MD 1941 Z 2026.09.30

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenţia de Stat pentru Proprietatea Intelectuală

(11) 1941 (13) Z

(51) Int.Cl: ***A01N 43/00*** (2006.01)
A01N 43/34 (2006.01)
A01N 43/40 (2006.01)
A01N 43/42 (2006.01)
A01N 55/02 (2006.01)
C07D 471/02 (2006.01)
C07D 471/04 (2006.01)
C07F 15/06 (2006.01)
A01G 17/02 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENŢIE DE SCURTĂ DURATĂ

(21) Nr. depozit: s 2025 0086
(22) Data depozit: 2025.10.06

(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului:
2026.05.31, BOPI nr. 5/2026

(71) Solicitanţi: INSTITUŢIA PUBLICĂ UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD;
INSTITUŢIA PUBLICĂ INSTITUTUL NAŢIONAL DE CERCETĂRI APLICATIVE ÎN AGRICULTURĂ ŞI MEDICINĂ VETERINARĂ, MD

(72) Inventatori: BACA Svetlana, MD; HAUSTOV Evghenii, MD

(73) Titulari: INSTITUŢIA PUBLICĂ UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD;
INSTITUŢIA PUBLICĂ INSTITUTUL NAŢIONAL DE CERCETĂRI APLICATIVE ÎN AGRICULTURĂ ŞI MEDICINĂ VETERINARĂ, MD

(54) Aplicarea amestecului de triclorură de hexaamină de cobalt(III) şi 1,10-fenantrolină în calitate de produs contra bolii fitoplasmatice *Bois noir* la viţa-de-vie

(57) Rezumat:

Invenţia se referă la protecţia viţei-de-vie, şi anume la combaterea bolilor fitoplasmatice.

Conform invenţiei, se propune aplicarea amestecului de triclorură de hexaamină de cobalt(III) şi 1,10-fenantrolină, luate într-un raport respectiv de 1:2, în calitate de produs contra bolii *Bois noir* la viţa-de-vie.

Revendicări: 1
Figuri: 1

MD 1941 Z 2026.09.30

Descriere:

Invenţia se referă la protecţia viţei-de-vie, şi anume la combaterea bolilor fitoplasmatice.

Fitoplasmele sunt bacterii patogene ale plantelor cu localizare limitată în cadrul floemului. Bolile asociate cu fitoplasmele viţei-de-vie sau „îngălbinirile viţei-de-vie" au fost documentate în majoritatea regiunilor în care se cultivă viţa-de-vie la nivel mondial. Cele mai importante boli de acest gen din principalele zone viticole sunt *Flavescence dorée* (FD) şi *Bois noir* (BN).

Flavescence dorée (FD) este cea mai importantă boală fitoplasmică a viţei-de-vie din ţările europene, care provoacă pierderi catastrofale de până la 100% în cazul epidemiilor severe. Simptomele bolii sunt similare cu cele asociate altor boli cauzate de fitoplasme la viţa-de-vie şi implică în majoritatea cazurilor declinul plantei, rularea frunzelor, struguri zbârciţi, lăstari imaturi şi înroşirea sau îngălbenirea frunzelor la soiurile roşii sau albe, respectiv.

Boala fitoplasmatică *Bois noir* (BN) provoacă pierderi majore a roadei şi a devenit recent un obstacol în calea dezvoltării durabile a sectorului viticol din Republica Moldova. Înmulţirea plantelor infectate în pepiniere contribuie în mare măsură la răspândirea bolii pe distanţe lungi.

O caracteristică critică a infecţiilor fitoplasmatice ale viţei-de-vie este dereglarea organelor generative, în urma căreia roada de pe lăstarii afectaţi este absentă, sau slabă, ceea ce afectează semnificativ cantitatea şi calitatea recoltei. O altă caracteristică a fitoplasmozelor viţei-de-vie este că lăstarii anuali bolnavi nu se maturează de la bază până sus şi degenerează odată cu apariţia temperaturilor scăzute, ceea ce afectează în cele din urmă longevitatea butucilor viţei-de-vie. Dacă nu se iau măsuri de protecţie la timp asupra surselor de răspândire a infecţiei fitoplazmatice, boala se răspândeşte în mod epifitotic şi în decurs de câţiva ani infectează 70-100% din butucii de viţă-de-vie din plantaţii.

