



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2015 00921

(22) Data de depozit: 27/11/2015

(41) Data publicării cererii:
30/06/2016 BOPI nr. 6/2016

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
ȘTIINȚE BIOLOGICE, BUCUREȘTI,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR. 296,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• ECOFRUCT S.R.L.,
STR. AGRICULTORULUI NR. 37,
COMUNA ȘTEFAN CEL MARE, CL, RO

(72) Inventatori:
• OANCEA ANCA OLGUȚA, STR. PAȘCANI
NR. 5, BL. D7, SC. E, AP. 45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;
• PETRUȘ VIORICA,
STR. AGRICULTORULUI NR. 37,
COMUNA ȘTEFAN CEL MARE, CL, RO;
• PETRUȘ AUREL, STR.
AGRICULTORULUI NR. 37,
COMUNA ȘTEFAN CEL MARE, CL, RO;

• PETRUȘ ADRIAN-MIHAI,
STR. AGRICULTORULUI NR. 37,
COMUNA ȘTEFAN CEL MARE, CL, RO;
• CRĂCIUNESCU OANA,
BD.NICOLAE GRIGORESCU NR.33, BL.A 1,
SC.3, AP.33, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;
• ȘTEFAN LAURA MIHAELA,
STR. DEALUL TUGULEA NR. 54, BL. B9,
SC. A, AP. 26, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;
• SECIU ANA-MARIA,
BD. 1 DECEMBRIE 1918, NR. 22, BL. 3,
SC. 1, AP. 28, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;
• COROIU VIORICA,
STR.DEALUL TUGULEA NR.46-50, BL. 12,
SC.B, AP.50, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO

(54) **PROCEDEU DE BIOFORTIFIERE PROTECTIVĂ CU SELENIU
A CULTURILOR DE CRUCIFERE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de biofortifiere protec-
tivă a culturilor de crucifere. Procedeu conform inven-
ției constă în aplicarea prin stropire a 200 l/ha de mace-
rat fermentat de urzică diluat la 20%, la 20 zile de la
înfiișarea culturilor de crucifere, prin transplantarea în
câmp a răsadurilor de varză, conopidă sau broccoli,

aplicarea prin stropire a 100 l/ha selenat de sodiu
0,005%, amestecat cu 100 l macerat fermentat de
urzică diluat la 20%, la 10 până la 40 zile de la trata-
mentul inițial cu macerat de urzică.

Revendicări: 2

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



27

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. a 2015 00921
Data depozit 27-11-2015

PROCEDEU DE BIOFORTIFIERE PROTECTIVĂ CU SELENIU A CULTURILOR DE CRUCIFERE

Oancea Anca Olguta, Petrus Vionica, Petrus Aurel, Petrus Adrian-Mihai,
Craciunescu Oana, Stefan Laura Mihaela, Seciu Ana-Maria, Coroiu Viorica

Prezenta invenție se referă la un procedeu de biofortifiere protectivă cu seleniu a culturilor de crucifere, al cărui scop este de a asigura atât suplimentarea sigură și eficientă a lanțului alimentar cu seleniu, cât și protejarea plantelor de crucifere împotriva stresurilor abiotice (lipsă apă, temperaturi ridicate, radiație solară excesivă) și biotice (boli și dăunători).

Sunt cunoscute diferite procedee de biofortifiere cu seleniu a diferitelor culturi agricole, prin aplicarea de tratamente cu diferite compoziții care includ compuși ai seleniului, în diferite stadii de vegetație, pentru creșterea nivelului de seleniu în recolta utilă. Biofortifierea pe lanțul alimentar prin tratamente aplicate plantelor (biofortifierea agronomică) prezintă avantajul unei suplimentări cu nivele controlate de seleno-compuși cu o biodisponibilitate ridicată, larg accesibilă diferitelor categorii de populație expusă riscurilor de boli cronice (Oancea et al., 2014, *Studia Universitatis "Vasile Goldiș" Arad, Seria Științele Vieții*, 24, 47-56). Procedeele / compozițiile dezvoltate au ca scop suplimentarea cu seleniu a lanțului alimentar din zonele cu deficit de seleniu și sunt destinate rezolvării problemelor tehnice rezultate din necesitatea aplicării foarte precise și uniforme a unor doze mici de compuși foarte toxici.

