



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2010 01293**

(22) Data de depozit: **08.12.2010**

(41) Data publicării cererii:
28.10.2011 BOPI nr. **10/2011**

(71) Solicitant:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
PEDOLOGIE, AGROCHIMIE ȘI PROTEȚIA
MEDIULUI, BD. MĂRĂȘTI NR. 61,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **CENTRUL DE BIOCHIMIE APLICATĂ ȘI
BIOTEHNOLOGIE-BIOTEHNOL-BUCUREȘ
TI, BD. MĂRĂȘTI NR.59, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE
AGRONOMICE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ
DIN BUCUREȘTI, BD. MĂRĂȘTI NR. 59,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **MATEI SORIN,
STR. GEORGE CALBOREANU NR. 4,
BL. 122, SC. B, AP. 68, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **MATEI GABI MIRELA,
STR. GEORGE CALBOREANU NR. 4,
BL. 122, SC. B, AP. 68, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **CORNEA CĂLINA PETRUȚA,
STR. SG. MUȘAT CONSTANTIN NR. 1,
BL. 16, SC. 2, AP. 25, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **POPA GABRIELA, STR. TEIUL DOAMNEI
NR. 7, BL. 31, SC. A, ET. 2, AP. 18,
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **DRĂGHICI ELENA MARIA, STR. PRESEI
NR. 1, BL. 28, SC. B, AP. 1, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **TULPINI DEBOTRYTIS CINEREA PRODUCTOARE DE
ELICITORI FUNGICI, PRODUS PENTRU IMUNIZAREA
PLANTELOR DE CĂPȘUN CONTRA AGENȚILOR
PUTREGAIULUI CENUȘIU ȘI METODE DE APLICARE**

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la compoziția unui produs destinat imunizării plantelor de căpșun, la trei tulpini virulente noi de *Botrytis cinerea*, și la metodele de aplicare a acestuia în tratamentul preventiv al putregaiului cenușiu la căpșun. Tulpina de *Botrytis cinerea* BcS1 prezintă colonii alb cenușii lănoase, cu rari scleroți negri pe mediul Czapek, colonii cenușii cu numeroși scleroți negri pe mediul PDA, conidiofori brunii, septați, lungi, ramificați intercalar sau apical, conidii netede, neseptate, hialine. Tulpina *Botrytis cinerea* BcP2 prezintă colonii dense lănoase, cenușiu închis cu numeroși scleroți negri, conidiofori înalți, subțiri, brunii, septați, cu ramificații intercalare, conidii netede, neseptate, hialine. Tulpina *Botrytis cinerea* BcF7 prezintă colonii hialine inițial, deschise la culoare

în centru, lănoase, cu scleroți negri dezvoltați în număr moderat, conidiofori înalți, brunii, netezi, septați, ramificați neregulat, cu capete conidiale aplicale și intercalare, conidii brune deschise, netede, neseptate, cu hil protuberant. Produsul conform invenției conține proteine solubile total 1,06...22,67 mg/l, glucide total reducătoare 1,98...19,39 mg/l, flavonoide total 0,01...0,4485 μg/l, polifenoli totali 39,42...336,51 mg/l, pectin liază 0,637...0,513 U/ml, chitinază 0,423...0,627 U/ml, celulază 0,012...1,98 U/ml, carboximetilcelulază 0,018...0,940 U/ml, β-1,3 glucozidază 1,109...7,092 U/ml, aminoacizi conținut total 456,19...467,79 mmol/100 ml.

Revendicări: 5
Figuri: 6



TULPINI DE BOTRYTIS CINEREA PRODUCĂTOARE DE ELICITORI FUNGICI, PRODUS PENTRU IMUNIZAREA PLANTELOR DE CĂPȘUN CONTRA AGENȚILOR PUTREGAIULUI CENUȘIU ȘI METODE DE APLICARE

Prezenta invenție se referă la compoziția unui produs nou pentru imunizarea plantelor de căpșun, la 3 tulpini fitopatogene virulente noi de *Botrytis cinerea* care se dezvoltă simultan în mediul lichid de creștere, iar prin creștere, dezvoltare și exometaboliți stabilesc compoziția finală a produsului și la metodele de aplicare a acestuia în tratamentul preventiv al putregaiului cenușiu la căpșun.

Prin această invenție se urmărește problema combaterii bolilor la plantele de căpșun cu produse nepoluante pentru mediu cât și îmbogățirea arsenalului ecologic utilizat în creșterea randamentului acestor culturi.

