



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2016 00807

(22) Data de depozit: 09/11/2016

(41) Data publicării cererii:  
30/05/2018 BOPI nr. 5/2018

(71) Solicitant:  
• TESO SPEC S.R.L., STR. MUNCII NR. 53,  
PARTER, FUNDULEA, CL, RO

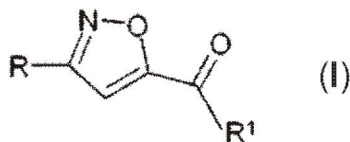
(72) Inventatori:  
• GEORGESCU FLORENTINA,  
STR. INDEPENDENȚEI NR.5, BL.6, SC.A,  
AP.7, RÂMNICU-VÂLCEA, VL, RO;  
• GEORGESCU EMILIAN,  
STR. INDEPENDENȚEI NR. 5, BL. 6, SC. A,  
AP. 7, RÂMNICU-VÂLCEA, VL, RO;  
• OANCEA ANCA OLGUȚA, STR. PAȘCANI  
NR. 5, BL. D7, SC. E, AP. 45, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO;

• VLĂDULESCU LUCIAN- CONSTANTIN,  
STR. ELEFTERIE NR. 31, AP. 1, SECTOR 5,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• VLĂDULESCU CONSTANTIN- MARIUS,  
STR. VORONEȚ NR. 3, BL. D4, SC. 1, ET. 1,  
AP. 5, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;  
• OPRIȚA IULIA ELENA,  
STR. VALEA IALOMIȚEI NR. 6, BL. C10,  
ET. 9, AP. 184, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,  
RO;  
• TUDORA CĂTĂLINA,  
DRUMUL MURGULUI NR.4, BL.C 4, SC.5,  
ET.4, AP.59, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,  
RO;  
• ISTRATE GEORGETA,  
STR. THEODOSIE RUDEANU NR. 3,  
BL. 1C, SC. 3, ET. 2, AP. 79, SECTOR 1,  
BUCUREȘTI, B, RO

(54) COMPUȘI INDUCTORI DE OXID NITRIC ÎN ȚESUTURI  
VEGETALE, ȘI PROCEDEU DE UTILIZARE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la compuși inductori de oxid nitric în țesuturi vegetale, și la un procedeu de utilizare a acestora în tratamentul unor plante de cultură. Compușii conform invenției au o structură de izoxazol 3,5-disubstituit cu formula (I)



în care R este o grupare 3,4-metilendioxifenil sau 2-tienil, iar R<sup>1</sup> este o grupare carbometoxi, carboetoxi, fenil sau fenil substituit cu grupări atrăgătoare de electroni. Procedeu conform invenției constă în tratamentul culturilor de varză, eventual, grâu, conopidă, tomate sau castraveți, în doze de 2...7,5 g/ha, respectiv, concentrații de 4...30 mg/l compuși inductori de oxid nitric, aplicați în norme de 200...500 l suspensie conținând adjuvanți uzuali.

Revendicări: 3



6/6

## COMPUȘI INDUCTORI DE OXID NITRIC ÎN ȚESUTURI VEGETALE ȘI PROCEDEU DE UTILIZARE

Invenția se referă la compuși inductori de oxid nitric care induc în țesuturile vegetale sinteza unor nivele optime de oxid nitric și specii reactive de oxigen, determinând activarea mecanismelor de apărare a plantelor față de stresurile biotice și abiotice și mărirea eficienței de utilizare a nutrienților, precum și la un procedeu de utilizare a acestor inductori în tratamentul unor plante de cultură.

Sunt cunoscuți compuși care determină creșterea nivelului de oxid nitric în țesuturile vegetale. Oxidul nitric (NO) este o moleculă semnal primordială, care este comună pentru țesuturile vegetale (Besson-Bard et al. 2008, *Annual Review of Plant Biology*, 59, 21-39), animale (Bredt & Snyder, 1994, *Annual Review of Biochemistry*, 63, 175-195) și în comunitățile de microorganisme de tip biofilm (McDougald et al 2012, *Nature Reviews Microbiology*, 10, 39-50). Deși este evident faptul că oxidul nitric are rol major în activarea sistemului de apărare din plante împotriva stresurilor biotice (Bellin et al. 2013, *Molecular Plant - Microbe Interactions*, 26, 271-277) și abiotice (Fancy et al. 2016, *Plant, Cell & Environment*, doi: 10.1111/pce.12707), ca și în echilibrarea metabolismului și a dezvoltării plantelor (Homen, et al. 2013, *New Phytologist*, 197, 1035-1038), inclusiv prin reglarea homeostaziei asimilării unor nutrienți (Frunghillo et al. 2016, *Advances in Botanical Research*, 77, 55-78), numărul de compuși cunoscuți că putând să genereze oxid nitric în țesuturile plantelor este limitat - de ex. nitroprusiat de sodiu (Mur et al. 2005, *Plant Physiology*, 138, 1247-1258), *S*-nitrosoglutation (Ederli et al. 2009, *Plant Physiology and Biochemistry*, 47, 42-48), *S*-nitroso-*N*-acetilpenicilamina (Mur et al, 2013. *AoB PLANTS*, 5, 1-17) sau dietilamine-NONOate (Keefer et al. 1996, *Methods in Enzymology*, 268, 281-293).

Beneficiile agrotehnice ale inducerii oxidului nitric în țesuturile vegetale au condus inclusiv la realizarea unor combinații în care se utilizează săruri ale acidului nitros (nitriți / azotiți), ca sursă de oxid nitric în țesuturile vegetale. Cererea de brevet WO2006010896 A1 descrie o compoziție care include uree, nitrit de sodiu (NaNO<sub>2</sub>), în concentrații mai mici de 2 mM, de preferat între 200 și 500 μM, și acid ascorbic, în concentrații mai mici de 2 mM, de preferat între 200 și 500 μM. Compoziția preferată, care include 200 μM NaNO<sub>2</sub> și 100 μM acid ascorbic, este aplicată pe plante anuale, de preferat leguminoase, respectiv fasole, și pe plante perene, de preferat viță-de-vie, înainte de înflorire și în timpul înfloririi, până la fructificare, ca și după recoltare. Scopul aplicării respectivei compoziții este limitarea fenomenelor de cădere a florilor și a fructelor, stimularea formării mugurilor florali și prelungirea perioadei de depozitare a fructelor.

Dezavantajul tuturor compușilor cunoscuți până în prezent ca inductori de oxid nitric în țesuturile vegetale este determinat de dificultatea asigurării unor doze cu efecte repetabile, care să

determine formarea unor nivele de oxid nitric optime. Formarea oxidului nitric este asociată unor reacții redox care induc și specii reactive de oxigen, în final generându-se și peroxinitrit, ONOO<sup>-</sup> (Yu et al. 2014, *New Phytologist*, 202, 1142-1156). Pentru realizarea funcției fiziologice majore, de orchestrare a mecanismelor din țesuturile vegetale implicate în răspunsul la factorii de stres biotici și abiotici, dezvoltarea echilibrată și asimilarea eficientă a nutrienților, este necesar ca stresul nitrosativ, rezultat ca urmare a formării ONOO<sup>-</sup>, să fie menținut la nivele fiziologice, pentru a permite nu numai S-nitrozilarea enzimelor din cascada reglatoare de fosfataze / kinaze, ci și de-nitrozilarea acestora (Zaffagnini et al. 2016, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1864, 952-966).