Brevetul SUA 6058648 se referă la o compoziție pe bază de săruri solubile de seleniu (de ex. selenat de sodiu) și polimeri hidrosolubili (de ex. amestec de poliacetat de vinil/dextrină sau copolimer de acetat de vinil / etilenă), destinată tratării semințelor. Aplicarea ca tratament al seminței permite de asemenea o distribuție uniformă a unor doze mici de produs, iar selenatul aplicat radicular este translocat prin floem și se acumulează sub formă de compuși organo-seleniați în bobul de grâu format din plante astfel tratate.

Brevetul RO RO127511 descrie un procedeu de biofortifiere cu seleniu a recoltei de grâu, care implică aplicarea unor doze mici de seleniu chelat în plasmolizat de drojdie, împreună cu rizobacterii care stimulează dezvoltarea plantelor și preluarea seleniului, ca tratament al brazdei în care se introduc semințele de grâu.

Pentru a mări biodisponibilitatea seleniului introdus în sol, brevetul CN 10126011 prezintă o compoziție pe bază de 40...60% acid humic, 5...20% selenit de sodiu și 20...40% bioxid de siliciu. Brevetul nu descrie procedee de aplicare uniformă a acestei compoziții (în doze care sunt de ordinul kg per ha). Studiile recente (Chopin et al., 2009, *European Journal of Soil Science*, 60, 369-376) au demonstrat că acizii humici cresc gradul de adsorbție a seleniului pe complecșii din sol, reducând nivelul de regăsire a acestuia în soluția solului (de unde este preluat de sistemul radicular al plantelor). Deci acizii humici pot în unele tipuri de sol să reducă biodisponibilitatea seleniului.

Procedeele care implică aplicarea la sol au acest dezavantaj comun, reprezentat de reducerea biodisponibilității seleniului datorită interferențelor specifice în diferitele soluri, care sunt sisteme heterogene complexe și extrem de diverse. Calea de aplicare foliară este mult mai eficientă pentru biofortifierea agronomică cu seleniu (Winkel et al. 2015, *Nutrients*, 7(6), 4199-4239).

Cererea de brevet WO 1999029639 A2 protejează o compoziție lichidă pentru suplimentarea nutriției plantelor cu seleniu și azot prin combinarea seleniților solubili în apă cu carbamidă / uree ca sursă de azot și aplicare foliară simultană. Pentru a reduce fenomenele de fitotoxicitate asociate aplicării foliare a formelor solubile de seleniu, brevetul US 8246713 B2 revendică prepararea unei nanostructuri de fertilizant seleniat cu eliberare controlată. Procedeu de preparare implică amestecul unei roci carbonosilicioase, care conține 30...95% nanoparticule și în care conținutul de seleniu este mai mare de 0,5g/kg, cu un lichid cu pH 8 -10, obținut din dizolvarea în apă a KOH, K₂CO₃ și 20% amoniac, în proporție de 10:1:2. Brevetul nu prezintă procedee prin care să se asigure aplicarea uniformă a acestui revendicat nano-fertilizant pe bază de seleniu și metabolizarea optimă a acestuia de către plante, cu punerea în valoare a acțiunii biostimulante a seleniului.

Deși nu este recunoscut ca un element esențial pentru plante, s-a demonstrat că seleniul stimulează creșterea plantelor (Hartikainen și Xue, 1999, *Journal of*

Environmental Quality, 28, 1372-1375; Xue et al. 2001, *Plant and Soil*, 237, 55-61), are rol în protecția plantelor față de agenții fitopatogeni (Hanson et al. 2003, *New Phytologist*, 159, 461-4693), ameliorează rezistența plantelor la secetă, în care stresul hidric este combinat cu cel oxidativ (Wang, 2011, *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 174, 276-282). Toate aceste efecte, rezultate din acțiunea seleniului asupra fiziologiei plantelor, au determinat includerea seleniului în cadrul noi categorii de inputuri tehnologice pentru culturile agricole, biostimulanți pentru plante (du Jardin, 2015, *Scientia Horticulturae*, doi:10.1016/j.scienta.2015.09.021).