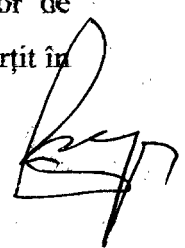
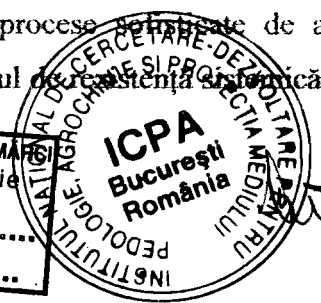
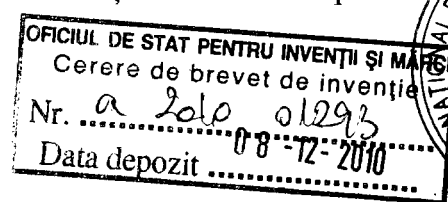
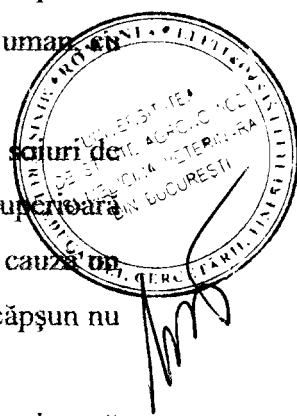
Prezența acestor produse alimentare, la nivel mondial, s-a redus în fiecare an din cauza bolilor, a întârzierilor de creștere și a reducerii numărului de fructe la plantele infectate.

Clasic, combaterea bolilor la plantele de căpșun a constat în acoperirea lor cu substanțe toxice care au împiedicat dezvoltarea agenților patogeni, în special a fungilor, care pătrund în plantă direct și/sau prin deschiderile naturale, cum ar fi stomatele. Ulterior, s-au aplicat fungicide chimice sistemice pentru a distruge infecțiile fungice ale plantelor de căpșun. Majoritatea substanțelor chimice folosite în combaterea bolilor la căpșun sunt dăunătoare mediului și sunt toxice numai pentru o gamă limitată de agenți patogeni. O protecție mai largă a culturii de căpșun s-a realizat prin aplicarea de substanțe chimice multiple sau reaplicarea produselor în timpul unui sezon de creștere, în cazul în care produsele chimice sunt spălate. Astfel, acestea se acumulează în sol și în produsele alimentare destinate consumului uman, cu efecte în domeniul patologiei umane dar și al poluării mediului.

O altă modalitate clasică de a controla agenții patogeni constă în utilizarea de soiuri de căpșun rezistente la boli, dar soiurile rezistente la boli nu au randament sau calitate superioară celor nerezistente. În plus, agenții patogeni reprezintă tulpini distincte și din aceasta cauză un soi de căpșun are un spectru de rezistență redus. Sensibilitatea la boli a plantelor de căpșun nu este sinonimă însă cu absența mecanismelor de rezistență din codul lor genetic.

Cercetările recente au stabilit faptul că plantele au capacitatea de a dezvolta rezistență sistemică la boli, rezistență care poate fi indusă. Sub multe aspecte sistemul de apărare al plantelor este comparabil cu răspunsul în cazul vaccinării la oameni, deoarece căile de semnalizare s-au conservat în timpul evoluției acestora.

Plantele au dezvoltat în timp procese complexe de activare a mecanismelor de inducere a imunității sistemice. Răspunsul de rezistență sistemică în plante poate fi împărțit în



linii mari în rezistența sistemică dobândită și în rezistența sistemică indusă. Deși sunt fiecare eficiente împotriva unei game largi de agenți patogeni, răspunsurile lor sunt specifice pentru diferite clase de agenți patogeni. Fiecare cascadă de semnalizare este indusă și transmisă prin combinații ale diferitelor molecule de semnalizare.

Sistemul de apărare al plantei presupune o interacțiune complexă pentru recunoașterea anticipată a evenimentelor patogene generatoare de semnale care sunt recunoscute și transmise de la locul de inoculare intra-și inter-celular către întreaga plantă. Aceste semnale declanșează o serie de reacții de apărare indusă, cu scopul de a bloca sau chiar de a ucide agentul patogen invadator. Multe dintre reacțiile de apărare ale plantelor sunt controlate la nivel genetic, motiv pentru care multe studii au fost realizate în acest domeniu. Spre exemplu, s-au obținut brevete în care creșterea rezistenței plantei s-a realizat pe baza procedurilor de manipulare genetică DE4234131 (A1) din 1994 Logemann și colab., US2002004944 (A1) din 2002 Baker și colab., US20030192075 din 2003, DE202006009259 (U1) din 2006 Ruehle și colab., MX200700090(A) din 2007 Boer și colab., US20100011468 din 2010 și US2010122374 (A1) din 2010 Takatsuji și colab.

Rezistența sistemică a fost indusă la cereale (orz, porumb, ovăz, orez și grâu), cucurbitacee (castravete și pepene verde), legume (fasole, mazăre și soia), solanacee (piper, cartofi, tutun și roșii), fructe (pere, struguri, piersici, prune și mere), și alte plante, (sfeclă, cafea, ridiche, garoafă), pentru a proteja plantele de o varietate de agenți patogeni pe frunze și rădăcină.

Rezistența la boli poate fi indusă în plantele de câpșun aparent sensibile prin inoculare cu formele avirulente, hipovirulente de agenți patogeni ai plantelor, metaboliți sau compuși extrași din biomasa fungică, prin inocularea restricționată cu agenții lor patogeni sau cu agenți patogeni nespecifici.

