



(11) **RO 126125 B1**

(51) **Int.Cl.**

C12N 1/14 (2006.01),
A01N 63/04 (2006.01),
C12R 1/885 (2006.01),
C12P 1/02 (2006.01),
C05F 11/08 (2006.01)

(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2009 00350**

(22) Data de depozit: **05.05.2009**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **28.12.2012** BOPI nr. **12/2012**

(41) Data publicării cererii:
30.03.2011 BOPI nr. **3/2011**

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

(72) Inventatori:
• **SESAN TATIANA, BD.IULIU MANIU
NR.55, BL.17, AP.208, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**

• **OANCEA FLORIN, STR. PAȘCANI NR.5,
BL.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **ȘTEFAN AURORA LILIANA,
BD.ION IONESCU DE LA BRAD NR.8,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **LUPU CARMEN, INTRAREA BĂRSEI
NR.5, BL.G 3, AP.25, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **ILIESCU HORIA, ALEEA STĂNILĂ NR.2,
BL.H 12, AP.12, SECTOR 3, BUCUREȘTI,
B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**US 7070984 (B2); US 4489161 (A);
RU 2170511 (C2)**

(54) **TULPINĂ ANTAGONISTĂ DE *TRICHODERMA VIRIDE* ȘI
PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI BIOPREPARAT
ANTIFUNGIC PE BAZĂ DE ACEASTA**



1 Invenția se referă la o tulpină antagonistă de *Trichoderma viride*, Td₅₀, depozitată cu
2 numărul (P) 001358, la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms,
3 NCAIM, Budapesta, și la un procedeu de obținere a unui biopreparat antifungic cu aceasta.

4 Sunt cunoscute mai multe tulpini de ciuperci antagoniste, aparținând genului
5 *Trichoderma*. **US 5266316 A** descrie izolatul T-39 de *Trichoderma harzianum*, depozitat cu
6 numărul I-952, la Collection Nationale de Culture de Microorganismes, Paris. Acest izolat are
7 o rezistență ridicată la fungicide și este activ față de ciupercile producătoare de mucegaiuri
8 (*Botrytis cinerea* și *Sclerotinia sclerotiorum*). Biopreparatul pe baza acestui izolat este obținut
9 prin uscarea și granulara unei culturi pe mediu (semi)solid; acest mediu conține amidon ca
10 sursă de carbon și celită ca suport pentru reținerea apei. Compoziția rezultată în final, care
11 conține cel puțin 10⁵ ufc/g, este destinată aplicării tratamentelor în vegetație.

12 **US 5422107 A** prezintă tulpina SK-55 de *Trichoderma harzianum*, număr de depozit
13 BP 4346 NIBH, Japonia. Biopreparatul pe baza acestei tulpini este destinat pentru tratament
14 la sol. Acest biopreparat este realizat prin cultivare septică, pe un mediu conținând tărâte de
15 grâu umectate la 90% apă, care este repartizat în tăvi de aluminiu.

16 **US 7070 984 B2** protejează tulpina *Trichoderma viride* Li49, depozitată la ATTC cu
17 numărul PTA-1225. Tulpina este cultivată aseptice pe un mediu lichid, iar biomasa este
18 recuperată și adăugată în proporție de cel puțin 10%, într-un suport organic alcătuit din
19 boabe de cereale, turbă și compost. Biopreparatul astfel rezultat este utilizat pentru
20 tratamentul solului.

21 **US 4489161 A** descrie o tulpină de *Trichoderma viride*, numită T-1-R9. O cultură
22 viabilă de *Trichoderma viride* T-1-R9 a fost depusă în colecția de culturi la Northern
23 Regional Research Center, U. S. Departament of Agriculture, Peoria, 61604, cu numărul de
24 acces NRRL 15165. Această tulpină este înalt producătoare de conidii și clamidospori, este
25 tolerantă la fungicidele din clasa metil-benzimidazol-carbamaților și are capacitatea de
26 inhibare/stopare și control a fusariozei la crizanteme cauzate de *Fusarium oxysporum* f. *Sp.*
27 *chrysanthemi*.

28 Brevetul **RU 2170511 C2** se referă la producerea de agenți utilizați în protecția
29 plantelor. Preparatul pentru protecția plantelor împotriva bolilor conține, în procente de masă:
30 biomasă de *Trichoderma viride* Pers ex S.F.Gray, 16 TSKM F-59M, 80-90; celuloză
31 microcristalină 5-10; săruri de magneziu 5-10. Preparatul prezintă activitate antagonistă
32 împotriva unui spectru larg de patogeni ai culturilor agricole și poate fi folosit în combinație
33 cu pesticide chimice.