Implicarea oxidului nitric în reglarea a numeroase căi metabolice determină și numeroase interferențe. Unele dintre aceste interferențe, cum sunt cele dintre oxidul de azot și speciile reactive de oxigen (Arora et al. 2016, *Free Radical Research*, 50, 291-303), sau dintre oxidul nitric și asimilarea azotatului (Thalineau et al. 2016, *Frontiers in Plant Science*, 7, 742), sunt implicit legate de formarea peroxinitritului din oxid nitric și specii reactive de oxigen sau, respectiv, a oxidului nitric din azotați / azotiți sub acțiunea nitrat reductazei. Alte interferențe sunt datorate disonanțelor metabolice ale oxidului nitric cu alte molecule semnal din țesuturile vegetale, ca de ex. cu ioni Ca<sup>2+</sup> în reglarea intra-celulară (Besson-Bard et al. 2008, *Molecular Plant*, 1, 218-228) sau cu acidul abscisic în reglarea stomatelor (García-Mata & Lamattina, 2002, *Plant Physiology*, 128, 790-792). Toate aceste disonanțe metabolice fac ca orice deviere de la nivelul fiziologic optim de oxid nitric indus în țesuturile vegetale să genereze efecte neașteptate, deseori opuse celor dorite. Este cunoscut faptul că majoritatea inductorilor de oxid nitric determină și fenomene negative, în special datorită inducerii unui exces de oxid nitric și specii reactive de oxigen. A fost semnalată acțiunea unor inductori de oxid nitric în producerea unor defecte ale plantelor, ca de ex. în meristemele radiculare (Fernandez-Marcos et al. 2011, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 108, 18506–18511) sau chiar a unor fenomene fito-toxice. Aceași concentrație limită de nitriți, de 2 mM, utilizată în cererea de WO2006010896 A1 pentru a genera nivele fiziologice de reducere a căderii florilor / fructelor, este revendicată de cererea de brevet US 20100129474 A1 ca având efect toxic, fungicid, în special datorită producerii unui nivel de oxid nitric care blochează respirația celulară și fosforilarea oxidativă la nivelul mitocondriilor din ciupercile fitopatogene. Același mecanism de toxicitate la oxidul nitric a fost evidențiat și la nivelul mitocondriilor din plante (Yamasaki, et al. 2001, *Nitric Oxide*, 5, 261-270). Fenomenele de toxicitate sunt datorate și faptului că unii dintre compușii utilizați ca inductori de oxid de azot în țesuturile vegetale generează și cianuri (Wang et al. 2002, *Chemical Reviews*, 102, 1091–1134 și Bethke et al. 2006, *Journal of Experimental Botany*, 57, 517–526).

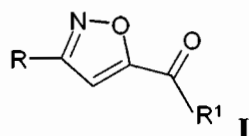
Este necesară deci dezvoltarea unor compuși inductori de oxid nitric în celulele vegetale care să determine formarea continuă, în concentrații limitate, fiziologic optime, a oxidului nitric și, eventual, a speciilor reactive de oxigen. Astfel de compuși au fost sugerați ca putând fi din clasa derivaților de izoxazol 3,5-disubstituiți, prin descrierea efectelor NUBS-4190, 3,5-difluorofenil-[3-metil-4-(metilsulfonil)izoxazol-5-il]-metanona, compus care induce rezistența împotriva fungilor patogeni *Phytophthora infestans* în *Nicotiana benthamiana*, acționând ca modulator al reacției de hipersensibilitate, inclusiv prin modularea speciilor reactive de oxigen și a oxidului nitric în țesuturile vegetale (Monjil et al. 2013, *Nitric Oxide*, 29, 34–45).

Sunt cunoscuți numeroși derivați izoxazolici 3,5-disubstituiți, utilizați pentru controlul paraziților animalelor (Gibbons, 1973, Brevet US 3781438; Hass et al. 1975, Brevet US 3879532) sau pentru inhibarea acțiunii IL-8, ca medicamente anti-inflamatorii (Schwab et al. 1998, Brevet US 5814627) sau în terapia bolilor autoimune (Weidner-Wells et al, 2003, US 6579880), precum și procedee pentru obținerea lor. Utilizarea derivaților izoxazolici 3,5-disubstituiți în tratamentul plantelor nu este însă descrisă în literatura de brevete și nu sunt revendicați compuși cu astfel de structură ca având capacitatea de a induce sinteza de oxid nitric și/sau specii reactive de oxigen în țesuturile vegetale.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a descrie noi compuși izoxazolici 3,5-disubstituiți, care induc sinteza fiziologic-optimă de oxid nitric și specii reactive de oxigen în țesuturile vegetale, determinând mărirea toleranței plantelor la stresurile biotice și abiotice, precum și creșterea eficienței de utilizare a azotului.

Este un alt obiect al acestei invenții de a descrie un procedeu de utilizare a acestor compuși, în doze / concentrații bine precizate, pentru tratamentul plantelor de cultură, în amestec realizat în proporții bine stabilite, cu adjuvanți de stropire și, eventual, cu agenți de protecție a țesuturilor vegetale împotriva eventualelor efecte negative ale inductorilor de oxid nitric.

Compușii inductori de oxid de azot în țesuturile vegetale conform invenției, sunt reprezentați prin formula generală I:



în care:

R este o grupă 3,4-metilendioxfenil, sau 2-tienil, iar R<sup>1</sup> este o grupă alchil C1-C4, carboxi sau carbometoxi, fenil sau fenil substituit cu alchil, alcoxi, halogen, nitro, sau fenil mono-, di- sau tri-substituit cu radicali alchil, alcoxi, halogen, nitro, etc.

Procedeul de utilizare a compușilor inductori de oxid nitric cu formula generală I, conform invenției, implică tratamentul culturilor de varză pentru creșterea eficienței de utilizare a azotatului, cu doze de 2-4 g/ha, corespunzătoare unor concentrații de 4-20 mg/l compuși inductori de oxid nitric, aplicați în norme de 200 - 500 litri suspensie cu 1% adjuvanți de stropire pentru 1 ha, sau tratamentul unor culturi de grâu, varză, conopidă, tomate sau castravete, pentru mărirea toleranței plantelor la stresurile biotice și abiotice, în doze de 3-7,5 g/ha, corespunzătoare unor concentrații de 12-30 mg/l compuși inductori de oxizi nitric, aplicați în norme de 200-250 litri suspensie, care conțin și 1% adjuvanți de stropire pentru 1 ha, și, opțional, 0,25 g/l glicin-betaină, ca agent de protecție a țesuturilor vegetale împotriva eventualelor efecte secundare negative ale inductorilor de oxid nitric.

Stresurile biotice și abiotice pentru care compușii inductori de oxid nitric măresc toleranța plantelor tratate sunt temperaturile scăzute pentru plantule de grâu, putregaiul alb produs de *Sclerotinia sclerotiorum* la varză, stresul hidric la conopidă și tomate, stresul salin la castraveți.

Adjuvanți de stropire folosiți în cadrul procedurii de utilizare de mai sus sunt din categoria celor cunoscuți, ca de ex. cei pe bază de esteri etilici ai acizilor grași și alte ingrediente naturale, care mențin compușii în suspensie și favorizează absorbția lor lentă prin sistemele amfifile specifice frunzelor plantelor (Vladulescu et al. 2012, EP 2777394 A1, Istrate et al. 2014, Cerere de brevet RO 2014 00576). Orice alt adjuvant de stropire cu caracteristici similare, necesare menținerii în suspensie a inductorilor de oxid nitric și preluării foliare, pot fi folosiți în cadrul procedurii de utilizare a compușilor inductori descriși conform invenției.

Activitatea compușilor cu formula generală I conform invenției s-a stabilit prin determinarea speciilor de oxigen reactive (ROS) și determinarea oxidului nitric eliberat în țesuturile vegetale ale plantelor test prin testele specifice de fluorescență (Kolbert et al. 2012, *Acta Biologica Szegediensis* 2012, 56 (1), 37-41).

Avantajele utilizării compușilor inductori de oxid nitric conform invenției sunt:

- Sunt relativ ușor de sintetizat, în cantități semnificative și la un preț de cost relativ scăzut, datorită condițiilor blânde de lucru și datorită unor materii prime accesibile.

- Sunt compuși stabili în timp în condiții normale de temperatură și presiune.

- Sunt ușor de dozat și de utilizat în amestecuri cu alți compuși activi și diferiți aditivi agricoli.

- Au o activitate biologică largă, protejând plantele față de stresuri biotice și abiotice și măbind eficiența nutrienților.

În continuare se prezintă exemple nelimitative de realizare a invenției.