Detectarea agentului patogen are loc cât mai aproape posibil de suprafața plantei. De la locul atacului, semnale secundare sunt răspândite peste tot în plantă. Activarea poate fi mediata prin mecanisme multiple care asigură rezistența la boli. Primele reacții ale unei celule de plantă atacată constau în producerea de radicali de oxigen activ și autodistrugerea completă a unui număr limitat de celule din jurul unei infecții localizate. Informațiile cele mai numeroase privind această succesiune de semnale se referă la prezența semnalelor electrice, a acidului salicilic, a fitoalexinelor. Produsele de degradare ale peretelui celular al agentului patogen care atacă, precum și fragmente din celula vegetală aflată sub atac sunt printre cele mai bune semnale de alarmă descrise.



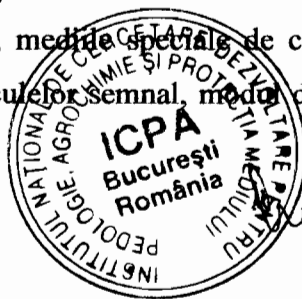
Handwritten signature.

08-12-2010

Reacțiile de apărare, care sunt activate de semnalele de alarmă primite, acoperă un spectru larg de substanțe chimice, biochimice dar și mecanice. Componentele rezistenței sistemice induse includ acumularea de agenți antimicrobieni cât și formarea unor bariere fizice. Astfel, se manifestă procesele de lignificare, suberificare, de formare a calozei, acumulări de aglutinine, apar inhibitori enzimatici, glicoproteine și hidroxiprolină, în zonele distale punctului în care un agent patogen încearcă să pătrundă în planta. Un alt mecanism al inducerii rezistenței sistemice în plante este considerat cel de formare a enzimelor hidrolitice (cum ar fi chitinazele, β -1,3-glucanazele, proteaze), a altor proteine legate de patogeneză, precum peroxidazele. Chitinazele plantei sunt raportate a fi inhibitori potențiali ai creșterii fungice și în combinație cu β -1,3-glucanaza atacă o serie de ciuperci. Prezența chitinazelor și a β -1,3-glucanazelor poate fi indusă coordonat într-un număr de țesuturi ale plantei de atacul agentului patogen cât și de prezența moleculelor semnal.

S-a cercetat proprietatea de a acționa asupra sistemelor naturale de apărare ale plantelor de către substanțele chimice anorganice reprezentate de mercur, cupru, ionii de aluminiu, acizi arahidonic, fosforic, salicilic, fulvici și humici, iar dintre cele organice, oligozaharidele de origine vegetală reprezentate de oligoglucani, oligochitină, oligochitosan, oligogalacturonide, enzime de tipul celulozei, polipeptide, glicoproteine și aminoacizi. Rezultatele sunt prezentate în lucrările autorilor: Boller et al (1995; Annu Rev Plant Plant Physiol Mol Biol.), Darvill și Albersheim (1984, Annu Rev Plant Physiol), Côté et al (1994, Plant Mol Biol), Pearce et al. (1982, Physiol Plant. Pathol.), Ren et al. (1992, Physiol Plant), Boland et al. (1997, FEBS), Klüsener et al. (1999, FEBS), Anderson et al. (1989), Ebel et al (1995, Can. J.), Boller et al. (1995, Annu Rev Physiol Plant Plant. Mol. Biol.), Coleman et al 1992, Physiol Mol patologia plantelor, Kogel et al. 1988, Physiol Mol Plant Pathol.), Baker et al. (1993, Plant Physiol), Hanson et al. (2000, Phytopat.), Benhamou et al. (2000, Plant Physiol.), Parker et al. 1991, Mol-Plant microb Interact.), Nürnberger et al. (1994, Cell), Sacks et al. (1995, Genet Gen Mol), Pearce et al. (1993, J. Biol Chem.), Boissy et al. (1996, Structure), Ricci et al. (1992, Plant Pathol.), Kamoun et al. (1994, Appl Environ Microbiol.), Wit et al. (1997, Mol-Plant Microb Interact), Kamoun et al 1993, Mol-Plant Microb Interact), Siegrist et al. (2000, Physiol Mol Plant Pathol.).

Cercetările informaționale privind efectele unor tipuri de molecule semnal (oligopeptide, acid ganoderic, oligozaharide, glicoproteine, lipide, melanine, acid manuronic, glucoza, galactoza, difenil eter, de acid β -aminobutiric sau acid β -amino valerice, xantan, β oligo 1-3 glucani, etc.) asupra plantelor, metode speciale de creștere a fungilor, compoziții rezultate în plantă în urma acțiunii moleculelor semnal, metode de aplicare al produselor sau



tipul de patogeni asupra cărora se manifesta efectul sunt exemplificate în cadrul unor brevete precum: US5830919 din 1998, US5888501 (A) din 1999 Backman si colab., FR2799935 (A1) din 2001 Besnard si colab., US6387847 din 2002, US2004033902 (A1) din 2004 Haddad si colab., US2006148710 (A1) din 2006 Besnard si colab., US20060178270 din 2006, UA29953 (U) din 2008 Horovyi si colab., CN101358179 (A) din 2009 Yaguang si colab., CN101353676 (A) din 2009 Xiangxi si colab., FR2922412 (A1) din 2009 Profizi si colab., US7682615 din 2010.