În prezent, în Moldova nu există plantaţii-mamă de viţă-de-vie altoită. Coarda de viţă-de-vie pentru producerea butaşilor altoiţi este recoltată din plantaţii industriale de viţă-de-vie care au un grad diferit de infectare cu boli fitoplasmatice. În acest caz, este posibil să fie obţinuţi butaşi infectaţi iniţial, a căror utilizare la înfiinţarea plantaţiilor de viţă-de-vie contribuie la formarea de noi focare de boală. Perioada lungă de incubaţie a acestei boli (până la 3 ani) face posibilă plantarea unei vii cu material infectat şi identificarea bolii abia după câţiva ani.

În prezent nu există metode eficiente cunoscute pentru combaterea bolilor fitoplasmatice ale viţei-de-vie. La plantele afectate, este posibilă remisia simptomelor.

Termoterapia cu apă caldă (t = 50°C, 45 de min) a viţei-de-vie este utilizată ca metodă de prevenire a răspândirii bolilor de etiologie fitoplasmatică. Una dintre proprietăţile fitoplasmelor este sensibilitatea la căldură, ceea ce face posibilă utilizarea termoterapiei în tratamentul plantelor afectate [1].

Dezavantajul: doar materialul de înmulţire de înaltă calitate poate fi tratat nemijlocit înainte de plantare, iar materialul vegetal tratat necesită o îngrijire specială. Toate recomandările protocolului trebuie respectate cu stricteţe. Totodată, ignorarea oricăreia dintre precauţiile enumerate în descrierea procedurii ar putea duce la pierderi semnificative ale materialului săditor. Este important de subliniat că dezavantajul acestei metode este o întârziere în dezvoltare de 10-12 zile şi riscul de deteriorare a mugurilor, ceea ce afectează viabilitatea butaşilor.

Doar antibioticele din grupul tetraciclinelor au demonstrat capacitatea de a suprima simptomele şi multiplicarea fitoplasmei (Bertaccini Assunta. Containment of Phytoplasma-Associated Plant Diseases by Antibiotics and Other Antimicrobial Molecules. 2021, Găsit Internet: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8614762).

Cu toate acestea, în prezent este dificil să se realizeze eradicarea completă a fitoplasmei din plante. Mai mult, utilizarea antibioticelor este interzisă în multe ţări pentru scopuri agricole (V. O. Stockwell et al. Use of antibiotics in plant agriculture. Rev. Sci. Tech. 2012, 31, 199–210. doi:10.20506/rst.31.1.2104), din motivul că acestea pot deveni periculoase pentru oameni cu timpul. Din aceste motive, au fost selectate molecule care nu sunt clasificate ca antibiotice pentru a evalua dacă acestea reduc direct sau indirect prezenţa şi simptomele fitoplasmei la plantele infectate. Utilizarea substanţelor alternative antibioticelor, cum ar fi inductorii de rezistenţă, în câmp deschis, este dificilă. Sistemele *in vitro* ar putea fi o metodă eficientă pentru a produce germoplasmă liberă de fitoplasme, care să fie multiplicată în continuare în condiţii protejate împotriva insectelor înainte de utilizarea în câmp deschis. Această strategie reduce impactul asupra mediului al insecticidelor/pesticidelor în gestionarea bolilor asociate cu fitoplasmele.

Este cunoscută clorura de hexaamină de cobalt(III), un compus complex disponibil comercial şi medicament cunoscut sub numele de Cohex, un antiviral, care acţionează asupra virusului Sindbis (SINV) (J. B. Delehanty et al. Antiviral properties of cobalt(III)-complexes. Bioorg. Med. Chem. 2008, 16, 830-837, doi: 10.1016/j.bmc.2007.10.022) şi a adenovirusului, virusului imunodeficienţei umane (HIV) şi tulpinii Zaire Ebola (ZEBOV) (E. L. Chang et al. Hexamminecobalt (III) Chloride as a Broad-Spectrum Antiviral Complex. J. Antivir. Antiretrovir. 2011, 3, 020-027, doi:10.4172/jaa.1000030).

Proprietăţile compusului triclorură de hexaaminocobalt(III) bis(1,10-fenantrolină) trihidrat cu formula $[Co(NH_3)_6]Cl_3 \cdot 2(phen) \cdot 3H_2O$ ca inhibitor al dezvoltării cancerului de viţă-de-vie au fost stabilite prin testarea efectului inhibitor al creşterii bacteriei *Rhizobium* (Agrobacterium) *vitis* (MD 4725 B1 2020.11.303).

Utilizarea acestui compus ca produs pentru eliminarea şi suprimarea bolilor cauzate de fitoplasme la viţa-de-vie nu a fost descrisă în literatura de specialitate.