*Exemplu 1.* Sintezele compușilor inductori de oxid de azot în țesuturi vegetale se realizează după cum urmează:

*3-(3,4-Metilendioxfenil)-5-acetilsoxazol Ia*

Clorură de 3,4-metilendioxi-benzencarboximidoil (2 g, 10 mmol), obținută din 3,4-metilendioxi-benzaldehidă și clorhidrat de hidroxilamină urmată de tratarea oximei 3,4-metilendioxi-benzaldehidei cu *N*-clorosuccinimidă, și 3-butin-2-onă (0,75 g, 11 mmol) s-au dizolvat într-un vas de reacție cu 60 mL de amestec *tert*-BuOH:H<sub>2</sub>O 1:1, apoi s-au adăugat CuI (0,04 g) și s-a adăugat în porțiuni, sub agitare, KHCO<sub>3</sub> (4,33 g, 43,3 mmol). Amestecul de reacție s-a agitat încă o oră la temperatura camerei, s-a diluat cu apă, s-a filtrat solidul format și s-a recristalizat din CHCl<sub>3</sub>/MeOH obținând-se 3-(3,4-metilendioxfenil)-isoxazol-5-acetil **Ia** (2,31 g, randament: 92 %) sub formă de cristale aciculare de culoare alb-gălbui cu p.t. = 159-160 °C. IR (KBr, ν): 3116, 2916, 1690, 1609, 1577, 1499, 1465, 1440, 1362, 1289, 1243, 1205, 1121, 1034, 959, 929, 870, 818, 690, 622, 587, 528 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H RMN (400,1 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 2,64 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 6,04 (s, CH<sub>2</sub>), 6,89 (1H, d, *J* = 8 Hz, H-5'), 7,11 (1H, s, H-4), 7,29 (1H, dd, 8 Hz, *J* = 1,7 Hz, H-6'), 7,34 (1H, d, *J* = 1,6 Hz, H-7'). Analiza elementară pentru C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>4</sub> (231,20): calculat: C 62,34 %, H 3,92 %, N 6,06 %; găsit: C 62,29 %, H 3,02 %, N 6,10 %.

*3-(3,4-Metilendioxfenil)-isoxazol-5-carboxilat de etil Ib*

Din clorură de 3,4-metilendioxi-benzencarboximidoil (2 g, 10 mmol) și propiolat de etil (1,08 g, 11 mmoli) s-a obținut, în modul descris pentru compusul **Ia**, 3-(3,4-metilendioxfenil)-isoxazol-5-carboxilat de etil **Ib** (2,06 g, randament: 79 %) sub formă de solid de culoare alb-gălbui, cu p.t. = 96-98 °C. IR (KBr, ν): 3131, 2906, 1740, 1630, 1588, 1488, 1449, 1391, 1308, 1254, 1161, 1109, 1037, 999, 935, 873, 806, 771, 511 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H RMN (400,1 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ, ppm): 1,43 (3H, t, *J* = 7 Hz, CH<sub>3</sub>), 4,45 (2H, q, *J* = 7 Hz, CH<sub>2</sub>-Et), 6,04 (s, CH<sub>2</sub>), 6,90 (1H, d, *J* = 8 Hz, H-5'), 7,16 (1H, s, H-4), 7,30 (1H, d, *J* = 8 Hz, H-6'), 7,34 (1H, s, H-7'). Analiza elementară pentru C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>5</sub> (261,23): calculat: C 59,77 %, H 4,24 %, N 5,36 %; găsit: C 59,70 %, H 4,29 %, N 5,40 %.

*3-(2-Tienil)-isoxazol-5-carboxilat de etil Ic*

Clorură de 2-tiofencarboximidoil (1,62 g, 10 mmol), obținută din tiofen-2-carbaldehidă și clorhidrat de hidroxilamină urmată de tratarea oximei tiofen-2-carbaldehidei cu *N*-clorosuccinimidă, și propiolat de etil (1,08 g, 11 mmoli) s-au dizolvat într-un vas de reacție cu 60 mL de amestec *tert*-BuOH:H<sub>2</sub>O 1:1, apoi s-au adăugat CuI (0,04 g) și s-a adăugat în porțiuni, sub agitare, KHCO<sub>3</sub> (4,33 g, 43,3 mmol). Amestecul de reacție s-a agitat încă o oră la temperatura camerei, s-a diluat cu apă, s-a filtrat solidul format și s-a recristalizat din CHCl<sub>3</sub>/MeOH obținând-se 3-(2-tienil)-isoxazol-5-carboxilat de etil **Ic** (1,5 g, randament: 67 %) sub formă de solid de culoare alb-gălbui, cu p.t. = 78-80 °C. IR (KBr, ν): 1728, 1546, 1463, 1366, 1289, 1236, 1131, 1110, 1015

cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (400.1 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ, ppm): 1.47 (3H, t, 7.1 Hz, CH<sub>3</sub>), 4.49 (2H, t, 7.1 Hz, CH<sub>2</sub>), 7.17 (1H, t, 4.1 Hz, H-3'), 7.20 (1H, s, H-4), 7.50 (1H, d, 4.7 Hz, H-4'), 7.54 (1H, d, 3.1 Hz, H-2'). Analiza elementară pentru C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>3</sub>S (223.25): calculat: C, 53.80 %; H, 4.06 %; N, 6.27 %; găsit: C, 53.77 %; H, 4.0 %; N, 6.31 %.

*Exemplu 2.* Determinarea producerii speciilor oxigenate reactive (ROS) în țesuturile vegetale ca urmare a tratamentelor cu compuși obținuți conform exemplului 1 s-a realizat conform celor prezentate mai jos.

Suspensiile folosite pentru stropirea foliară a plantelor test *Arabidopsis thaliana* conțin: 0,1 mg și respectiv 5 mg inductor de oxid nitric **Ia-Ic**, 1-2 mL etanol, 0,5 g Tween 20, polietilenglicol sorbitan monolaurat cu 20 unități de etilenoxid, (de la Sigma Aldrich), 1g adjuvant de stropire (de la SC Teso Spec SRL, cu compoziția următoare: 30,9 % esteri etilici ai acizilor grași din uleiuri vegetale, 6 % glicerină, 34,2 % carboxilați de potasiu, 11,2 % etanol, 5 % lecitină, 10 % emulgator neionic, 2,7 % substanțe nesaponificabile) și apă demineralizată pentru 100 ml suspensie apoasă de inductor. Suspensiile de inducitori obținute au fost păstrate în vase de sticlă brune, la întuneric, la temperatura camerei.

Plantele test *A. thaliana*, tipul sălbatic (Columbia) au fost crescute în module Arasystem (Betatech, Gent, Belgia), separat fiecare, conform indicațiilor producătorului, pe mediul hidroponic propus de Gibeaut et al. 1997 (*Plant Physiology* 115, 317), cu următoarea formulă 25 mM KNO<sub>3</sub>; 1,50 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; 0,75 mM MgSO<sub>4</sub>; 0,50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 50 μM KCl; 50 μM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 10 μM MnSO<sub>4</sub>; 2,0 μM ZnSO<sub>4</sub>; 1,5 μM CuSO<sub>4</sub>; 0,075 μM (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>, 0,1 mM Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> și 72 μM Fe-chelatat, pentacetat de dietilenetriamină (6HL, Valagro, Atessa, Italia). Plantele au fost menținute în cameră climatică la 23±2°C, la un regim lumină – întuneric 16 / 8 ore, cu intensitate luminoasă redusă (75 μE/m<sup>2</sup>/s) în timpul perioadelor de iluminare. Plantele de *A. thaliana* de 6 săptămâni, la începutul formării rozetelor, au fost tratate cu inductorii de oxid nitric. Tratamentul s-a realizat prin stropire foliară (1 ml suspensie pe fiecare plantă). După 24 ore de la stropire au fost recoltate frunze de la plantele test și prelucrate pentru microscopie de fluorescență, în vederea evidențierii ROS.

Prezența ROS a fost pus în evidență folosind fluorocromul H<sub>2</sub>DCFA (diacetat de 2',7'-diclorodihidrofluoresceină). Fragmentele foliare au fost spălate cu apă distilată și incubate cu 2,5 μM H<sub>2</sub>DCFA (soluție stoc 10 mM în DMSO) (de la Invitrogen, Molecular Probes), 30 de minute, la întuneric, la temperatura camerei. Apoi, fragmentele foliare au fost spălate de trei ori cu apă distilată și vizualizate (emisie 488 nm și excitație 525 nm) folosind un microscop cu fluorescență (Axio - Observer D1, Zeiss) cu camera video digitală (AxioCam MRc) și software de achiziție, arhivare și analiză de imagini microscopice (AxioVision Rel.4.6). Ca martor au fost folosite fragmente foliare simple nestropite cu inducitori, ci numai cu o soluție care include 0,5% etanol, 0,5



% Tween 20 și 1% adjuvant de stropire. Intensitatea fluorescenței specifice ROS pentru întregul câmp captat de camera CCD a microscopului în sistem RGB (roșu-verde-albastru) a fost cuantificată prin determinarea valorii medii a canalului verde, folosind funcția de histograme a softului Adobe Photoshop CS6. Intensitatea rezultată a fost raportată și la valoarea histogramei R (Red / roșu, care reprezintă fundalul țesuturilor prelevate) și la concentrația micromolară (obținută prin raportarea concentrației la masa moleculară a compusului testat și raportare la 1000 ml). Rezultatele sunt prezentate în tabelul 1.