Brevetul USA 6326016 din 2001 autor Moesinger, E., prezintă un agent de inducere a rezistenței plantelor împotriva microorganismelor fitopatogene prin utilizarea unui extract din biomasa fungică a unui microorganism nepatogen.

Nu am găsit referințe în literatura științifică privind tulpinile de *Botrytis cinerea* nemodificate genetic, care să fie utilizate în obținerea unui produs de imunizare a plantelor de căpșun.

În comparație cu rezultatele obținute în diferite cercetări în domeniul inducerii rezistenței sistemice la plante, prezenta invenție își propune să ofere o compoziție nouă de molecule semnal care să crească capacitatea de reacție a plantelor de căpșun prin stimularea receptorilor specifici implicați în declansarea reacției sistemice de apărare a plantei față de fitopatogenul *Botrytis cinerea*.

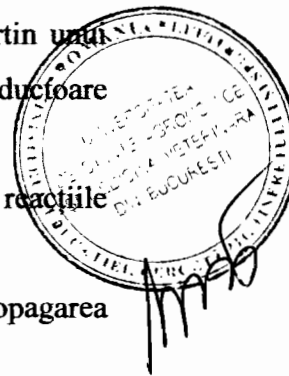
Moleculele semnal provin de la 3 tulpini noi de *Botrytis cinerea*, extrem de virulente, nemodificate genetic.

Compușii cu rol de semnal sunt exometaboliții eliberați în mediul lichid de creștere, obținuți în anumite condiții și prin adoptarea / aplicarea unui anumit concept, aparțin unui anumit spectru molecular prin care se acoperă o gamă largă de compuși cu acțiune inductoare asupra mecanismelor de apărare ale căpșunului.

Prezintă specificitate ridicată prin activarea mecanismelor care declansează reacțiile de apărare ale plantei împotriva fitopatogenilor aparținând genului *Botrytis*.

Produsul acționează asupra celor două mecanisme de apărare pentru a opri propagarea bolii.

De asemenea, față de alte produse, asigură menținerea caracteristicilor de rezistență indusă pe parcursul perioadei de vegetație, deoarece modul în care se aplica, la anumite intervale de timp și în anumite concentrații, face ca rapelurile să-si atingă scopul. Rolul lor este de a permite plantei declanșarea, dar și menținerea activă a mecanismelor de apărare naturale, dând naștere la o rezistență sistemică indusă care să permită prevenirea eficientă a unui atac pe parcursul întregii perioade de vegetație fără a fi necesară repetarea tratamentului.



Handwritten signature.

Prezenta invenție constă în realizarea compoziției unui produs nou nepoluant în scopul inducerii capacității de rezistență sistemică plantelor de căpșun nemodificate genetic, față de fitopatogenul *Botrytis cinerea*.

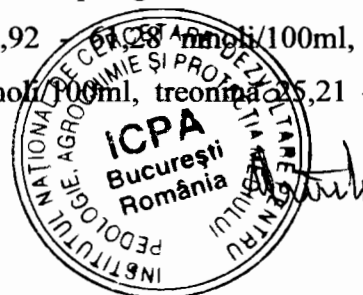
Inducerea capacității de rezistență a plantelor de căpșun se realizează prin intermediul compușilor cu rol de semnal din compoziția formată dintr-un complex de exometabiliți cu rol elicitor, eliberați în mediul lichid de creștere de către 3 tulpini fitopatogene de *Botrytis cinerea*, virulente, selecționate dintre alte 38 de tulpini, nemodificate genetic.

Cele 3 tulpini fungice de *Botrytis cinerea* (BcS1, BcP2, BcF7) sunt depozitate la Microbial Strain Collection of Latvia, University of Latvia, pe 13.09.2010, conform cerințelor tratatului de la Budapesta, cu numărul P999 pentru tulpina BcS1, cu numărul P1000 pentru tulpina BcP2 și cu numărul P1001 pentru tulpina BcF7. Produsul reprezintă domeniul molecular cuprins între 5000Da-2000kDa al exometabiliților din mediul lichid de creștere fungic. Mediul de creștere a amestecului de tulpini fungice fitopatogene are următoarea compoziție: 0,5kg cartofi, zaharoză 20g, 3g biomasa vegetală, apă până la 1l. Compoziția produsului cuprinde ca ingrediente active: proteine solubile, glucide reducătoare, flavonoide, polifenoli, enzime (pectin liaza, chitinaza, celulaza, carboximetilcelulaza, β -1,3 glucanaza) și aminoacizi (asparagina, glutamina, serina, histidina, glicina, treonina, alanina, arginina, tirozina, valina, metionina, fenilalanina, izoleucina, leucina, lizina) determinate conform metodologiei clasice. Acest complex prezintă capacitatea de a induce rezistența sistemică la plantele de căpșun și se obține prin procedee succesive de filtrare, microfiltrare și ultrafiltrare, procedee care nu alterează structura și calitățile complexului molecular.

