până la  
solubilizarea totală a oxidului de zinc (datorită formării complexului zinc - aminoacizi/peptide).  
21 Complexul zinc a fost considerat în mod arbitrar ca fiind 1:12, luându-se în calculul  
stoichiometric o valoare medie de 135 pentru masa moleculară a aminoacizilor. Chelatul  
23 zinc-gelatin-peptonă format prin procedeul de mai sus a fost uscat prin pulverizare, într-un  
atomizor de laborator Niro Minor Unit, la o temperatură de intrare de 140...150°C și la o  
25 temperatură de ieșire de 80...90°C.

Procedeu de selecție preliminară al rezistenței liniilor de porumb la contaminarea cu aflatoxine în timpul vegetației, <b>caracterizat prin aceea că</b> este alcătuit din următoarele etape: măcinarea fină a boabelor analizate; extracția totală a proteinelor din boabele de porumb în tampon citrat pH 5,5, în raport de 1 parte boabe la 5 părți tampon timp de 1 h; separarea extractului de materialul vegetal extras prin centrifugare timp de 20 min la 6.000 x g; sterilizarea prin ultrafiltrare a extractului din boabe; depunerea aseptică a 0,02 ml extract sterilizat prin filtrare la suprafața unui godeu de 1 ml dintr-o placă de 24 godeuri, în care se află 0,5 ml dintr-un mediu de cultură gelificat, constituit din 0,45...0,55 părți $K_2HPO_4$ , 0,45...0,55 părți $MgSO_4$ , 0,25...0,3 părți complex zinc:gelatin-peptonă 1:12, 0,25...0,3 părți peptonă, 0,45...0,55 părți extract de drojdie, 28...32 părți zaharoză, 2,8...3,2 părți dimetil- $\beta$ -ciclodextrină, 0,048...0,052 părți cloramfenicol, 0,00018...0,0022 părți dichloran, 16...18 părți agar, 2...2,4 părți iota-caragenan, apă distilată până la 1000 părți, părțile fiind exprimate în greutate; inocularea axenică a mediului gelificat și cu extract proteic cu 0,01 ml de suspensie de spori de ciuperci aflatoxigene, suspensie cu un conținut de spori de $10^7$ spori per ml; incubarea timp de 3 zile, la 25°C, a mediului de cultură gelificat care conține extract proteic din boabele analizate și spori de ciuperci aflatoxigene; examinarea la un fluorimetru cu cititor de plăci cu 24 de godeuri a intensității fluorescenței formate, la o lungime de undă de excitație de 350...360 nm și la o lungime de undă de citire de 450...460 nm.	3
	5
	7
	9
	11
	13
	15
	17
	19