Tab.1. Intensitatea fluorescenței fluorocromului H<sub>2</sub>DCFA, specific pentru speciile reactive de oxigen, în țesuturile vegetale provenite din plante tratate cu compuși inductori de oxid nitric.

Tratament	Valoare medie histrograma G-Green	Valoare medie histrograma R-Red	Raport medii G/R	Raport medie histrograma G per concentrație micromolară
Martor	7,59±6,34	54,74±17,12	0,139	-
<b>Ia</b> 10 μg/ml	13,97±11,38	87,03±9,89	0,161	0,632
<b>Ia</b> 20 μg/ml	80,11±7,45	97,92±14,95	0,818	3,625
<b>Ia</b> 50 μg/ml	86,9±13,84	113,74±19,09	0,764	3,932
<b>Ib</b> 10 μg/ml	71,12±5,48	123,57±10,48	0,575	2,724
<b>Ib</b> 20 μg/ml	81,81±6,19	110,29±11,55	0,742	3,134
<b>Ib</b> 50 μg/ml	102,92±11,55	112,32±12,60	0,916	3,943
<b>Ic</b> 10 μg/ml	53,81±18,25	116,72±12,47	0,463	2,482
<b>Ic</b> 20 μg/ml	64,18±8,28	121,34±16,81	0,536	2,821
<b>Ic</b> 50 μg/ml	68,72±14,63	128,2±10,28	0,548	3,186

Rezultatele obținute demonstrează apariția ROS în țesuturile vegetale stropite cu cei trei inductori **Ia**, **Ib** și **Ic**, la toate concentrațiile folosite, 10 μg/mL, 20 μg/mL și 50 μg/mL, comparativ cu martorul netratat cu inductori. Sinteza speciilor oxigenate reactive se produce în cazul tratării țesuturilor vegetale cu compușii conform invenției **Ia**, **Ib** și **Ic** la toate cele trei concentrații, dar mai ales în cazul tratării țesuturilor vegetale cu compușii conform invenției **Ia**, **Ib** și **Ic** la concentrații crescute de inductori, respectiv 20 μg/mL și 50 μg/mL.

*Exemplu 3.* Determinarea producerii de oxid nitric (NO) în țesuturile vegetale, ca urmare a tratamentelor cu compuși obținuți conform exemplului 1, s-a realizat conform celor prezentate mai jos. Suspensiile de inductori au avut aceeași compoziție ca în exemplul 2. Păstrarea suspensiilor și aplicarea ca tratament foliar al plantelor test, ca și cultivarea plantelor test *A. thaliana* s-au realizat în condiții similare celor descrise în exemplul de mai sus. După 24 ore de la stropire au fost



recoltate frunze de la plantele test și prelucrate ulterior pentru microscopie de fluorescență, în vederea evidențierii NO.

Prezența NO a fost pus în evidență folosind fluorocromul DAF-FM DA (diacetat de 4-amino-5-metilamino-2',7'-diclorodihidrofluoresceină). Astfel, fragmentele foliare au fost spălate cu apa distilată și incubate cu 10  $\mu$ M DAF-FM DA (soluție stoc 5 mM în DMSO) (Sigma - Aldrich), 15 minute, la întuneric, la temperatura camerei. Apoi, fragmentele foliare au fost spălate de două ori cu tampon fosfat (TFS) și vizualizate (emisie 488 nm și excitație 515 nm) folosind microscopul cu fluorescență (AXIO - OBSERVER D1, Zeiss) cu camera video digitală (AxioCam MRc) și software de achiziție, arhivare și analiză de imagini microscopice (AxioVision Rel.4.6). Ca martor au fost folosite fragmente foliare simple nestropite cu inductori.

Intensitatea fluorescenței specifice NO pentru întregul câmp captat de camera CCD a microscopului în sistem RGB (roșu-verde-albastru) a fost cuantificată prin determinarea valorii medii a canalului verde, folosind funcția de histograme a softului Adobe Photoshop CS6. Intensitatea rezultată a fost raportată și la valoarea histogramei R (Red / roșu, care reprezintă fundalul țesuturilor prelevate) și la concentrația micromolară (obținută prin raportarea concentrației la masa moleculară a compusului testat și raportare la 1000 ml). Rezultatele sunt prezentate în tabelul 2.

Tab. 2. Intensitatea fluorescenței fluorocromul DAF-FM DA, specific pentru oxidul nitric, în țesuturile vegetale provenite din plante tratate cu compuși inductori de oxid nitric.

Tratament	Valoare medie histograma G-Green	Valoare medie histograma R-Red	Raport medii R/G	Raport medie histograma G per concentrație micromolară
Martor	14,87 $\pm$ 3,52	54,74 $\pm$ 5,73	0,272	-
<b>Ia</b> 10 $\mu$ g/ml	33,34 $\pm$ 3,95	78,84 $\pm$ 6,24	0,423	1,509
<b>Ia</b> 20 $\mu$ g/ml	36,87 $\pm$ 5,36	78,89 $\pm$ 7,57	0,467	1,668
<b>Ia</b> 50 $\mu$ g/ml	41,4 $\pm$ 1,98	76,23 $\pm$ 6,83	0,543	1,873
<b>Ib</b> 10 $\mu$ g/ml	28,95 $\pm$ 2,19	76,53 $\pm$ 5,98	0,378	1,109
<b>Ib</b> 20 $\mu$ g/ml	33,74 $\pm$ 3,83	68,75 $\pm$ 7,82	0,491	1,293
<b>Ib</b> 50 $\mu$ g/ml	36,01 $\pm$ 3,07	72,93 $\pm$ 6,83	0,494	1,380
<b>Ic</b> 10 $\mu$ g/ml	37,27 $\pm$ 5,42	78,16 $\pm$ 12,82	0,477	1,251
<b>Ic</b> 20 $\mu$ g/ml	42,41 $\pm$ 6,15	84,34 $\pm$ 10,72	0,503	1,423
<b>Ic</b> 50 $\mu$ g/ml	54,47 $\pm$ 9,01	118,2 $\pm$ 24,27	0,461	1,828

Rezultatele obținute demonstrează apariția NO în țesuturile vegetale stropite cu cei trei inductori izoxazolici **Ia**, **Ib** și **Ic**, la concentrații de 10  $\mu$ g/mL, 20  $\mu$ g/mL și 50  $\mu$ g/mL, comparativ

cu martorul netratat. Generarea NO se produce în cazul tratării ţesuturilor vegetale cu compuşi conform invenţiei **Ia**, **Ib** şi **Ic** la toate cele trei concentraţii, dar mai ales la concentraţii crescute de inductori, respectiv 20 µg/mL şi 50 µg/mL

*Exemplul 4.* Determinarea colorimetrică a oxizilor de azot din ţesuturile vegetale tratate cu inductori de oxid nitric. Suspensiile de inductori au fost pregătite conform celor descrise în Exemplul 2. Plantele test *A. thaliana* au fost crescute pe medii hidroponice, separat fiecare, prin folosirea modulelor Arasystem, în cameră climatică, conform celor descrise mai sus în Exemplul 2. După 12 şi 24 ore de la efectuarea tratamentului au fost preluate probe în care s-a determinat oxidul nitric colorimetric, cu reactiv Griess (Reactiv G2930, Promega, Madison, WI, SUA). O cantitate de frunze de cca 0,6 g, cântărită cu precizie, a fost mojarată cu 3 ml tampon acetat 50 mM (pH 3,6, cu 4% diacetat de zinc). Omogenatul a fost centrifugat la 10000 r/m timp de 15 min. S-a separat supernatantul, iar sedimentul a fost reluat cu 1 ml tampon acetat rece şi recentrifugat în aceleaşi condiţii. S-au combinat supernatantele şi s-au adăugat 0,1 g de cărbune activ. După agitare puternică, timp de 5 min, s-a separat cărbunele activ prin filtrare şi s-a determinat colorimetric oxidul de azot, lucrându-se cu o placă de microtitrare cu 96 godeuri, volum de 0,3 ml. La 0,1 ml de filtrat s-au adăugat 0,1 ml de reactiv Griess, s-a incubat timp de 30 min şi s-a citit extincţia la 540 nm. S-a lucrat faţă de o curbă de nitrit de sodiu, proaspăt preparată, prin diluţii seriale, de la 100 µM la 1,56 µM. Rezultatele obţinute au fost raportate la substanţa proaspătă luată în lucru şi sunt prezentate în tabelul 3.