Pentru obținerea produsului de inducere a rezistenței sistemice la plantele de căpșun se parcurg următoarele etape: a) inocularea concomitentă a celor 3 tulpini fungice selecționate (BcS1, BcF7, BcP2) în mediul de creștere; b) incubare; c) obținerea produsului prin aplicarea procedeelelor succesive de filtrare, microfiltrare și de ultrafiltrare tangențială a mediului lichid de creștere fungică

Produsul prezintă următoarea compoziție:

Proteine solubile total 1,06 – 22,67 μ g/ml, glucide total reducătoare 1,98 - 19,39 μ g/ml, flavonoide total 0,01 - 0,4485 μ g/l, polifenoli totali 39,42 - 336,51 mg/l, pectin liază 0,637 – 0,513 U/ml, chitinază 0,423 – 0,627 U/ml, celulază 0,012 – 1,98 U/ml, carboximetilcelulază 0,018-0,940 U/ml, β -1,3 glucanază – 1,109 - 7,092 U/ml, aminoacizi conținut total 456,19 – 467,79 mmol/100ml, asparagină 28,81- 38,54 nmoli/100ml, glutamină 28,55 - 30,56 nmoli/100ml, serină 40,92 - 28,28 nmoli/100ml, histidină 5,66 - 13,21 nmoli/100ml, glicină 22,98 – 45,25 nmoli/100ml, treonina 25,21 – 43,04, alanină 35,71-



50,12 nmoli/100ml, arginină 99,93 – 126,24 nmoli/100ml, tirozină 7,37 – 9,24 nmoli/100ml, valina 38,06 – 38,78 nmoli/100ml, metionină 9,67-19,43 nmoli/100ml, fenilalanină 11,59 – 31,29 nmoli/100ml, izoleucină 14,43 – 19,44 nmoli/100ml, leucină 21,00 – 29,03 nmoli/100ml, lizină 0,99 - 17,45 nmoli/100ml.

Produsul este aplicabil prin pulverizare fină (60-80 μ) pe plantă sau în sol (în apa de irigație, recomandabil în sistemul de udare în picătură). Se fac 4 administrări succesive pe parcursul unui interval de opt zile. În zilele 1 și 4 se aplică produsul în concentrația inițială iar în zilele a-6-a și a-8-a se realizează rapeluri la primele două aplicări, cu același volum de lichid (40-60ml/m²) dar diluat cu 50% apă. Nu este necesară repetarea tratamentului în cursul sezonului de vegetație. Produsul este util în managementul fitosanitar ecologic al culturilor de căpșun.

Invenția prezintă următoarele avantaje:

- tulpinile utilizate în realizarea produsului sunt noi, nu sunt modificate genetic, prezintă o relativă stabilitate genetică.
- stabilitatea genetică a tulpinilor selecționate permite obținerea unui produs cu proprietăți constante în condițiile menținerii parametrilor fizico-chimici.
- izolatele au fost obținute de pe produse naturale diferite, asigurându-se și prezenta unor particularități genetice.
- tulpinile utilizate produc exometaboliți care intră în compoziția produsului și sunt compuși biotici, naturali, care nu prezintă efect inhibitor asupra microbiotei filozofice sau edafosferice, nu modifică biodiversitatea specifică de la aceste niveluri, sunt netoxici pentru plantă, nepoluantți pentru mediu.
- nu introduce specii noi în biotop.
- producerea compușilor specifici cu rol de semnal inductor la căpșun este numai rezultatul stimulării în cultură a caracteristicilor de concurență și virulență tulpinală.
- compușii activi obținuți, prin diversitate și complexitate, se adresează unui spectru larg al receptorilor implicați în inducerea mecanismelor de rezistență sistemică la căpșun.
- aplicarea produsului de inducere a reacției sistemice de apărare a plantei nu necesită condiții speciale, nu necesită rănirea plantei, iar căile de pătrundere în plantă sunt cele naturale utilizate și în procesele fiziologice normale de respirație, transpirație, absorbție.



- aplicarea produsului se face prin dispersie avansată, fapt ce permite acoperirea unor suprafețe mari, un consum eficient, pierderi reduse, inducerea reacției imune fiind posibilă atât în cazul administrării pe plantă cât și în sol.
- produsul conține cantități foarte mici de compuși activi, dar care sunt suficiente pentru a sensibiliza membrana citoplasmatică.
- nu utilizează biomasa fungică și nici procedee tehnice de prelucrare a ei
- efectul produsului asupra plantei este sistemic, se menține în timp, schimbarea gradului de umiditate în sol sau în atmosfera neinfluențând decât parțial reacția plantei sub acest aspect, ca urmare nu este necesară repetarea aplicării lui după precipitații.
- aplicarea produsului nu influențează calitatea biologică a fructelor de căpșun.
- influențează capacitatea de rezistență la infectare a fructelor depozitate, în absența aplicării de conservanți, deci asigură protecția pentru planta întreagă, cu efecte care se extind post-recoltare.
- produsul prezintă compatibilitate ecologică cu alte produse care îndeplinesc cerințele de obținere a etichetei de utilizare în agricultura ecologică.
- asigură protecție împotriva agenților patogeni care nu pot fi controlați prin metode clasice, în special este util față de acei patogeni care prezintă rezistență la pesticidele chimice.
- produsul funcționează prin intermediul mecanismelor de bază ale plantei, mai bine decât printr-un atac direct asupra organismului patogen și fără efecte asupra organismelor nepatogene.
- aplicarea lui poate fi asociată cu strategiile clasice (fungicide) pentru a oferi o mai bună acoperire protectivă.
- asigură compatibilitatea cu aplicațiile de reintrare în circuit din agricultura durabilă