34 Brevetul **RU 2186847 C2** prezintă tulpina de *Trichoderma viride* 23 cu proprietăți
35 fungicide, folosită pentru obținerea unui biopreparat complex, cu proprietăți fungicide și de
36 fertilizator bacterian și un procedeu de preparare a biopreparatului. Tulpina *Trichoderma*
37 *viride* 23 este obținută prin selecția analitică a unor izolate naturale, obținute prin screeningul
38 după incubarea eluatului de pe suprafața piersicilor, pe mediu agarizat. Pentru prepararea
39 bioprodusului conținând tulpina, se procedează astfel: 10 g (ml) din cultură de *Trichoderma*
40 *viride* 23, crescută pe mediu nutritiv lichid Chapek Dox, sunt adăugate peste borhot de sfeclă
41 steril, conținând următoarele suplimente nutritive: K₂HPO₄, carbamidă, carbonat de calciu,
42 sucroză, în cantitate totală de 2,4 g/100 biopreparat. Mixtura obținută se amestecă, iar apoi
43 se adaugă 10 g (ml) din cultura de *Az. Chroococcum*, tulpina 2E-16, crescută în mediu lichid
44 Fedorov cu melasă și un amestec de microelemente Zn, Fe, Mo, Cu, Mg, Mn, în procent de
45 0,1% (în total), peste amestecul sub formă de soluție apoasă. Amestecul este agitat viguros
46 și lăsat pentru creștere suplimentară la aceeași temperatură, cu agitare periodică de 2...3
47 ori/ 24 h. Preparatul obținut, utilizat în creșterea plantelor, le scade vulnerabilitatea la boli și
determină o creștere a producției.

Niciuna dintre tulpinile descrise până în prezent nu a fost destinată tratamentului resturilor vegetale și reducerii pe această cale a inoculului primar de agenți fitopatogeni și, implicit, a riscurilor de dezvoltare epidemică a bolilor plantelor în următorul ciclu de vegetație. Nu au fost dezvoltate biopreparate pe bază de tulpini antagoniste din genul <i>Trichoderma</i> , destinate managementului fitosanitar al resturilor vegetale și nici procedee de obținere a unor astfel de biopreparate.	1 3 5
Problema pe care o rezolvă invenția de față constă în tratamentul fitosanitar al resturilor vegetale.	7
Tulpina antagonistă de <i>Trichoderma viride</i> , Td ₅₀ , conform invenției, este depozitată cu numărul (P) 001358, la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms, NCAIM, Budapesta, și prezintă un antagonism puternic față de ciupercile fitopatogene: <i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>Pythium ultimum</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Alternaria alternata</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>Stemphylium radicum</i> .	9 11 13
Procedeul de obținere a unui biopreparat antifungic pe bază de <i>Trichoderma viride</i> Td ₅₀ , conform invenției, cuprinde următoarele etape: trecerea borhotului de la fabricarea (bio)etanolului într-un amestecător universal; adăugarea de superfosfat în proporție de 0,4...0,5%, pentru normalizarea pH-ului și a conținutului de potasiu; inocularea cu 0,1% biopreparate hidrogelificate pe bază de <i>Trichoderma viride</i> Td ₅₀ , realizate prin uscarea granulelor formate după cultivarea timp de 7 zile a ciupercilor Td ₅₀ pe un mediu cu următoarea compoziție: 2 g KH ₂ PO ₄ ; 1,4 g (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 0,3 g CaCl ₂ ·2H ₂ O; 0,3 g MgSO ₄ ·7H ₂ O; 0,6 g uree; 10 mg FeSO ₄ ·7H ₂ O; 2,8 mg ZnSO ₄ ·2H ₂ O, 3,2 mg CoCl ₂ ·6H ₂ O, sirop de glucoză 80% 15 ml, 7 g hidrogel superadsorbant pe bază de poli(acrilamidă și poli(acrilat de potasiu, apă până la 1 l; menținerea timp de 7...8 zile, a compoziției de mai sus, amestecând cu o frecvență de o rotație pe oră, pentru aerarea substratului.	15 17 19 21 23
Invenția prezintă următoarele avantaje:	25
- tulpina Td ₅₀ , fiind izolată de pe resturi vegetale, are o mare capacitate de colonizare a unui astfel de substrat; această capacitate de colonizare, adăugată proprietăților antagoniste față de diferiții agenți fitopatogeni, asigură reducerea inoculului primar dezvoltat pe aceste resturi vegetale;	27 29
- procedeul de bioconversie folosit determină o exprimare ridicată a enzimelor care degradează material lignocelulozic, borhotul fiind un astfel de material rezultat din solubilizarea măcinșului de boabe de grâu cu amilaze;	31
- procedeul de bioconversie include etape de normalizare a caracteristicilor fizico-chimice definitorii pentru dezvoltarea ciupercilor (cum este pH-ul și conținutul de fosfor), permițând astfel realizarea unui biopreparat cu proprietăți constante.	33 35
Prezenta invenție se ilustrează prin următorul exemplu.	
Exemplu. <i>Trichoderma viride</i> Pers., tulpina Td ₅₀ , a fost izolată de pe resturi vegetale (vreji de fasole), din ferma Cornești, județul Dâmbovița. Încadrarea taxonomică a tulpinii de <i>Trichoderma viride</i> Td ₅₀ este: <i>Filumul Ascomycota</i> , <i>Clasa Sordariomycetes</i> , <i>Ordinul Hypocreales</i> , <i>Familia Hypocreaceae</i> , <i>genul Trichoderma</i> .	37 39
Caracteristicile morfologice ale tulpinii Td ₅₀ sunt descrise mai jos:	41
Dezvoltarea coloniei: 4,5...7,5(-9,0) cm diametru după 5 zile, pe mediul CGA, inițial ± hialină, ulterior albicioasă-verde, cu zone de mănunchiuri de conidiofori albastru-verzi; reversul coloniei necolorat.	43
Conidiofori: ramificați piramidal, cu ramuri mai scurte spre apex; Fialide: în grupuri de 2...4, destul de subțiri și adesea curbate, de (6)8...14(-20) x 2,4...3,0 μm.	45
Conidii subgloboase sau elipsoidale, de 3,6...4,5 μm în diametru, cu pereții aspri;	47