Tab. 3. Nivelul de oxid nitric în ţesuturile vegetale provenite din plante *A. thaliana* tratate cu compuşi inductori de oxid nitric, realizaţi conf. Exemplu 1.

Tratament	Conţinut oxid nitric la 12 ore (nmoli/g s.p.)	Conţinut oxid nitric la 24 ore (nmoli/g s.p.)
Martor	30,41±2,75	26,45±3,57
<b>Ia</b> 10 µg/ml	37,57±3,09	37,42±4,47
<b>Ia</b> 20 µg/ml	43,03±4,27	40,76±2,94
<b>Ia</b> 50 µg/ml	52,47±3,84	46,43±3,15
<b>Ib</b> 10 µg/ml	38,86±4,06	36,34±2,82
<b>Ib</b> 20 µg/ml	43,84±4,58	39,85±2,82
<b>Ib</b> 50 µg/ml	56,48±3,24	54,37±4,83
<b>Ic</b> 10 µg/ml	40,82±3,73	37,28±6,23
<b>Ic</b> 20 µg/ml	45,68±4,86	42,34±5,47
<b>Ic</b> 50 µg/ml	54,35±5,27	51,25±6,73

*Exemplu 5.* Efectul inductorilor de oxid nitric asupra eficienței de utilizare a azotului de către plantele de varză. Pentru realizarea experimentului în condiții controlate, semințele de varză, *Brassica oleracea* var. *capitata*, cv. Bucharest F1 au fost dezinfectate chimic, prin spălări repetate cu hipoclorit de sodiu 1% și au fost germinate în soluție 0,5 mM CaSO<sub>4</sub>. La 4 zile de la germinare semințele au fost trecute într-un sistem de cultură hidroponic aerat. Mediul de cultură hidroponic folosit avea următoarea compoziție: KNO<sub>3</sub> 1 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,25 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,25 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,25 mM, MgSO<sub>4</sub> 0,5 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 10 μM, Fe-EDTA 15 μM, MnSO<sub>4</sub> 0,5 μM, ZnSO<sub>4</sub> 0,5 μM, CuSO<sub>4</sub> 0,1 μM, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub> Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> 0,1 μM. pH-ul mediului a fost menținut prin adăugare de KOH sau HCl 0,1 N, la valori de pH cuprinse între 5,8 și 6,2. Soluția de nutrienți a fost înlocuită zilnic. Plantele au fost menținute în camere de creștere, în condiții controlate, la temperaturi de 25 / 20°C lumină / întuneric, cu o fotoperioadă de 12 ore, la o intensitate luminoasă de 500 μE/m<sup>2</sup>/s. După 2 săptămâni plantulele au fost tratate cu inductori izoxazolici **Ia**, **Ib** și **Ic**, la concentrații de 10, 20 și 50 μg/ml. După tratament, plantele de varză au fost trecute pe o soluție hidroponică asemănătoare cu cea de mai sus, la care însă concentrația de KNO<sub>3</sub> a fost redusă la 0,5 mM. Condițiile controlate de cultivare au fost aceleași ca cele de mai sus. După 7 zile de la tratament în plantulele de varză a fost determinat azotul total și azotul nitric. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 4.

Tab. 4. Nivelul de azot total și azot nitric în plantule de varză tratate cu compuși inductori de oxid nitric, realizați conf. Exemplu 1.

Tratament	Conținut azot nitric (μg NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /g s.p.)	Conținut azot total (μg N / g s.p)
Martor	1243,12±175,27	3860,45±483,75
<b>Ia</b> 10 μg/ml	1587,57±107,68	4537,42±543,62
<b>Ia</b> 20 μg/ml	1723,32±142,70	4830,61±393,42
<b>Ia</b> 50 μg/ml	1523,72±123,42	4686,32±483,51
<b>Ib</b> 10 μg/ml	1473,62±140,65	4463,42±352,82
<b>Ib</b> 20 μg/ml	1623,84±167,82	4694,53±473,24
<b>Ib</b> 50 μg/ml	1756,48±171,24	4852,72±504,83
<b>Ic</b> 10 μg/ml	1387,78±112,27	4248,76±462,71
<b>Ic</b> 20 μg/ml	1476,82±146,56	4374,32±623,83
<b>Ic</b> 50 μg/ml	1723,92±163,82	4503,27±501,28

Azotul total a fost determinat prin metoda Kjeldahl, cu acid sulfuric ca mineralizant și apă oxigenată și seleniu ca acceleratori, conform metodei descrise de Novozamsky et al. 1983, (*Communication in Soil Science and Plant Analysis*, 14, 239–249) și azotul nitric (ca nitrat, colorimetric după reducere la nitrit, conform metodei descrise de Cataldo et al. 1975,

(*Communication in Soil Science and Plant Analysis*, 6, 71–80). Rezultatele obținute în cadrul acestui experiment în condiții controlate demonstrează o creștere a preluării și a utilizării azotului de către plantulele de varză ca urmare a tratamentului cu izoxazolici **Ia**, **Ib** și **Ic**, la concentrații de 10, 20 și 50  $\mu\text{g/ml}$ .

A fost realizat și un experiment de câmp, pe o cultură de varză de vară (*Brassica oleracea* var. *capitata*, cv. Bucharest F1). Lotul experimental a fost amplasat la 40°59'N latitudine, 27°40'E longitudine și 54 m altitudine. Valorile medii multi-anuale ale temperaturii, vântului, duratei zilnice de însorire și precipitațiile totale pentru lotul experimental folosit sunt 11,5 °C, 3,5m/s, 6,8 h și, respectiv, 504 mm. Solul lotului experimental este cernoziom castaniu, dezvoltat pe o rocă parentală de tip loess. După recoltarea culturii timpurii premergătoare verzei, s-a executat o arătură superficială, la 18-20 cm adâncime, și s-a aplicat fertilizarea cu 30 de tone la hectar de compost de mranită, bine descompus. Înainte cu 6 zile de plantarea răsadurilor, au fost administrate îngrășăminte complexe (echivalent 120 kg/ha N, 50 kg/ha P, 180 kg/ha K<sub>2</sub>O), care au fost încorporate în sol la 6-8 cm adâncime. Răsadurile nerepicate de varză s-au scos cu grijă din ghivecele în care s-au produs, s-au fasonat și s-au mocirlit. Plantarea s-a realizat pe teren modelat, în straturi înălțate, 2 rânduri pe strat, la distanță de 70 x 30 cm. La 20 zile de la înființarea culturii s-au aplicat prin stropire 500 litri/ha de soluție de compuși izoxazolici **Ia**, **Ib** și **Ic**. Soluția aplicată a avut o concentrație de 8 mg/l compușii inductori de oxid nitric, omogenizați prin suspendare cu o emulsie 1% adjuvanți de stropire pentru 1 ha. Doza de aplicare corespunde la 4 g inductori de oxid nitric pentru 1 ha. Adjuvantul de stropire, aplicat în doză de 5 litri/ha este alcătuit din 42,1...54,8 părți de esteri etilici ai acizilor grași din ulei de floarea-soarelui, 10,1 ...17,0 părți alcool etilic, 3,9...6,4 părți glicerol, 2,5 ...4,4 părți trigliceride, 10,4...30 părți emulsifianți, reprezentați de lecitină lichidă din soia sau lecitină lichidă din soia și MOA-9, eter de alcool gras cu 9 unități de etilenoxid, sau laurilsulfat de amoniu, 6,4 părți oleat de potasiu, apă 0,5 ...1,7 părți, diferența până la 100 părți fiind substanțe nesaponificabile și săruri de acizi grași sau acizi grași liberi și săruri. Orice alt adjuvant de stropire, cu proprietăți de emulsifiere, umectare și creștere a permeabilității cuticulare poate fi folosit.

