



(11) **RO 126363 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 01077**

(22) Data de depozit: **22.12.2009**

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

(41) Data publicării cererii:
30.06.2011 BOPI nr. **6/2011**

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

(72) Inventatori:
• **OANCEA FLORIN, STR.PAȘCANI NR.5,
BL.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**

• **SESAN TATIANA EUGENIA,
BD.IULIU MANIU NR.55, BL.17, SC.E, ET.9,
AP.208, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **LUPU CARMEN, INTRAREA BĂRSEI
NR.5, BL.G 3, AP.25, 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,
BIOPREPARAT ANTIFUNGIC PE BAZĂ DE ACEASTA ȘI
PROCEDEU DE OBȚINERE A ACESTUI BIOPREPARAT**



RO 126363 B1

1 Invenția se referă la o tulpină antagonistă de *Trichoderma viride*, Td₄₉, depozitată cu
2 numărul (P) 001357, la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms,
3 NCAIM, Budapesta, la un biopreparat antifungic cu aceasta și la un procedeu de obținere
4 a acestui biopreparat.

5 Sunt cunoscute mai multe biopreparate, pe bază de tulpini de ciuperci antagoniste
6 aparținând genului *Trichoderma*, care sunt destinate tratamentului la sol, în vederea formării
7 de soluri supresive. **US 4642131 A** expune un compost supresiv pentru ciupercile care
8 produc bolile complexului de răsărire (*Rhizoctonia solani*, *Pythium* spp., *Fusarium* spp.),
9 realizat pe baza tulpinilor de *Trichoderma hamatum* I 382 (ATCC 20765) și/sau I 559
10 (ATCC20764), în combinație cu *Flavobacterium* spp. I 299 (ATCC 53199) și *Pseudomonas*
11 *maltophila* I 76 (ATCC53198).

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 tărâțe de
15 grâu umectate la 90% apă, care este repartizat în tăvi de aluminiu.

16 **US 7070984 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 boabe
19 de cereale, turbă și compost. Biopreparatul astfel rezultat este utilizat pentru tratamentul
20 solului.

21 **EP 1400 586 A1** descrie un substrat de creștere supresiv, realizat pe baza ciupercii
22 antagoniste *Trichoderma asperellum* T34(2), depozitată CECT, No. 20147.

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

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

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

RO 126363 B1

și lăsat pentru creștere suplimentară la aceeași temperatură, cu agitare periodică de 2...3 ori/24 h. Preparatul obținut, utilizat în creșterea plantelor, le scade vulnerabilitatea la boli și determină o creștere a producției.	1 3
Niciuna dintre biopreparatele sau tulpinile de <i>Trichoderma</i> descrise până în prezent nu a fost destinată dezvoltării de soluri supresive pentru fusariile fitopatogene și toxigene, și reducerii pe această cale a riscurilor de dezvoltare epidemică a bolilor cerealelor boabe (înroșirea spicului de grâu, produsă de <i>Fusarium graminearum/Gibberella zae</i> ; înflorirea albă a boabelor de porumb, produsă <i>Fusarium verticilloides/Gibberella fujikuroi</i> , care sunt însoțite de contaminarea recoltei cu micotoxine.	5 7 9
Problema pe care o rezolvă invenția de față constă în combaterea fusariilor fitopatogene și toxigene prin dezvoltare de soluri supresive.	11
Tulpina antagonistă de <i>Trichoderma viride</i> , Td ₄₉ , conform invenției, este depozitată cu numărul (P) 001357, 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>Sclerotinia bataticola</i> , <i>Stemphylium radicinum</i> .	13 15
Biopreparatul conform invenției are următoarea compoziție: materie organică totală 22...27,5 părți, din care celuloză 10...12,5 părți, lignină 5...6,5 părți, acizi humici 2,5...3,5 părți, chitină 1,5...2 părți, substanțe azotate totale 2,5...3,5 părți, substanțe minerale totale (cenușă) 5...7,5 părți, apă până la 100 părți, părțile fiind exprimate în greutate, în biopreparat numărul de propagule de <i>Trichoderma viride</i> Td ₄₉ fiind mai mare de 1 million/1 gram de produs.	17 19 21
Procedeul de obținere a unui biopreparat antifungic, pe bază de <i>Trichoderma viride</i> Td ₄₉ , conform invenției, 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 hidrogelificate, pe bază de <i>Trichoderma viride</i> Td ₄₉ , realizate prin uscarea granulelor formate după cultivarea timp de 7 zile a ciupercilor Td ₄₉ 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 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.	23 25 27 29 31 33
Invenția prezintă următoarele avantaje:	
- tulpina Td ₄₉ , 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;	35 37
- procedeul de bioconversie folosit determină o exprimare ridicată a chitinazelor și β-glucanazelor, prin utilizarea substratului epuizat de la cultivarea ciupercilor <i>Pleurotus</i> , care este bogat în chitină și celuloză;	39 41
- 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.	43
Prezenta invenție se ilustrează prin următorul exemplu.	45
Exemplu. <i>Trichoderma viride</i> Pers., tulpina Td ₄₉ , a fost izolată de pe resturi vegetale (tulei de porumb), din ferma experimentală a ICDPP, București. Încadrarea taxonomică a tulpinii de <i>Trichoderma viride</i> Td ₄₉ este: filumul <i>Ascomycota</i> , Clasa <i>Sordariomycetes</i> , Ordinul <i>Hypocreales</i> , Familia <i>Hypocreaceae</i> , genul <i>Trichoderma</i> .	47 49