1 Clamidospori prezenți în miceliul culturilor mai vârstnice, intercalări și uneori terminali,
cel mai adesea globoși, hialini, cu pereții netezi.

3 Caracteristicile fiziologice, de utilizare a diferitelor substraturi, sunt descrise în cele ce
urmează.

5 Surse de carbon optime: manita, fructoza, riboza, glucoza (dextroza), galactoza,
manoza; dezvoltare fungală moderată pe: arabinoză, sorboză, melibioză, maltoză, lactoză,
7 celobioză, celuloză, amidon, inulină; dezvoltare fungală slabă pe: sorbitol, xiloză, zaharoză
(sucroză), glicerol.

9 Surse de azot optime: DL-leucina, L-cystina, DL-citrulina, DL-nor-leucină, azotatul de
amoniu, tartratul de amoniu; dezvoltare fungală moderată pe: L-arginină, L-leucină, glicocol,
11 asparagină, riboflavină, sulfat de amoniu, carbonat de amoniu, fosfat monobazic; dezvoltare
fungală slabă pe: triptofan, tirozină, D-serină, lizină, uree, azotați de sodiu, calciu și potasiu.

13 Caracteristicile fizice de creștere și sporulare sunt:
Temperatura optimă: 20...25°C; temperatura minimă: 2°C; temperatura maximă: 37°C;

15 Reacția substratului de cultură: pH optim: 4.0...5.5; dezvoltare slabă a ciupercii la
valori de pH de la 9,0 la 13,0;

17 Tulpina Td₅₀ este puternic antagonistă față de ciupercile fitopatogene: *Fusarium*
graminearum, *F. culmorum*, *Pythium ultimum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*,
19 *Sclerotinia sclerotiorum*, *Stemphylium radicinum* ș.a.