Se cunoaște un procedeu pentru stimularea creșterii plantelor și ameliorarea rezistenței lor la stres, prin care se aplică la tomate o compoziție obținută din biomasă de alge care include și seleniu. Compoziția este formată din hidrolizatul proteic obținut din biomasa de alge, suplimentat ulterior cu seleniu complexat, complexarea seleniului făcându-se prin amestecarea unei porțiuni din hidrolizatul proteic din biomasa de alge cu un compus cu seleniu insolubil în apă, ultrasonarea amestecului, separarea soluției de seleniu complexat cu aminoacizii prezenți în porțiunea de hidrolizat proteic de reziduul insolubil, și amestecarea acesteia în anumite proporții cu hidrolizatul proteic obținut din biomasa de alge (Cerere de brevet EP2735232 A1).

În cazul cruciferelor dezavantajul procedeelor cunoscute de aplicare a seleniului sunt în legătură cu riscurile de reducere a valorii biologice de aliment funcțional al cruciferelor biofortificate cu seleniu. Având în vedere că Se este analog al S, cu care are aceleași căi de preluare și asimilare în plante, au fost raportate interferențe între metabolismul Se și S în cruciferele biofortificate cu seleniu (trecute recent în revistă de Malagolie et al. 2015, *Frontiers in Plant Science*, 6: 280), care modifică acumularea de fitonutrienți cu sulf, în special glucozinolați.

Este necesar deci un procedeu prin care să se realizeze biofortifierea cu seleniu a cruciferelor, cu acumularea la nivele sigure și efective a seleniului, fără a se reduce conținutul în fitonutrienți valoroși cu sulf din aceste plante, sau fără a se stimula supraformarea potențial periculoasă a acestora.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a dezvolta un procedeu prin care să se realizeze biofortifierea cu seleniu a cruciferelor, cu reducerea impactului

seleniului aplicat asupra metabolismului sulfurului și formării de fitonutrienți cu sulf în respectivele crucifere tratate.

Un alt obiect al acestei invenții este de a realiza un procedeu prin care să se asigure exprimarea optimă a acțiunii biostimulante a seleniului asupra cruciferelor, în special în ceea ce privește toleranța plantelor la stresul hidric.

Procedeu, conform invenției, este alcătuit din următoarele etape:

- Aplicarea prin stropire a 200 litri/ha de macerat fermentat de urzică diluat la 20%, la 20 zile de la înființarea culturilor de crucifere, prin transplantarea în câmp a răsadurilor de varză, conopidă sau broccoli;
- Aplicarea prin stropire a 100 litri/ha soluție selenat de sodiu 0,005%, amestecate cu 100 litri macerat fermentat de urzică, diluat la 20%, la 10 și 40 zile de la tratamentul inițial cu macerat de urzică.

Maceratul fermentat de urzică utilizat în procedeu de mai sus este un produs obținut prin macerarea în apă de ploaie a urzicilor tocate, în raport de 1 kg organe aeriene, tulpini și frunze, de urzici tocate la 10 kg apă de ploaie, și fermentarea timp de 4...5 zile la temperatura de 18...20°C, și care conține cel puțin 0,1 mg/l poliamine totale, cel puțin 75 mg/l acid ortosilicic și minim 10 mg/l betaină.

Procedeu, conform invenției, prezintă următoarele avantaje:

- Activează metabolismul secundar din plante, datorită tratamentului inițial cu macerat de urzică, biostimulant tradițional pentru plante, înaintea tratamentului cu seleniu;
- Asigură o metabolizare optimă a seleniului în plante, datorită aportului de poliamine și betaină, care reechilibrează rezervorul metabolic de S-adenozil-metionină (SAM), suprasolicitat de metabolizarea selenatului la seleno-aminoacizi;
- Favorizează penetrarea selenatului de sodiu prin cuticula hidrofobă a plantelor, datorită efectului de plasticizare a acesteia ca rezultat a acțiunii surfactanților produși în timpul fermentării extractului de urzică;
- Sinergizează acțiunea protectivă și biostimulantă a seleniului cu cea a maceratului de urzică;

- Ameliorează răspunsul plantelor la stres datorită biostimulării graduale și repetate cu doze reduse de seleniu și macerat fermentat de urzică.