RO 126363 B1

- 1 Caracteristicile morfologice ale tulpinii Td₄₉ sunt descrise mai jos.
2 Dezvoltarea coloniei: 4,5...7,5(-9,0) cm diametru după 5 zile, pe mediul CGA, inițial
3 ± hialină, ulterior albicioasă-verde, cu zone de mănunchiuri de conidiofori albastru-verzi;
4 reversul coloniei necolorat.
- 5 Conidiofori: ramificați piramidal, cu ramuri mai scurte spre apex.
6 Fialide: în grupuri de 2...4, destul de subțiri și adesea curbate, de (6)8...14(-20) x
7 2,4...3,0 um.
- 8 Conidii subgloboase sau elipsoidale, de 3,6...4,5 μm în diametru cu pereții aspri.
9 Clamidospori prezenți în miceliul culturilor mai vârstnice, intercalări și uneori terminali,
10 cel mai adesea globoși, hialini, cu pereții netezi.
- 11 Caracteristicile fiziologice, de utilizare a diferitelor substraturi, sunt descrise în cele ce
12 urmează.
- 13 Surse de carbon: optime: manita, fructoza, riboza, glucoza (dextroza), galactoza,
14 manoza; dezvoltare fungală moderată pe: arabinoză, sorboză, melibioză, maltoză, lactoză,
15 celobioză, celuloză, amidon, inulină; dezvoltare fungală slabă pe: sorbitol, xiloză, zaharoză
16 (sucroză), glicerol.
- 17 Surse de azot: optime: DL-leucina, L-cystina, DL-citrulina, DL-nor-leucină, azotatul
18 de amoniu, tartratul de amoniu; dezvoltare fungală moderată pe: L-arginină, L-leucină,
19 glicocol, asparagină, riboflavină, sulfat de amoniu, carbonat de amoniu, fosfat monobazic;
20 dezvoltare fungală slabă pe: triptofan, tirozină, D-serină, lizină, uree, azotați de sodiu, calciu
21 și potasiu.
- 22 Caracteristicile fizice de creștere și sporulare sunt:
- 23 Temperatura: temperatura optimă: 20...25°C; temperatura minimă: 2°C; temperatura
24 maximă: 37°C;
- 25 Reacția substratului de cultură: pH optim: 4,0...5,5; dezvoltare slabă a ciupercii la
26 valori de pH de la 9,0 la 13,0.
- 27 Tulpina Td₄₉ este puternic antagonistă față de ciupercile fitopatogene: *Fusarium*
28 *graminearum*, *F. culmorum*, *F. verticilloides*, *Pythium ultimum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria*
29 *alternata*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotinia bataticola*, *Stemphylium radicum* ș.a.
- 30 Pentru obținerea biopreparatului, s-a aplicat următorul procedeu.
- 31 Tulpina Td₄₉, de *Trichoderma viride*, este cultivată pe mediu Weidling agarizat,
32 repartizat în eprubete cu mediu înclinat. Cultura de pe mediu agarizat este reluată și utilizată
33 pentru inocularea mediului hidrogelificat, de multiplicare industrială, cu următoarea
34 compoziție: 2 g KH₂PO₄; 1,4 g (NH₄)₂SO₄; 0,3 g CaCl₂ · 2H₂O; 0,3 g MgSO₄ · 7H₂O; 0,6 g
35 uree; 10 mg FeSO₄ · 7H₂O; 2,8 mg ZnSCv · 2H₂O, 3,2 mg CoCl₂ · 6H₂O, sirop de glucoză
36 80% 15 ml, 7 g hidrogel superadsorbant pe bază de poliacrilamidă și poliacrilat de potasiu
37 Aquasorb, apă până la 1 l. Mediul hidrogelificat este repartizat în pungi de polietilenă, sterilizat
38 prin autoclavare la 121°C și inoculat cu ciuperci *T. viride* Td₄₉. După 7 zile, amestecul
39 semisolid, hidrogelificat, rezultat este omogenizat cu un turbomixer și uscat pe sită de inox și
40 hârtie de filtru, în curent de aer cald la 35°C.
- 41 Procedeu de conversie a substratului epuizat de la cultivarea ciupercilor comestibile
42 într-un biopreparat antifungic pe bază de *Trichoderma viride* Td₄₉ implică următoarele etape:
- 43 - trecerea substratului epuizat de la cultivarea ciupercilor *Pleurotus* într-un
44 amestecător universal;
- 45 - adăugarea de superfosfat în proporție de 0,4...0,5%, pentru normalizarea pH-ului
și a conținutului de potasiu;