Pentru obținerea biopreparatului, s-a aplicat următorul procedeu:

21 - tulpina Td₅₀ de *Trichoderma viride* este cultivată pe mediu Weidling agarizat,
repartizat în eprubete cu mediu înclinat. Cultura de pe mediu agarizat este reluată și utilizată
23 pentru inocularea mediului hidrogelificat, de multiplicare industrială, cu următoarea
compoziție: 2 g KH₂PO₄; 1,4 g (NH₄)₂SO₄; 0,3 g CaCl₂·2H₂O; 0,3 g MgSO₄·7H₂O; 0,6 g uree;
25 10 mg FeSO₄·7H₂O; 2,8 mg ZnSO₄·2H₂O, 3,2 mg CoCl₂·6H₂O, sirop de glucoză 80% 15 ml,
7 g hidrogel superadsorbant pe bază de poliacrilamidă și poliacrilat de potasiu Aquasorb și
27 apă până la 1 l. Mediul hidrogelificat este repartizat în pungi de polietilenă, sterilizat prin
autoclavare la 121°C și inoculat cu ciuperci *T. viride* Td₅₀. După 7 zile, amestecul semisolid,
29 hidrogelificat, rezultat este omogenizat cu un turbomixer și uscat pe sită de inox și hârtie de
filtru, în curent de aer cald la 35°C.

31 Procedeu de conversie a borhotului de la fabricarea etanolului într-un biopreparat
antifungic pe bază de *Trichoderma viride* Td₅₀ implică următoarele etape:

33 - trecerea substratului epuizat de la cultivarea ciupercilor *Pleurotus* într-un
amestecător universal;

35 - adăugarea de superfosfat în proporție de 0,4...0,5%, pentru normalizarea pH-ului
și a conținutului de potasiu;

37 - inocularea cu 0,1% biopreparate hidrogelificate pe bază de *Trichoderma viride* Td₅₀,
realizate prin uscarea granulelor, formate după cultivarea timp pe 7 zile a ciupercilor Td₅₀ pe
39 un mediu cu următoarea compoziție: 2 g KH₂PO₄; 1,4 g (NH₄)₂SO₄; 0,3 g CaCl₂·2H₂O; 0,3 g
MgSO₄·7H₂O; 0,6 g uree; 10 mg FeSO₄·7H₂O; 2,8 mg ZnSO₄·2H₂O, 3,2 mg CoCl₂·6H₂O,
41 sirop de glucoză 80% 15 ml, 7 g hidrogel superadsorbant pe bază de poliacrilamidă și
poliacrilat de potasiu Aquasorb, apă până la 1 l;

43 - menținerea, timp de 7...8 zile, a compoziției de mai sus, amestecând cu o frecvență
de o rotație pe oră, pentru aerarea substratului. Biopreparatul astfel obținut a fost testat din
45 punct de vedere al antagonismului față de *Fusarium graminearum* Schw. DSMZ 4527
(teleomorfa *Gibberella zea* Schw. Petch). Ciuperca toxigenă a fost cultivată pe mediu înclinat
47 cartof - glucoză - agar. După 7 zile de creștere, cultura a fost reluată în tampon fosfat salin,
pH 7,2, adusă la 10⁶ ufc/ml și inoculată (0,1 ml/g) peste paie de grâu sterilizate prin

RO 126125 B1

autoclavare. Același tratament a fost aplicat și unor variante experimentale tratate aseptice (anterior, concomitent sau ulterior) cu biopreparat realizat conform exemplului (0,1 g la 10 g de paie) și cu inocul de *T. viride* Td₅₀, reluat de pe mediu Weidling agarizat, înclinat (inoculare 0,1 ml suspensie 10⁶ ufc/ml/1 g de paie).

Paiele au fost trecute apoi aseptice pe plăci Roux, închise cu dopuri de vată, care conțineau câte 5 g de vermiculit steril, umectat cu câte 5 ml de apă sterilă. Plăcile au fost incubate timp de 21 zile, la 25°C și în lumină fluorescentă cu dominantă în UV apropiată (2 lămpi F40 BLB, două lămpi F40 CWX, Philips). Vermiculitul a fost reumectat de două ori pe săptămână.

Captarea ascosporilor s-a realizat cu ajutorul unor lamele de microscop 25 x 75 mm, tratate cu silicon și plasate la 10 mm de gâtul plăcii Roux. După 21 de zile, s-a lăsat vermiculitul să se usuce timp de 5 zile, după care a fost reumectat abundent cu 7 ml de apă sterilă. Această alternanță a favorizat ejectarea sporilor din apoteci. Sporii captați în uleiul silionic au fost numărați la microscop, pe 25% din suprafața lamelei. Fiecare variantă experimentală a fost realizată în trei repetiții, iar întregul experiment a fost repetat o dată.