Prezentarea pe scurt a figurilor

Figura 1 – Tulpina BcS1 de *Botrytis cinerea* în cultură

Figura 2 – Tulpina BcP2 de *Botrytis cinerea* în cultură

Figura 3 – Tulpina BcF7 de *Botrytis cinerea* în cultură

Figura 4 – Procentul de atac din totalul suprafeței foliare la soiul Elsanta în experiența de evaluare a efectului aplicării pe plantă a filtratului E2

Figura 5 - Nivelul activității enzimelor POX și PAL în plantele de căpșun cultivate în sera pentru evidențierea efectului produsului pe baza de extract fungici



Variante experimentale: M1-martor căpșun Marmolada; P1-tratament pe plantă; P2-tratament la sol; M2- martor căpșun Elsanta; P3- tratament pe plantă; P4-tratament la sol; P5-căpșun Marmolada-tratament pe plantă cu E1; P6-căpșun Marmolada-tratament la sol cu E1; P7- căpșun Elsanta – tratament pe plantă cu E1; P8- căpșun Elsanta – tratament la sol cu E1; P9- căpșun Marmolada – tratament pe plantă cu E2; P10- căpșun Marmolada – tratament la sol cu E2; P11- căpșun Elsanta – tratament pe plantă cu E2; P12- căpșun Elsanta – tratament la sol cu E2; P13- căpșun Marmolada – tratament pe plantă cu E3; P14- căpșun Marmolada – tratament la sol cu E3; P15- căpșun Elsanta – tratament pe plantă cu E3; P16- căpșun Elsanta – tratament la sol cu E3; P17- căpșun Marmolada – tratament pe plantă cu E4; P18- căpșun Marmolada – tratament la sol cu E4; P19-căpșun Elsanta – tratament pe plantă cu E4; P20- căpșun Elsanta – tratament la sol cu E4

Figura 6 – Procentul de atac din totalul suprafeței foliare la soiul Senga Sengana în experiența de câmp pentru evaluarea efectului aplicării pe planta (A) și în sol (B) a filtratului E2, simplu și în combinație cu fungicide.

Prezenta invenție se ilustrează prin următoarele exemple:

Exemplul 1

Plantele nemodificate genetic reacționează la atacul patogenilor în funcție de tipul și intensitatea “semnalelor” pe care aceștia le emit.

Pentru obținerea unor “semnale” puternice au fost selectate din peste 38 de tulpini fungice, 3 izolate pe baza gradului ridicat de infectivitate al plantelor și al fructelor de căpșun, stabilit în urma testelor în laborator și în condiții controlate.

Tulpinile selectate provin din medii diferite (sol agricol aflat sub cultură de căpșun, fructe, plante de *Eustoma grandiflorum*) asigurându-se și unele particularități genetice.

Selecția tulpinilor nemodificate genetic aduce avantajul unei relative stabilități genetice în timp, în condițiile utilizării lor.

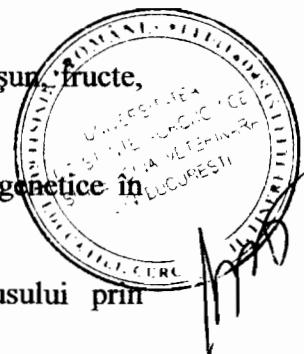
Calitățile tulpinilor selecționate influențează caracteristicile finale ale produsului prin influența indusă în timpul creșterii în cultură.

Tulpinile fungice selecționate de *Botrytis cinerea* sunt: BcS1, BcP2, BcF7.

Botrytis cinerea, tulpina BcS1, a fost izolată din sol agricol aflat sub cultură de căpșun, de la Băiculești, jud.Arges. Încadrarea taxonomică a tulpinii de *Botrytis cinerea* este Filum Ascomycota, subfilum Pezizomycotina, clasa Leotiomycetes, ordinul Helotiales, familia Sclerotiniaceae, genul *Botryotinia*, specia *Botrytis cinerea* sau *Botryotinia cinerea* (De Bary)

Whetzel. (Fig. 1 Tulpina BcS1 de *Botrytis cinerea*)

Descriere:



Handwritten signature.