RO 126363 B1

- inocularea cu 0,1% biopreparate hidrogelifiate pe bază de <i>Trichoderma viride</i> Td ₄₉ , realizate prin uscarea granulelor formate după cultivarea timp pe 7 zile a ciupercilor Td ₄₉ , 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 poliacrilamidă și poliacrilat de potasiu Aquasorb, apă până la 1 l;	1
- menținerea, timp de 7...8 zile, a compoziției de mai sus, amestecând cu o frecvență de o rotație pe oră, pentru aerarea substratului.	3
În biopreparatul astfel obținut, s-au efectuat determinări de umiditate (gravimetric, după uscare la 104°C), materie organică totală și cenușă (gravimetric, după calcinare la 800°C), substanțe azotate totale (mineralizare umedă Kjedah), acizi humici (extracție NaOH 1M și precipitare cu HCl 1M), celuloză (colorimetric cu antronă, după extragere prealabilă a ligninei cu acid acetic și acid nitric); chitină (determinarea colorimetrică a N-acetilglucozaminei după hidroliză în HCl 6M).	5
Analizele au fost repetate de trei ori, iar conținutul determinat a fost următorul: materie organică totală 22...27,5% (celuloză 10...12,5%, lignină 5...6,5%, acizi humici 2,5...3,5%, chitină 1,5...2%, substanțe azotate total 2,5...3,5%), substanțe minerale totale (cenușă) 5...7,5%, apă 65...73%	7
Din biopreparat a fost determinat și numărul de ciuperci antagoniste <i>Trichoderma viride</i> , folosindu-se următoarea formulă de mediu selectiv: 0,2 g MgSO ₄ · 7H ₂ O; 0,9 g K ₂ HPO ₄ ; 1,0 g NH ₄ NO ₃ , 0,15 g KCl, 0,15 g roz Bengal, 3 g glucoză, 20 g agar, apă până la 1 litru (William et al, 2003, <i>A selective medium for quantitative reisolation Trichoderma harzianum from Agaricus bisporus compost</i> , <i>Appl. Envir. Microb.</i> , 68, 4190-4191).	9
Mediul a fost sterilizat prin autoclavare (la 121°C, timp de 15 min) și distribuit în plăci Petri cu diametrul de 9 mm. Din biopreparat s-au prelevat probe, care au fost omogenizate. Din omogenizat s-a reluat 1 g care s-a suspendat în 10 ml. Din suspensie s-au reluat 1 ml, care a fost diluat zecimal de 5 ori și apoi inoculat pe mediu selectiv. În toate analizele efectuate, numărul de propagule de <i>T. viride</i> Td ₄₉ /1 g de biopreparat a fost mai mare de 10 ⁶ ufc.	11
Biopreparatul conform invenției reprezintă de fapt o etapă de reciclare, conform unui ciclu integrat, asemănător celor naturale. Prin cultura ciupercilor lignocelulozice (și mai ales a celor din genul <i>Pleurotus</i>), materialul vegetal, rezultat ca subprodus agricol (paie de grâu, de exemplu), este convertit într-un produs agroalimentar cu valoare biologică și comercială ridicată (bureți păștrăvi). Ciupercile lignocelulozice consumă preponderent celuloză (care se degradează hidrolitic la glucoză, utilizată ca sursă de carbon și de energie) și oxidează parțial lignina (polimer care se degradează oxidativ, printr-un proces denumit și de "combustie enzimatică"). Substratul epuizat, care conține celuloză înalt organizată, rezistentă la biodegradare, lignina parțial oxidată și miceliu de <i>Pleurotus</i> , în faza finală a ciclului biologic (bogat în chitină și betaglucan), este convertit într-un biopreparat pentru dezvoltarea de soluri supresive, pentru un patogen major al culturii de grâu.	13
Biopreparatul pe bază de <i>T. viride</i> Td ₄₉ a fost testat din punct de vedere al antagonismului față de <i>Fusarium graminearum</i> Schw. DSMZ 4527 (teleomorfa <i>Gibberella zeea</i> Schw. Petch). Ciuperca toxigenă a fost cultivată pe mediu înclinat cartof - glucoză - agar. După 7 zile de creștere, cultura a fost reluată în tampon fosfat salin, pH 7,2, adusă la 10 ⁶ ufc/ml și inoculată (0,1 ml/g), peste paie de grâu sterilizate prin 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 <i>T. viride</i> Td ₄₉ , reluat de pe mediu Weidling agarizat, înclinat (inoculare 0,1 ml suspensie 10 ⁶ ufc/ml/1 g de paie).	15
	17
	19
	21
	23
	25
	27
	29
	31
	33
	35
	37
	39
	41
	43
	45
	47
	49