Mai este cunoscut compusul 1,10-fenantrolină: producător - Sima-Aldrich, ≥99%, numărul CAS 66 71-7, care are formula empirică $C_{12}H_8N_2$, masa moleculară 180,21 şi temperatura de topire 117°C (https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/131377?lang=en&region=RO).

1,10-Fenantrolina implică mai multe proprietăţi structurale şi chimice atrăgătoare: rigiditate, planeitate, aromaticitate, bazicitate, capacitate de chelare. Acest lucru îl face un material de pornire versatil pentru chimia organică sintetică, anorganică şi supramoleculară. Se cunoaşte că poate fi utilizat la elaborarea diferitor reagenţi biorganici (P. G. Sammes et al. 1,10-Phenanthroline: a versatile ligand. Chem. Soc. Rev., 1994, 327-334, doi: 10.1039/CS9942300327).

Derivaţii de fenantrolină sunt adaptaţi pentru a furniza produse chimice utilizate în scopuri destul de diferite cum ar fi erbicide, sonde analitice sau farmaceutice. Este cunoscut că proprietăţile 1,10-fenantrolină (o-fenantrolină) - o substanţă organică înrudită cu compuşii condensaţi heterociclici, ca inhibitor al dezvoltării cancerului de viţă-de-vie au fost stabilite prin testarea efectului inhibitor al creşterii bacteriei *Rhizobium* (Agrobacterium) *vitis* (MD 1459 Y 2020.10.31).

Utilizarea acestui compus ca produs pentru eliminarea şi suprimarea bolilor cauzate de fitoplasme la viţa-de-vie nu a fost descrisă în literatura de specialitate.

În prezent, în practica de protecţie a plantelor nu există preparate pentru acţiune directă asupra agenţilor patogeni ai acestui tip de boli. Direcţia principală în lupta împotriva bolilor virale, fitoplasmatice şi bacteriene este producerea şi propagarea de clone de viţă-de-vie libere de aceste boli.

Lipsa substanţelor chimice utile în lupta împotriva acestei boli a condus la faptul că în Republica Moldova boala este larg răspândită şi apare în toate ariile de cultivare a viţei-de-vie. Problemele legate de combaterea acestei boli sunt în prezent relevante pentru viticultură.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenţie constă în extinderea arsenalului de substanţe care pot fi utilizate ca produs pentru eliminarea şi suprimarea bolilor fitoplasmatice la viţă-de-vie.

Esenţa invenţiei constă în faptul că se propune aplicarea amestecului de triclorură de hexaamină de cobalt(III) şi 1,10-fenantrolină, luate într-un raport respectiv de 1:2, în calitate de produs contra bolii fitoplasmatice *Bois noir* la viţa-de-vie.

Rezultatul tehnic al invenţiei constă în combaterea şi profilaxia bolii fitoplasmatice *Bois noir* la viţa-de-vie, cu un amestec simplu de obţinut şi aplicat, cu un preţ redus.

Invenţia se explică prin tabelele 1 şi 2 şi desenul din figură, care reprezintă:

- Tabelul 1: Efectul tratamentului cu produsul revendicat asupra bolilor cu fitoplasmă la viţă-de-vie (FD/BN);
- Tabelul 2: Primerii pentru amplificarea fragmentului cu lungimea 830 pb la prima etapă PCR şi 720 pb la etapa a doua PCR;
- Figura: Amplificarea fragmentului cu lungimea 830 bp la prima etapă PCR (nu se evidenţiază prin electroforeză) şi 720 bp la etapa a doua nested PCR (apare un fragment intensiv în regiunea 720 bp în cazul eliminării incomplete a BN) cu perechile de primeri BN. Sunt demonstrate rezultatele de eliminare a BN la trei eşantioane din cinci testate după termoterapie şi eliminarea a BN la patru eşantioane din cinci testate după chimioterapie. Marcherii moleculari cu dimensiunile fragmentelor sunt plasaţi pe partea stângă şi urmează controlul pozitiv BN şi controlul negativ BN.

Procedeul de obţinere al acestui preparat este uşor şi clar în executare, substanţele iniţiale sunt accesibile. Preparatul revendicat este stabil în contact cu aerul, solubil bine în apă, etanol şi dimetilsulfoxidă.

Exemplu de preparare a soluţiei.