Tulpina BcS1 este depozitată cu numărul P999 la Microbial Strain Collection of Latvia, University of Latvia, pe 13.09.2010.

Ciuperca, incubată pe PDA la 25°C, dezvoltă colonii lănoase de culoare alb cenușie, cu numeroși scleroți negri. Rata de creștere este de 0,935 mm/h.

Prezintă conidiofori bruni, netezi, lungi, septați, cu grosimi de 10,91-14,31 μm, ramificați intercalar sau cel mai adesea apical.

Celulele conidiogene terminale umflate produc simultan numeroase blastoconidii pe denticuli scurți. Conidiile netede, neseptate, hialine până la galben-maronii au formă obovoidă, cu hilul protuberant și dimensiuni de 9,70-14,86 x 8,09-10,74 μm.

Scleroții negri au diametrul de 2-5 mm și formă variabilă.

Originea izolatul este un sol agricol din județul Arges, România.

Testele au dovedit capacitatea de a produce enzime: chitinaze (0,001-0,015 U/ml), β-1,3-glucanaze (2,46-21,16 U/ml), poli-fenol oxidaze (0,100-0,120 U/ml), fenil-alanin-amoniu liaze (0,317-0,811 U/ml) și peroxidaze (0,129-0,398 U/ml).

Denumirea taxonomică:

Botrytis cinerea Pers. ex Fr, stadiul conidial al *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel SYN. *Sclerotinia fuckeliana* (de Bary) Fuckel

Mediu:

Cultivarea pe PDA (cartofi-dextroză-agar), Merk, ord.no.10130.0500, 39g / 1 mediu de cultură, pH 5,6 ± 0,2, autoclavate 15 min. la 121°C.

Condițiile de depozitare:

Culturi pure în eprubete cu mediul PDA înclinat, la 2-5°C

Condiții de testare a viabilității:

Incubare pe mediul de cultură PDA, pH 5,6 ± 0,2 la 22-25°C.

Botrytis cinerea, tulpina BcP2, a fost izolată de pe plante de *Eustoma grandiflorum*.

Încadrarea taxonomică a tulpinii de *Botrytis cinerea* este Filum Ascomycota, subfilum Pezizomycotina, clasa Leotiomycetes, ordinul Helotiales, familia Sclerotiniaceae, genul *Botryotinia*, specia *Botrytis cinerea* sau *Botryotinia cinerea* (De Bary) Whetzel. (Fig. 2 Tulpina BcP2 de *Botrytis cinerea*)

Descriere:

Tulpina BcP2 este depozitată cu numărul P1000 la Microbial Strain Collection of Latvia, University of Latvia, pe 13.09.2010.



Coloniile pe mediul PDA la 25°C sunt dense, lănoase, inițial deschise la culoare, apoi gri închis, cu numeroși scleroți negri cu aranjament caracteristic. Rata de creștere este de 1,180 mm/h.

Conidioforii bruni, cu pereți netezi, sunt septați, au până la 2mm lungime, grosimea de 12,77-16,88 μm, cu ramificații intercalate care poartă capete conidiale.

Conidiile neseptate, netede, hialine până la brune deschis, ovale sau subgloboase, mici au hilul protuberant și dimensiuni de 9,63-13,28 x 5,97-10,25 μm.

Scleroții de culoare închisă sunt bine dezvoltăți și au 2-7 mm în diametru.

Originea izolatului este din plante de *Eustoma grandiflorum* din România.

Testele au dovedit capacitatea de a produce enzimele: chitinaze (0,005-0,019 U/ml), β-1,3-glucanaze (10,31-21,47 U/ml), poli-fenol oxidaze (0,100-0,200 U/ml), fenil-alanin-amoniu liaze (0,278-0,538 /ml) și peroxidaze (0,386-0,906 U/ml).

Denumirea taxonomică:

Botrytis cinerea Pers. ex Fr, stadiul conidial al *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel SYN. *Sclerotinia fuckeliana* (de Bary) Fuckel

Mediu:

Cultivarea pe PDA (cartofi-dextroză-agar), Merk, ord.no.10130.0500, 39g / 1 mediu de cultură, pH 5,6 ± 0,2, autoclavat 15 min. la 121°C.

Condițiile de depozitare:

Culturi pure în eprubete cu mediul PDA înclinat, la 2-5°C

Condiții de testare a viabilității:

Incubare pe mediul de cultură PDA, pH 5,6 ± 0,2 la 22-25°C.

Botrytis cinerea, tulpina BcF7, a fost izolată de pe fruct de căpșun din soiul Senga Sengana, aflat în condiții de depozitare. Încadrarea taxonomică a tulpinii de *Botrytis cinerea* este Filum

Ascomycota, subfilum Pezizomycotina, clasa Leotiomycetes, ordinul Helotiales, familia Sclerotiniaceae, genul *Botryotinia*, specia *Botrytis cinerea* sau *Botryotinia cinerea* (De Bary) Whetzel. (Fig. 3 Tulpina BcF7 de *Botrytis cinerea*)

Descriere:

Tulpina BcF7 este depozitată cu numărul P1001 la Microbial Strain Collection of Latvia, University of Latvia, pe 13.09.2010.