S-a lucrat cu un martor care nu a fost tratat cu compuși izoxazolici inductori de oxid nitric / specii reactive de oxigen. Cultura de varză a fost întreținută conform tehnologiei recomandate pentru zona agro-pedoclimatică. La sfârșitul perioadei de vegetație au fost recoltate variantele experimentale și s-a cântărit producția realizată, care a fost exprimată în kg/ha. În recoltă a fost determinat azotul total și azotul nitric, prin metodele deja menționate. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul 5.



Tab. 5. Producția realizată (tone/ha) și conținutul de azot total și azot nitric în recolta de varză obținută din plante tratate cu inductori de oxid nitric

Varianta experimentală	Recoltă - căpățâni de varză (tone s.p./ha)	Azot total (mg / g s.p.)	Azot total ( $\mu$ g / g s.p.)	Azot total recoltă (kg/ha)
Martor netratat cu inductori de oxid nitric	69,16b	1,22b	0,68b	84,38c
Tratament Ia 4g/ha	70,24a	1,45a	1,02a	101,85b
Tratament Ib 4g/ha	70,38a	1,67a	0,85a	117,53a
Tratament Ic 4g/ha	71,43a	1,54a	0,94a	110,00ab
DL5%	2,37	0,21	0,14	7,82

\*Valorile urmate de aceeași literă nu diferă semnificativ pentru  $P > 0,05$

Rezultatele obținute în cadrul experimentului de câmp demonstrează faptul că tratamentul cu inductorii de oxid nitric și specii reactive de oxigen sintetizați conform Ex.1, în doză echivalentă a 4 g/ha, suspenzați într-o soluție de 1% adjuvanți de stropire, determină o creștere a eficienței de utilizare a azotului de către plantele de varză, cu o acumulare sporită de azot total în recolta utilă.

*Exemplul 6.* Efectul inductorilor de oxid de azot și specii reactive de oxigen în țesuturile vegetale, sintetizați conform Ex.1, asupra eficienței tratamentelor de fertilizare foliară cu îngrășământ complex NPK la cultura de grâu. S-au preparat 8 kg de fertilizant lichid N:P:K 8,5 - 8,5 - 8,5, prin dizolvarea a 1641 g de fosfat monopotasnic, 571 g de azotat de potasiu și 1661 g de uree în apă. Soluția obținută a fost adusă la 9kg cu apă deionizată, obținându-se o soluție (S1) clară. Peste soluția S1 s-au adus 1000g de adjuvant de stropire, cu formula descrisă în exemplul de mai sus. Adjuvantul s-a adăugat încet, sub agitare viguroasă. Au rezultat 10 kg de fertilizant lichid N:P:K 8,5 - 8,5 - 8,5 cu adjuvant (F1), destinat aplicării foliare (în calculul K din fertilizantul foliar F1 a fost luat în considerare și potasiul din adjuvantul de stropire). Fertilizantul cu adjuvant (F1) a fost divizat în 4 părți egale de 2,5 kg, în 3 din acestea fiind adăugate câte 250 mg compuși inductori de NO și ROS sintetizați conform Exemplu 1. Suspensiile rezultate au fost testate pe loturi experimentale de 25 m<sup>2</sup>, la Fundulea, (44°27'45" latitudine nordică și 26°31'35" longitudine estică), folosind grâu de toamnă (*Triticum aestivum* L.), cultivar Glosa (produs de INCDA Fundulea, Fundulea, România). Cultura premergătoare a fost soia. Norma de însămânțare a fost de 480..500 boabe germinabile pe mp. Solul din loturile experimentale a fost un cernoziom cambic levigat, dezvoltat pe o rocă parenterală de tip loess. În zona experimentală de la Fundulea temperatura medie multianuală atmosferică este de 10,25°C, iar precipitații anuale însumează 571 mm. Solul a fost fertilizat cu 200 kg/ha echivalent îngrășământ complex NPK 15:15:15 (Azomureș, Târgu-Mureș, România) înainte de însămânțare. Au fost aplicate tehnologii de lucru recomandate

pentru zona Fundulea. Sămânța de grâu a fost tratată cu amestec insecto-fungicid - echivalent 2,5 l/t dintr-un produs care conținea 12 g/l tebuconazol și 210 g/l imidacloprid (Nuprid Max AI 222 FS, Nufarm Srl, Bucuresti, România). La înfrățire s-a aplicat un erbicid pe bază de amidosulfuron 100 g/l + iodosulfuron-metil-Na 25 g/l + mefenpyr-dietil 250 g/l (Sekator Progress OD, Bayer Crop Science, Monheim am Rhein, germani) în doză echivalentă a 0,1 l/ha. Pentru combaterea bolilor foliare s-a aplicat un singur tratament la GS39 (frunza standard dezvoltată complet), folosindu-se un produs cu 250 g/l sprioxamină + 167 g/l tebuconazol + 43 g/l triadimenol (Falcon 460 EC, Bayer Crop Science) aplicat în doză de 0,6 l/ha. Împreună cu tratamentul de boli foliare s-a aplicat și insecticid pe bază de tiacloprid 100 g/l și deltametrin 10 g/l (Proteus, Bayer Crop Science) în doză de 0,4 l/ha.

Experimentul de testare a efectului adjuvantului asupra fertilizării foliare la grâu a fost organizat în blocuri randomizate, fiecare dintre cele patru produse testate, F1 și F1+Ia, F1+Ib, F1+Ic, fiind aplicate în cadrul unor variante care aveau câte 4 repetiții. S-a lucrat față de un martor la care s-a aplicat numai stropire cu apă. S-au aplicat soluții de diluate de 25 ori din fertilizantii F1 și F1+Ia, F1+Ib, F1+Ic, într-o normă de stropire echivalentă a 200 l/ha, corespunzând unei doze de 6 kg/ha fertilizant NPK, și, respectiv, 2 kg/ha aditiv de stropire și 2 g din inductorii Ia, Ib sau Ic. Aplicarea tratamentelor a fost efectuată cu ajutorul unei pompe de spate SG20 (Stihl AG, Waiblingen, Germania), la o presiune de stropire stabilită la 275 kPa, folosind o duză cu jet plat și derivă limitată (TeeJett® flat-fan TT11002 model, Spraying Systems Co., Wheaton, IL, SUA). Tratamentele s-au aplicat în fenofazele GS31 (10 aprilie 2016) și GS45 (12 mai 2016). În finalul ciclului de vegetație s-a recoltat separat fiecare repetiție, producția realizată fiind exprimată în echiv. în kg/ha cu 86% s.u. A fost analizat de asemenea conținutul de azot total conform metodei descrise deja mai sus. Rezultatele obținute au fost analizate prin aplicarea modelului liniar general pentru a se determina valorile medii și diferențele semnificative la un nivel de probabilitate de 5% (Statistica 10, StatSoft, Tulsa, OK, SUA). Rezultatele sunt prezentate în tabelul 6 de mai jos.

Tab. 6. Efectul inductorilor NO și ROS sintetizați conform invenției asupra eficacității utilizării nutrienților din fertilizantul foliar NPK 8,5-8,5-8,5 la grâu (cv. Glosa).

Varianta experimentală	Producția		Azot total recoltă*	
	(kg/ha)*	% martor	g/kg	Kg/ha
Martor netratat cu îngrășământ foliar	6282b	100,00%	22,88b	143,73b
F1 NPK	6416b	102,13%	24,72b	158,60b
F1 NPK plus Ia	6834a	108,79%	25,46a	173,99a
F1 NPK plus Ib	6728a	107,10%	26,04a	175,20a
F1 NPK plus Ic	6852a	109,07%	25,63a	175,62a

\*Valorile urmate de aceeași literă nu diferă semnificativ pentru  $P > 0,05$

Rezultatele obținute demonstrează eficacitatea inductorilor NO și ROS realizați conform exemplu 1, în creșterea eficacității utilizării nutrienților din fertilizantul foliar NPK 8,5-8,5-8,5 de către plantele de grâu. Sporul de producție obținut la varianta la care s-a aplicat fertilizantul NPK (F1) împreună cu inductorii NO și ROS este semnificativ, atât față de martorul netratat, cât și față de varianta tratată cu fertilizant foliar (F2) NPK 8,5-8,5-8,5 care nu conține adaos de inductori NO și ROS. Același tipar, de creștere semnificativă statistic, se regăsește și în cazul stimulării acumulării de azot (total) în recoltă.