În continuare, se prezintă exemple de realizare a invenției, care o ilustrează fără a o limita.

Exemplul 1. Se înființează o cultură de varză de vară (*Brassica oleracea* var. *capitata*). După recoltarea culturii timpurii premergătoare verzei, se execută o arătură superficială, la 18-20 cm adâncime, și îngrășarea cu 30-40 de tone la hectar de compost de mranită, bine descompus, după care terenul se grăpează. Înainte cu 5-6 zile de plantarea răsadurilor, se administrează îngrășăminte complexe conform recomandărilor agrochimice, care se încorporează în sol la 6-8 cm adâncime. Răsadurile nerepicate de varză se scot cu grijă, se fuzionează și se mociresc, și se plantează pe teren modelat, în straturi înălțate, 2 rânduri pe strat, la distanță de 70 x 30 cm. Plantarea se face în perioada 15 aprilie – 10 mai.

La 20 zile înființarea culturii se aplică prin stropire 200 litri/ha de macerat fermentat de urzică diluat la 20%.

Maceratul de urzică utilizat se realizează conform următorului procedeu. Într-un butoi de plastic de 80 litri se introduc 5 kg de frunze și tulpini de urzici (*Urtica dioica*) tocate la dimensiuni mai mici de 0,5 cm. Se adaugă 50 litri de apă de ploaie (sau de apă dedurizată). Se menține timp de 4...5 zile la temperatura de 18...20°C, până la formarea mirosului caracteristic de poliamine. Maceratul de urzică fermentat se filtrează prin strat multiplu de tifon pentru reținerea particulelor grosiere de plantă.

Maceratul fermentat de urzică utilizat conține cel puțin 0,1 mg/l poliamine totale, cel puțin 75 mg/l acid ortosilicic și minim 10 mg/l betaină. Aceste ingrediente active au fost puse în evidență în maceratul fermentat de urzică (Petruș et al., 2015, *The 2nd World Congress on the Use of Biostimulants in Agriculture*, Florența, 16-19 noiembrie 2015, pg. 81-82), biostimulant pentru plante utilizat tradițional în agricultura ecologică (Li, 1994, *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 2, 93-98). Determinarea nivelului minim implicat de procedeu conform invenție din aceste ingrediente active se face conform unor metode cunoscute: poliamine, prin cromatografie de înaltă presiune, cu detector de fluorescență (Bouchereau et al., 2000, *Journal of Chromatography B*, 747, 49-67), acidul silicic, prin tehnica colorimetrică robustă descrisă de Kraska și

Breitenbeck, 2010, *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 41, 2075-20850, betaina, prin cromatografie de înaltă presiune izocratică – Bessieres et al., 1999, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(9), 3718-3722.

La 10 zile de la tratamentul inițial cu macerat de urzică, se aplică prin stropire 100 litri/ha soluție selenat de sodiu 0,005%, amestecat cu 100 litri macerat fermentat de urzică, diluat la 20%. Tratamentul se repetă după 40 zile de la tratamentul inițial cu macerat de urzică, respectiv 60 zile de la înființarea culturii din răsaduri.

Exemplul 2. Se procedează la fel ca în exemplu 1, numai că se cultivă conopidă, *Brassica oleracea* var. cauliflora.

Exemplul 3. Se procedează la fel ca în exemplu 1, numai că se cultivă broccoli, *Brassica oleracea* var. italica.