RO 126363 B1

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

6 Captarea ascosporelor s-a realizat cu ajutorul unor lamele de microscop 25 x 75 mm,
7 tratate cu silicon și plasate la 10 mm de gâtul plăcii Roux. După 21 de zile, s-a lăsat
8 vermiculitul să se usuce timp de 5 zile, după care a fost reumectat abundent cu 7 ml de apă
9 sterilă. Această alternanță a favorizat ejectarea sporilor din apotecii. Sporii captați în uleiul
10 siliconic au fost numărați la microscop, pe 25% din suprafața lamelei. Fiecare variantă
11 experimentală a fost realizată în trei repetiții, iar întregul experiment a fost repetat o dată.
12 Datele au fost interpretate pe baza testului Friedman pentru măsurări repetate. Rezultatele
13 sunt prezentate în tabelul 1 de mai jos.

Tabelul 1

14 *Influența aplicării biopreparatului pe bază tulpinii T. viride Td₄₉ și a suspensiei de ciuperci*
15 *antagoniste T. viride Td₄₉ asupra producerii de ascospore de către Fusarium graminearum*
16 *DSMZ 4527 (teleomorfa Gibberella zea)*

19	Varianta experimentală	Ascospori (x10 ⁵)/cm ² de substrat ^z	% față de martor
21	Martor, paie de grâu neinoculate cu microorganisme antago-niste, inoculare 0,1 ml suspensie 10 ⁶ ufc/ml/1 g de paie	12,1 a	-
23	Pre-inoculat cu biopreparat conform exemplului 1, inoculare 0,1 ml suspensie 10 ⁶ ufc/ml/1 g de paie	1,22 d	10,08
25	Inoculat concomitent cu biopreparat conform exemplului 1, inoculare 0,1 ml suspensie 10 ⁶ ufc/ml/1 g de paie	2,24 c	18,51
27	Postinoculat cu biopreparat conform exemplului 1, inoculare 0,1 ml suspensie 10 ⁶ ufc/ml/1 g de paie	3,23 c	26,69
29	Preinoculat cu 0,1 ml suspensie Td ₄₉ 10 ⁶ ufc/ml/1 g de paie, inoculare 0,1 ml suspensie 10 ⁶ ufc/ml/1 g de paie	1,15 d	9,50
31	Inoculat concomitent cu 0,1 ml suspensie Td ₄₉ 10 ⁶ ufc/ml/1 g de paie, inoculare 0,1 ml suspensie 10 ⁶ ufc/ml/1 g de paie	2,14c	17,68
33	Postinoculat cu 0,1 ml suspensie Td ₄₉ 1 06 ufc/ml/ 1 g de paie, inoculare 0,1 ml suspensie 10 ⁶ ufc/ml/1 g de paie	4,59 b	37,93