*Exemplu 7.* Capacitatea inductorilor NO și ROS, sintetizați conform Exemplu 1, de a crește toleranța plantelor de grâu la stresul termic, respectiv la temperaturi scăzute. Semințele de grâu (*Triticum aestivum* L. cv. Glosa), dezinfectate prin spălări repetate cu hipoclorit de sodiu 1% și apă sterilă, au fost însămânțate în ghivece de plastic de 25 cm, conținând un substrat de creștere îmbogățit cu nutrienți pentru primele săptămâni de creștere (Canna Terra Professional Plus, Canna International BV, Oosterhout, Olanda). Ghivecele cu plantulele de grâu au fost menținute în condiții de seră, la  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  în timpul zilei și  $17 \pm 2^\circ\text{C}$  în timpul nopții, cu o fotoperioadă de 12 ore, suplimentată cu lumină cu intensitatea de  $160 \text{ mE/m}^2/\text{s}$ , provenită din lămpi cu halogen, atunci când intensitatea luminoasă scădea sub  $500 \text{ mE/m}^2/\text{s}$ , timp de 11 zile. În ziua a 11-a s-au aplicat tratamente cu inductori NO și ROS. Inductorii au fost emulsionați într-o soluție de 1% adjuvanți de stropire, în concentrație de 30 mg/l, și s-au aplicat într-o normă echivalentă de 250 litri/ha, corespunzând unei doze de 7,5 g/ha, compuși inductori de oxizi nitric și specii reactive de oxigen. Plantele martor au fost tratate cu apă distilată. Plantele tratate au fost apoi expuse la temperaturi scăzute ( $5/2^\circ\text{C}$ , temperatura lumină / întuneric, 50% umiditate relativă, intensitate luminoasă scădea  $300 \text{ mE/m}^2/\text{s}$ , într-o cameră climatică (Model SGC 120 LED, Weiss Gallenkamp, Loughborough, Marea Britanie). După 5 zile de expunere la temperaturi scăzute în plantele tratate s-a determinat conținutul de peroxizi lipidici (ca malondialdehidă, cu reactiv tiobarbituric, conform metodei descrise de Zhang et al. 2007, *Plant Cell and Environment* **30**, 775–785) și activitatea unor enzime antioxidante, superoxid-dismutaza (SOD) și peroxidaza (POX) care protejează plantele de grâu împotriva stresului determinat de temperaturile scăzute. Activitatea SOD a fost estimată prin determinarea ratei de reducere a absorbției nitro-blue-tetrazoliu (Dhindsa și Plumb-Dhindsa TA, 1981, *Journal of Experimental Botany*, **126**, 93–101). Activitatea POX a fost determinată prin creșterea ratei de absorbție a guaiacolului (Yee et al. 2002, *Environmental and Experimental Botany*, **49**, 209–221). S-a lucrat și față de un martor care nu a fost stresat termic.

Rezultatele obținute, prezentate în tabelul 7, demonstrează faptul că tratamentele cu inductorii ROS și NO, sintetizați conform Exemplu 1, determină o activare a mecanismelor



implicate în protecția plantelor de grâu față de stresul termic (temperaturi scăzute), care are ca rezultat o diminuare a formării peroxizilor lipidici. Efectul final este de creștere a toleranței plantelor tratate la stresul termic.

Tab. 7. Influența inductorilor NO și ROS sintetizați conform invenției asupra valorilor medii ale activității enzimelor antioxidante și a peroxizilor lipidici din plantele de grâu (cv. Glosa).

Varianta experimentală	Peroxizi lipidici (MDA) (nmoli / g s.p.)	Activitate SOD (UI / g s.p.)	Activitate POX (UI / g s.p.)
Martor nestresat termic	1,58 b	54,3 c	512,6 c
Martor stresat termic	2,46 a	62,7 b	548,4 b
Stresat termic + Ia	1,74 b	82,3 a	583,6 a
Stresat termic + Ib	1,68 b	87,6 a	594,5 a
Stresat termic + Ic	1,64 b	83,4 a	572,4 a

\*Valorile urmate de aceeași literă nu diferă semnificativ pentru  $P > 0,05$

*Exemplu 8.* Evaluarea influenței tratamentelor cu inductori NO și ROS asupra atacului de *Sclerotinia sclerotiorum*, agent patogen care atacă în toate stadiile de vegetație, inclusiv în timpul depozitării. S-a realizat o evaluare a frecvenței atacului (%) și a intensității acestuia (cu note de la 0-6), la două săptămâni de la aplicarea tratamentului cu inductori. Rezultatele, prezentate în tabelul 8, demonstrează faptul că aplicarea tratamentelor cu inductori NO și ROS determină o creștere a rezistenței plantelor la stresul biotic reprezentat de agenții fitopatogeni, cu o reducere a frecvenței și intensității atacului.

Tab. 8. Influența tratamentelor cu inductori de oxid nitric și specii reactive de oxigen asupra atacului de putregai alb (*Sclerotinia sclerotiorum*) la plantele de varză.

Varianta experimentală	Frecvența atacului (%)	Intensitatea atacului (0-6)
Martor netratat cu inductori de oxid nitric	10,20a	3,0
Tratament Ia 4g/ha	3,80a	1,0
Tratament Ib 4g/ha	5,40a	2,0
Tratament Ic 4g/ha	6,10a	2,0
DL5%	1,70	-

\*Valorile urmate de aceeași literă nu diferă semnificativ pentru  $P > 0,05$

*Exemplu 9.* Determinarea influenței tratamentului cu inductori NO și ROS asupra toleranței plantelor de conopidă la stresul hidric. Experimentul a fost realizat pe o cultură de conopidă (*Brassica oleracea* convar. *Botrytis* var. *cauliflora*, cv. All seasons improved SX). Lotul experimental a fost amplasat la 40°59'N latitudine, 27°40'E longitudine și 54 m altitudine. Valorile

medii multi-aniuale ale temperaturii, vântului, duratei zilnice de însorire și precipitațiile totale pentru lotul experimental folosit sunt 11,5°C, 3,5m/s, 6,8 h și, respectiv, 504 mm. Solul lotului experimental este cernoziom castaniu, dezvoltat pe o rocă parentală de tip loess. După recoltarea culturii timpurii premergătoare conopidei, s-a executat o arătură superficială, la 18-20 cm adâncime, și s-a aplicat fertilizarea cu 30 de tone la hectar de compost de mranită, bine descompus. Înainte cu 6 zile de plantarea răsadurilor, au fost administrate îngrășăminte complexe (echivalent 120 kg/ha N, 50 kg/ha P, 180 kg/ha K<sub>2</sub>O), care au fost încorporate în sol la 6-8 cm adâncime. Răsadurile nerepicate de conopidă au fost scoase cu grijă din ghivecele în care s-au produs, s-au fasonat și s-au mocirlit. Plantarea s-a realizat pe teren modelat, în straturi înălțate, 2 rânduri pe strat, la distanță de 70 x 30 cm. La 20 zile de la înființarea culturii s-au aplicat prin stropire 500 litri/ha de soluție de compuși izoxazolici **Ia**, **Ib** și **Ic**, împreună cu betaină (*N,N,N*-trimetilglicină, Danisco, Marlborough, UK). Soluția aplicată a avut o concentrație de 30 mg/l compuși inductori de oxid nitric, omogenizați prin suspendare cu o emulsie 1% adjuvanți de stropire pentru 1 ha. Doza de aplicare corespunde la 7,5 g inductori de oxid nitric pentru 1 ha. Adjuvantul de stropire, aplicat în doză de 5 kg/ha, este conform celui descris în exemplu 5. Betaina este aplicată în concentrație de 0,25 g/l, corespunzând unei doze de 125 g/ha.