Exemplul 4. Procedeu de biofortifiere protectivă cu seleniu a culturilor de crucifere a fost testat într-un experiment de câmp, pe varză. S-a procedat conform exemplu 1, pe teren modelat, în straturi înălțate, 2 rânduri pe strat, la distanță de 70 x 30 cm, în data de 5 mai. Experimentul a fost organizat folosind un design de split-split complet, având în vedere și condițiile de udare. La 20 zile de la înființarea culturii s-au aplicat prin stropire 200 litri/ha de macerat fermentat de urzică diluat la 20%. La 10 zile de la tratamentul inițial cu macerat de urzică, s-au aplicat prin stropire 100 litri/ha soluție selenat de sodiu 0,005%, amestecat cu 100 litri macerat fermentat de urzică, diluat la 20%. Tratamentul s-a repetat după 40 zile de la tratamentul inițial cu macerat de urzică,

La 2 săptămâni după cel de-al doilea tratament, au fost recoltate probe de plante în care s-a analizat prin HPLC S-Adenozil-Homocisteină (SAH, produsul de metabolizare al SAM), seleniul total (spectrofotometrie de absorbție atomică cu generare de hidruri) și sulforafanul, metabolit secundar, indicator al metabolismului sulfurului.

Analiza HPLC a SAM și a sulforafanului a fost realizată cu un sistem HPLC Agilent 1200, cu detector DAD. Separarea lor a fost efectuată în coloană XDB C18 Zorbax (150 x 4,6 mm diametru interior), la debite de 0,6 mL/min și, respectiv, la 0,2 mL/min, și eluției în condiții izocratică, folosind gradient apă/acetone ca fază mobilă (Struys et al., 2000, *Clinical Chemistry*, 46, 1650-1656). Detectarea lor s-a efectuat la 202 nm și respectiv 258 nm și timpii de retenție lor ale picurilor au fost comparate cu cele obținute pentru standarde externe de SAM și sulforafan (Sigma Aldrich). Curbele de

etalonare au fost construite în intervalul de 5-100 µg/mL pentru sulforafan și 2.5-50 µg/mL pentru SAM și au fost utilizate pentru a cuantifica nivelele lor în probele analizate.

În final s-au recoltat variantele, s-a cântărit producția realizată și s-a exprimat în t/ha. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul 1.

Tabelul 1. Influența tratamentelor aplicate foliar la varză, folosind procedeul de biofortifiere protectivă conform invenției.

Variantă experimentală	Se Total (µg/g s.u.)	Sulfo- rafan (µg/g s.u.)	SAH (µg/g s.u.)	Producție totală (t/ha)
Martor, irigare zilnică prin picurare, 80% capacitate câmp	0.942 ± 0.15	218.25 ± 8.62	3.72 ± 0.18	32,8 ±3,2
Martor, stresat hidric, irigare prin picurare la două zile, 80% capacitate câmp	0.984 ± 0.18	279.37 ± 8.92	6.74 ± 0.27	21,8 ±2,9
Tratament conform Ex.1 + irigare zilnică prin picurare, 80% capacitate câmp	2.340 ± 0.23	203.54 ± 8.87	3.84 ± 0.16	33,2 ±2,1
Tratament conform Ex. 3, + stresat hidric, irigare prin picurare la două zile, 80% capacitate câmp	2.456 ± 0.28	251.41 ± 9.43	4.63 ± 0.18	29,8 ±3,5

Datele din tabelul 1 demonstrează faptul că prin aplicarea tratamentului conform Exemplul 1 se realizează concomitent biofortifierea cu seleniu și de protecție față de stresul hidric, prin biostimulare / activarea mecanismelor de apărare ale plantelor.

REVENDICĂRI

1. Procedeul, conform invenției, caracterizat prin aceea că este alcătuit din următoarele etape: aplicarea prin stropire a 200 litri/ha de macerat fermentat de urzică diluat la 20%, la 20 zile de la înființarea culturilor de crucifere, prin transplantarea în câmp a răsadurilor de varză, conopidă sau broccoli; aplicarea prin stropire a 100 litri/ha soluție selenat de sodiu 0,005%, amestecate cu 100 litri macerat fermentat de urzică, diluat la 20%, la 10 și 40 zile de la tratamentul inițial cu macerat de urzică.
2. Procedeul, conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că maceratul fermentat de urzică utilizat este un produs obținut prin macerarea în apă de ploaie a urzicilor tocate, în raport de 1 kg organe aeriene, tulpini și frunze, de urzici tocate la 10 kg apă de ploaie, și fermentarea timp de 4...5 zile la temperatura de 18...20°C, și care conține cel puțin 0,1 mg/l poliamine totale, cel puțin 75 mg/l acid ortosilicic și minim 10 mg/l betaină.