S-au amestecat o soluţie conţinând clorură de hexaamină de cobalt(III) (0,2 mmol; producător – Sigma-Aldrich, număr CAS: 10534-89-1) în 10 mL apă şi 1,10-fenantrolină (0,4 mmol; producător – Sigma-Aldrich, număr CAS: 66-71-7) în 10 mL etanol şi s-au adăugat 30 mL dimetilsulfoxid.

Metoda de tratare antifitoplasmatică.

Pentru prima dată, a fost efectuată o comparaţie a eficacităţii diferitelor metode, inclusiv metoda termo- şi chimioterapiei pe acelaşi material (probă, genotip, clonă). Diferenţele în eficacitatea metodelor de vindecare termo- şi chimioterapie au fost determinate prin metoda nested-PCR utilizată pentru detecţia prezenţei fitoplasmei agentului cauzal al bolii înnegrirea lemnului de viţă-de-vie în probele studiate din soiul Chardonnay.

Probe pozitive cu BN au fost identificate din probele de control din experiment. Un control pozitiv şi unul negativ au fost prelevate din probele infectate şi sănătoase analizate pentru prezenţa BN. Acizii nucleici totali au fost izolaţi din părţi de lăstari întregi (viţă-de-vie lemnoasă) utilizând protocolul de extracţie CTAB (E. Angelini, et al. Vitis, 2001, 40, 79–86, doi:10.5073/vitis.2001.40.79-864). Primerii utilizaţi pentru prima etapă de amplificare au fost regiunea 16 SrXII: STOL11f2/STOL11r1, pentru a doua: STOL11f3/STOL11r2 (X. Daire et al. European Journal of Plant Pathology, 1997, 103, 507-514, doi:10.1023/A:1008641411025) (Tabelul 2). Produşii PCR au fost separaţi prin electroforeză în gel de agaroză, coloraţi cu bromură de etidiu şi vizualizaţi într-un transiluminator cu lumină ultravioletă.

Pentru termo- şi chimioterapie s-au folosit probe prelevate de pe o viţă-de-vie. În acest scop, din parcela experimentală s-au prelevat corzi din plante cu simptome de fitoplasmă, fiecare conţinând 12-15 muguri. Din coardă s-a tăiat butaşi cu doi muguri în jumătate pentru experimentul de termo- şi chimioterapie. Înainte de termoterapie, butaşii au fost înmuiaţi în apă timp de 24 de ore. Termoterapia s-a efectuat cu apă fierbinte la 50ºC timp de 45 de minute.

Chimioterapia s-a efectuat fără înmuiere prealabilă în apă, tratamentul cu soluţia preparatului, care conţine triclorură de hexaamină de cobalt(III) şi 1,10-fenantrolină în concentraţie de 0,1%, s-a efectuat prin înmuierea butaşilor cu doi muguri timp de 42 de ore. După terapie, probele au fost testate pentru prezenţa agentului patogen (Figura 1).

În baza datelor obţinute s-a constatat că tratarea butaşilor de viţă-de-vie cu soluţia preparatului propus elimină şi suprimă boala fitoplasmatică înnegrirea lemnului.

Avantajele oferite de invenţie: preparatul revendicat este stabil în contact cu aerul, bine solubil în apă, etanol şi dimetilsulfoxidă.

Aplicarea practică a rezultatelor obţinute este promiţătoare pentru ameliorarea stării viţei-de-vie şi în scopuri preventive pentru a evita răspândirea materialului afectat de *Bois noir* în timpul înmulţirii în pepiniere.

Tabelul 1

	Varianta	Soi	Numărul de eşantioane	Rezultat (test PCR)	
				FD	BN
Control	1	Chardonnay	3	1	2
	2	Chardonnay	5	2	3
	3	Chardonnay	3	3	0
Total			11	6	5
Termoterapie	1	Chardonnay	3	0	2
	2	Chardonnay	5	0	0
	3	Chardonnay	3	0	0
Total			11	0	2
Chimioterapie	1	Chardonnay	3	1	1
	2	Chardonnay	5	2	0
	3	Chardonnay	3	3	0
Total			11	6	1

*Diagnostic prin metoda oficială franceză DUPLEX NESTED END-POINT PCR, MOA006A-1b, pentru detectarea *Flavescence dorée* (FD) şi *Bois noir* (BN).