Câmpul pe care s-a amplasat experimentul a fost irigat subteran, printr-un sistem de irigare prin picurare. Experimentul a fost un experiment de tip split-split plot design, cu loturi experimentale stresate și nestresate hidric. Plantele nestresate hidric au fost irigate la 100% evapotranspirația culturii (ET<sub>c</sub>), iar plantele stresate hidric au fost irigate în condiții de deficit, la 50% ET<sub>c</sub>. Valoarea ET<sub>c</sub> a fost calculată prin metoda Penman-Montheith, folosind datele furnizate de o stație meteo automată și coeficienții specifici pentru diferitele stadii ale culturii de conopidă (Allen et al, 1998, *Crop evapotranspiration-guidelines for computing crop water requirements-FAO irrigation and drainage paper 56*. FAO: Rome, 1998; Vol. 300, p D05109). Variantele experimentale au inclus, pe lângă cele tratate cu inductori de oxid nitric și betaină, stresate și nestresate hidric, și martori, tratați numai cu o suspensie de adjuvanți de stropire sau numai cu amestec de adjuvanți de stropire plus betaină, stresate și nestresate hidric. Fiecare variantă experimentală a fost realizată în 3 repetiții.

La sfârșitul ciclului de producție s-au recoltat inflorescențele de conopidă și au fost cântărite. Datele au fost prelucrate statistic prin analiza varianței (Statistica 10, StatSoft). Rezultatele sunt prezentate în tabelul 9.

Tab. 9. Efectul inductorilor NO și ROS aplicați împreună cu betaina asupra toleranței plantelor de conopidă la stresul hidric.

Varianta experimentală	Producția	Producția
------------------------	-----------	-----------

		(tone/ha)	(% martor)
Nestresat hidric (irigare 100% ETc)	Adjuvant stropire, echiv. 5 kg/ha	28,19	100,00%
	Adjuv. stropire, echiv. 5 kg/ha + betaină, echiv. 125 g/ha	33,75	119,72%
	<b>Ia</b> , echiv 7,5 g/ha + betaina, echiv. 125 g/ha	35,16	124,73%
	<b>Ib</b> , echiv 7,5 g/ha + betaina, echiv. 125 g/ha	35,47	125,82%
	<b>Ic</b> , echiv 7,5 g/ha + betaina, echiv. 125 g/ha	36,23	128,52%
Stresat hidric (irigare 50% ETc)	Adjuvant stropire, echiv. 5 kg/ha	22,47	100,00%
	Adjuv. stropire, echiv. 5 kg/ha + betaină, echiv. 125 g/ha	26,28	116,96%
	<b>Ia</b> , echiv 7,5 g/ha + betaina, echiv. 125 g/ha	28,24	125,68%
	<b>Ib</b> , echiv 7,5 g/ha + betaina, echiv. 125 g/ha	29,16	129,77%
	<b>Ic</b> , echiv 7,5 g/ha + betaina, echiv. 125 g/ha	28,73	127,86%

Aceste rezultate demonstrează că inductorii de oxid nitric, sintetizați conform Ex. 1 și aplicați împreună cu betaină, au o capacitate ridicată de a activa mecanismele de toleranță ale plantelor de conopidă față de stresul hidric. Acțiunea de protejare a plantelor de conopidă față de stresul hidric este complementară acțiunii glicin-betainei, un osmoprotectant cunoscut (Ashraf și Foolad, 2007, *Environmental and Experimental Botany*, 59, 206-216).

*Exemplul 10.* Determinarea influenței tratamentului cu inductori NO și ROS asupra toleranței plantelor de tomate la stresul hidric. Plantele de tomate (*Lycopersicum esculentum* cv. Panekra F1), răsaduri de 60 zile, au fost transplantate în vase de vegetație cu un volum de 25 litri (25 cm diametru și 50 cm înălțime), în care s-au introdus câte 15 litri de substrat de creștere îmbogățit cu nutrienți (Canna Terra Professional Plus, Canna International BV). Vasele de vegetație au fost menținute în condiții de seră, la  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  în timpul zilei și  $17\pm 2^{\circ}\text{C}$  în timpul nopții, cu o fotoperioadă de 12 ore. Experimentul a fost organizat în bloc randomizat cu câte 4 repetiții pentru fiecare variantă, fiecare repetiție incluzând câte 5 plante. La 2 zile de la transplantare au fost aplicate tratamente cu inductori NO și ROS, în concentrații de 20 mg/l, aplicate în volume de adjuvant de stropire 1%, echivalente la 250 litri/ha și corespunzând unei doze de 5 g/ha. Plantele nestresate hidric a fost udate o dată la cinci zile la 100 % capacitate de câmp (55 ml la 1 litru substrat), iar variantele stresate hidric au fost udate la zece zile la 100% capacitate de câmp. Martorii netratați cu inductori au fost tratați cu o soluție de adjuvant de stropire 1%, echivalent la o doză de 2,5 kg/ha. La sfârșitul celor 60 zile de la transplantare s-a desființat experiența, determinându-se parametri morfologici ai plantelor, respectiv înălțimea plantelor, lungimea rădăcinii, ca și recolta din primul val de fructificare. Datele au fost prelucrate prin analiza varianței (Statistica 10, StatSoft, Tulsa, OK, SUA). Rezultatele sunt prezentate în tabelul 10. Aceste rezultate demonstrează eficiența

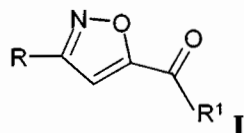
inductorilor NO și ROS sintetizați conform invenției în creșterea toleranței plantelor de tomate la stresul hidric.

Tab. 10. Efectul inductorilor NO și ROS asupra toleranței plantelor de tomate (*Lycopersicum esculentum* cv. Panekra F1) la stresul hidric.

Varianta experimentală		Înălțime plante (cm)	Lungime rădăcină (cm)	Producție medie (g fructe coapte / plantă)
Nestresat hidric (irigare la 5 zile)	Adjuvant stropire, echiv. 2,5 kg/ha	57,8 a	49,8 b	297 ab
	<b>Ia</b> , echiv. 5 g/ha	57,8 a	54,4 ab	352 a
	<b>Ib</b> , echiv. 5 g/ha	58,5 a	58,7 a	369 a
	<b>Ic</b> , echiv. 5 g/ha	59,6 a	56,8 a	348 a
Stresat hidric (irigare la 10 zile)	Adjuvant stropire, echiv. 2,5 kg/ha	44,1 c	38,4 c	202 c
	<b>Ia</b> , echiv. 5 g/ha	53,8 b	48,7 b	287 ab
	<b>Ib</b> , echiv. 5 g/ha	52,5 b	50,4 b	309 ab
	<b>Ic</b> , echiv. 5 g/ha	55,7 ab	47,8	312 ab

## Revendicări

1. Compuși sintetici cu rol de inductori de oxid nitric în țesuturi vegetale conform invenției **caracterizați prin aceea că** au o structură de izoxazol 3,5-disubstituit reprezentată prin formula generală **I**,



în care:

R este o grupă 3,4-metilendioxifenil sau 2-tienil, iar R<sup>1</sup> este o grupă alchil C1-C4, carboxi sau carbometoxi, fenil sau fenil substituit cu alchil, alcoxi, halogen, nitro, sau fenil mono-, di- sau trisubstituit cu radicali alchil, alcoxi, halogen, nitro, etc., de preferință carbometoxi, carboxi, fenil, sau fenil substituit cu grupe atrăgătoare de electroni.

2. Procedeu de utilizare a compușilor sintetici cu rol de inductori de oxid nitric în țesuturi vegetale conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** implică tratamentul culturilor de varză, pentru creșterea eficienței de utilizare a azotatului, cu doze de 2-4 g/ha, corespunzătoare unor concentrații de 4-20 mg/l compuși inductori de oxid nitric, aplicați în norme de 200 - 500 litri suspensie cu 1% adjuvanți de stropire pentru 1 ha.

3. Procedeu de utilizare a compușilor sintetici cu rol de inductori de oxid nitric în țesuturi vegetale conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** implică tratamentul unor culturi de grâu, varză, conopidă, tomate sau castravete, pentru mărirea toleranței plantelor la stresurile biotice și abiotice, în doze de 3-7,5 g/ha, corespunzătoare unor concentrații de 12-30 mg/l compuși inductori de oxizi nitric, aplicați în norme de 200-250 litri suspensie, care conțin și 1% adjuvanți de stropire pentru 1 ha și, opțional, 0,25 g/l glicin-betaină, ca agent de protecție a țesuturilor vegetale împotriva eventualelor efecte secundare negative ale inductorilor de oxid nitric.