Datele au fost interpretate pe baza testului Friedman pentru măsurări repetate. Rezultatele sunt prezentate în tabelul de mai jos.

Tabel

Influența aplicării biopreparatului pe bază tulpinii 7 viride Td₅₀ și a suspensiei de ciuperci antagoniste 7. viride Td₅₀ asupra producerii de ascospori de către Fusarium graminearum DSMZ 4527 (teleomorfa Gibberella zea)

Varianta experimentală	Ascospori (x10 ⁵)/cm ² de substrat ^z	% față de martor
Martor, paie de grâu neinoculate cu microorganisme antagoniste, inoculare 0,1 ml suspensie 10 ⁶ ufc/ml/g de paie	12,2 a	-
Preinoculat cu biopreparat conform exemplului 1, inoculare 0,1 ml suspensie 10 ⁶ ufc/ml/g de paie	1,27 d	10,41
Inoculat concomitent cu biopreparat conform exemplului 1, inoculare 0,1 ml suspensie 10 ⁶ ufc/ml/g de paie	2,49 c	20,41
Postinoculat cu biopreparat conform exemplului 1, inoculare 0,1 ml suspensie 10 ⁶ ufc/ml/g de paie	3,72 c	30,49
Preinoculat cu 0,1 ml suspensie Td ₅₀ 10 ⁶ ufc/ml/g de paie, inoculare 0,1 ml suspensie 10 ⁶ ufc/ml/g de paie	1,22 d	10,00
Inoculat concomitent cu 0,1 ml suspensie Td ₅₀ 10 ⁶ ufc/ml/g de paie, inoculare 0,1 ml suspensie 10 ⁶ ufc/ml/g de paie	2,43 c	19,92
Postinoculat cu 0,1 ml suspensie Td ₅₀ 10 ⁶ ufc/ml/g de paie, inoculare 0,1 ml suspensie 10 ⁶ ufc/ml/g de paie	5,15 b	42,21

z - valorile urmate de aceeași literă nu diferă semnificativ pentru testul Friedman la 0,05 nivel de încredere

Rezultatele demonstrează că tulpina Td₅₀ este eficientă în reducerea dezvoltării și sporulării ciupercilor fitopatogene și toxigene *F. graminearum*. Tulpina condiționată sub formă de biopreparat este mai eficientă în cazul aplicării după inocularea cu ciuperci toxigene. Acest fapt, similar celui care apare în condiții naturale, este datorat probabil exprimării semnificative a enzimelor implicate în metabolizarea substratului lignocelulozic în ciupercile Td₅₀ condiționate sub formă de biopreparat.

Revendicări

1. Tulpină antagonistă de *Trichoderma viride*, Td₅₀, depozitată cu numărul (P) 001358, la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms, NCAIM, Budapesta, prezentând un antagonism puternic față de ciupercile fitopatogene: *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *Pythium ultimum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Sclerotinia sclerotiorum* și *Stemphylium radicinum*.

2. Procedeu de obținere a unui biopreparat antifungic, pe bază de *Trichoderma viride* Td₅₀, definită în revendicarea 1, **caracterizat prin aceea că** este alcătuit din următoarele etape: trecerea borhotului de la fabricarea (bio)etanolului într-un amestecător universal; adăugarea de superfosfat în proporție de 0,4...0,5%, pentru normalizarea pH-ului și a conținutului de potasiu; inocularea cu 0,1% biopreparate hidrogelifiate pe bază de *Trichoderma viride* Td₅₀, realizate prin uscarea granulelor formate după cultivarea, timp de 7 zile, a ciupercilor Td₅₀, pe un mediu cu următoarea compoziție: 2 g KH₂PO₄; 1,4 g (NH₄)₂SO₄; 0,3 g CaCl₂·2H₂O; 0,3 g MgSO₄·7H₂O; 0,6 g uree; 10 mg FeSO₄·7H₂O; 2,8 mg ZnSO₄·2H₂O; 3,2 mg CoCl₂·6H₂O, sirop de glucoză 80% 15 ml, 7 g hidrogel superadsorbant pe bază de poliacrilamidă și poliacrilat de potasiu, apă până la 1 l; menținerea timp de 7...8 zile a compoziției de mai sus, amestecând cu o frecvență de o rotație pe oră, pentru aerarea substratului.



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit sub comanda nr. 656/2012