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

37 Rezultatele demonstrează că tulpina Td₄₉ este eficientă în reducerea dezvoltării și
38 sporulării ciupercilor fitopatogene și toxigene *F. graminearum*. Tulpina condiționată sub
39 formă de biopreparat este mai eficientă în cazul aplicării după inocularea cu ciuperci toxigene.
40 Acest fapt, similar celui care apare în condiții naturale, este datorat probabil exprimării
41 semnificative a enzimelor implicate în metabolizarea substratului lignocelulozic și cu chitină
42 în ciupercile Td₄₉ condiționate sub formă de biopreparat.

43 S-a realizat și un experiment pentru a se evidenția capacitatea biopreparatului
44 realizat, pe baza ciupercii *T. viride* Td₄₉, în formarea unor soluri supresive. S-a lucrat în
45 condiții de seră. Inoculul fungic (de *Fusarium graminearum* DSMZ 4527) s-a obținut în plăci
46 Roux, pe mediul natural alcătuit din boabe de ovăz dublu sterilizate la 1 at, timp de 20 min,
47 prin inocularea cu miceliu și incubarea la 27°C, timp de 3...4 zile.

RO 126363 B1

Substratul utilizat în seră a constat din 1/2 pământ de grădină + 1/4 mranită + 1/4 nisip. Acesta a fost sterilizat prin iradiere gamma (2,5 KGy) și apoi amestecat uniform cu inoculul fungic ($\sim 2 \times 10^6$ spori/ kg sol) și distribuit în tăvi din plastic (32/24 cm), cu 48 h înainte de semănat. Cu 12 h înainte de semănat, s-a aplicat biopreparatul pe bază de *T. viride* Td₄₉, în cantitate de 1 g la 1 kg de sol.

În substratul astfel pregătit, au fost semănat boabe de grâu. După 15 și 20 zile, s-a determinat numărul de plante răsărite și uniform dezvoltate. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 2, comparativ cu un martor netratat și cu un tratament chimic.

Tabelul 2

Eficacitatea biopreparatului în prevenirea atacului de Fusarium graminearum la plantulele de grâu (cv. Boema)

Varianta	Tratament	% plante răsărite	
		15 zile	20 zile
Substrat sterilizat prin iradiere, netratat	-	96,6	96,6
Substrat sterilizat prin iradiere, inocul de <i>F. graminearum</i> , netratat	-	12,6	11,2
Substrat sterilizat prin iradiere, inocul de <i>F. graminearum</i> , Propamocarb-HCl	Stropire sol, 0,2% i.a., 12 h înainte de semănat	89,6	87,6
Substrat sterilizat prin iradiere, inocul de <i>F. graminearum</i> , biopreparat Td ₄₉	Incorporare 1 g/1 kg sol, 12 h înainte de semănat	91,2	89,4

Rezultatele susțin faptul că biopreparatul realizat pe baza ciupercii antagoniste *T. viride*, Td₄₉ are capacitatea de a forma soluri supresive, pentru fusariile fitopatogene și toxigene.

Revendicări

1

3

1. Tulpină antagonistă de *Trichoderma viride*, Td₄₉, depozitată cu numărul (P) 001357, 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*, *Sclerotinia bataticola* și *Stemphylium radicinum*.

5

7

9

2. Biopreparat antifungic, pe bază de *Trichoderma viride*, Td₄₉, definită în revendicarea 1, pentru dezvoltarea de soluri supresive pentru fusariile fitopatogene și toxigene, **caracterizat prin aceea că** are următoarea compoziție: materie organică totală 22...27,5 părți, din care celuloză 10...12,5 părți, lignină 5...6,5 părți, acizi humici 2,5...3,5 părți, chitină 1,5...2 părți, substanțe azotate totale 2,5...3,5 părți, substanțe minerale totale (cenușă) 5...7,5 părți, apă până la 100 părți, părțile fiind exprimate în greutate, iar numărul de propagule de *Trichoderma viride*, Td₄₉, este mai mare de 1 million/1 g de produs.

11

13

15

17

19

21

23

25

3. Procedeu de obținere a unui biopreparat antifungic, pe bază de *Trichoderma viride*, Td₄₉, 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*, Td₄₉, 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 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.