Tabelul 2

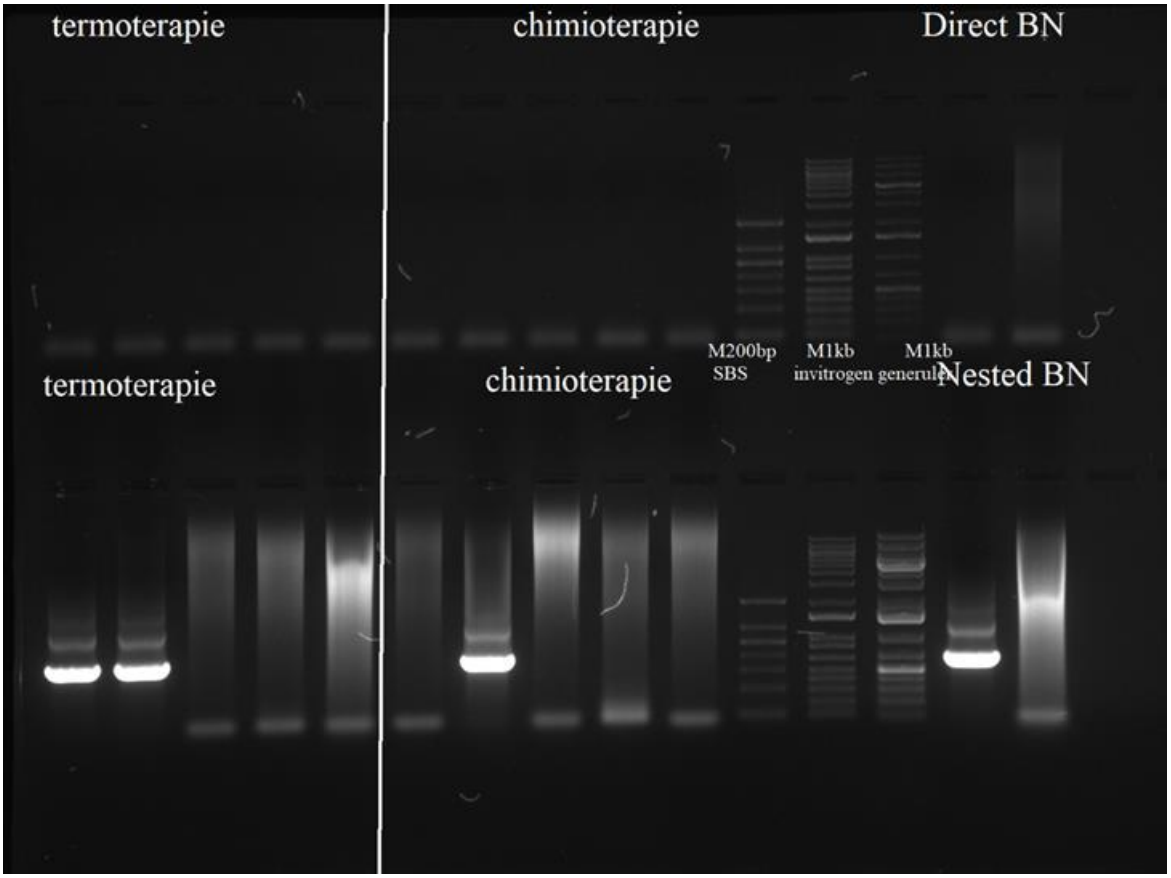
Primeri denumire	Secvenţe baze	Referinţe	Lungime
1-amplificare - STOL - 16 SrXII (BN) pereche de primeri specifici grupei			
STOL11f2	5’-TATTTTCCTAAAATTGATTGGC-3’	Daire *et al.*, 1997 doi: 10.1023/A:1008641411025	830 bp
STOL11r1	5’-TGTTTTTGCACCGTTAAAGC-3’		
2-amplificare - STOL -16 SrXII (BN) pereche de primeri specifici grupei			
STOL11f3	5’-ACGAGTTTTGATTATGTTCAC-3’	Clair *et al.*, 2003 doi: 10.5073/vitis.2003.42.151-157	720 bp
STOL11r2	5’-GATGAATGATAACTTCAACTG-3’		

(56) Referinţe bibliografice citate în descriere:

1. Krizan B. et al. Thermotherapy of Grapevines and Apricots by Reason of Viruses and Phytoplasma Elimination, Acta Hort.781, 2008, p. 93-96

(57) Revendicări:

Aplicarea amestecului de triclorură de hexaamină de cobalt(III) şi 1,10-fenantrolină, luate într-un raport respectiv de 1:2, în calitate de produs contra bolii fitoplasmatice *Bois noir* la viţa-de-vie.


termoterapie
chimioterapie
Direct BN
M200bp
SBS
M1kb
invitrogen
M1kb
generuler
termoterapie
chimioterapie
Nested BN