Coloniile dezvoltate pe mediul PDA la 25°C, inițial sunt hialine, ulterior devenind gri spre brun, rarefiate și mai slab colorate în centru, cu nuanțe pronunțat brune spre margini. Scleroții închisi la culoare se dezvoltă într-un număr moderat. Rata de creștere pe PDA este de 0,885 mm / h.



Conidioforii sunt înalți, bruni, septati, cu pereți netezi, neregulat ramificați, care poartă capete conidiale intercalate și apicale.

Conidiile brune deschise, netede, neseptate, elipsoidale până la obovoide au hilul protuberant și dimensiuni de 12,39-19,15 x 8,72-14,76 μm.

Scleroții negri variază ca formă și au diametre de 2-7 μm.

Originea izolatului este pe fructe de căpșun bolnave din România.

Testele au dovedit capacitatea de a produce enzime: chitinaze (0,005-0,017 U/ml), β-1,3-glucanaze (13,71-21,17 U/ml), poli-fenol oxidaze (0,140-0,240 U/ml), fenil-alanina-amoniu liaze (0,236-0,413 /ml) și peroxidaze (0,334-0,391 U/ml).

Denumirea taxonomică:

Botrytis cinerea Pers. ex Fr, stadiul conidial al *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel SYN. *Sclerotinia fuckeliana* (de Bary) Fuckel

Mediu:

Cultivarea pe PDA (cartofi-dextroză-agar), Merk, ord.no.10130.0500, 39g / l mediu de cultură, pH 5,6 ± 0,2, autoclavate 15 min. la 121°C.

Condițiile de depozitare:

Culturi pure în eprubete cu mediul PDA înclinat, la 2-5°C

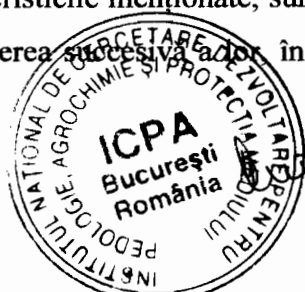
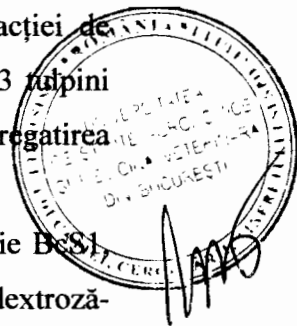
Condiții de testare a viabilității:

Incubare pe mediul de cultură PDA, pH 5,6 ± 0,2 la 22-25°C.

Prezenta invenție se referă, de asemenea, la un produs pentru imunizarea plantelor de căpșun contra agentului putregaiului cenușiu. În realizarea produsului de stimulare a reacției de apărare a plantelor de căpșun, o primă etapă este reprezentată de cultivarea celor 3 tulpini fungice de *Botrytis cinerea* în laborator pentru obținerea de preinocul, urmată de pregătirea mediului lichid de creștere.

Pentru realizarea preinoculului, în laborator se pregătesc tulpinile fungice de colecție BcS1, BcF7 și BcP2 de *Botrytis cinerea* care sunt cultivate pe mediul solid PDA (cartofi-dextroză-agar), Merk, ord.no.10130.0500, 39g/l mediu de cultură, pH 5,6 ± 0,2, autoclavat 15 min. la 121°C, repartizat în eprubete cu mediu înclinat.

Pentru creștere, tulpinile sunt incubate la termostat la 27°C timp de 30 zile. Fiecare cultură pe mediul agarizat este reluată în apă deionizată sterilă, într-o cantitate reprezentând 0,16% (v/v) din volumul vasului de creștere și având în soluție o concentrație de 10⁷-10⁹ ufc/ml. Culturile reluate în apă sterilă și prezentând caracteristicile menționate, sunt utilizate pentru inocularea mediului lichid de creștere, prin introducerea succesivă a lor în condiții sterile, în vasul de creștere.



Handwritten signature.

Producerea de exometaboliți cu rol elicitor a fost redusă în condițiile utilizării mediilor și a condițiilor clasice de creștere a fungilor, astfel că a devenit necesară realizarea unui mediu de creștere care să stimuleze dezvoltarea fungilor și implicit creșterea concentrației de compuși moleculari cu efect elicitor, dar și stabilirea parametrilor optimi pentru stimularea producerii acestora.

În acest sens, prin creșterea simultană a celor trei izolate fungice cât și prin prezența biomasei vegetale de căpșun în mediul de creștere lichid, s-a stimulat competiția intertulpinală cât și mecanismele biochimice interne ale tulpinilor implicate în atacului asupra plantei țintă, cu efecte asupra potențării proceselor de sinteză și de eliminare a exometaboliților .

Pentru creșterea celor 3 tulpini fungice (BcS1, BcF7 și BcP2) de *Botrytis cinerea* am optat pentru cultura lor pe mediu lichid, biomasa fungică dezvoltându-se atât la suprafață cât și în profunzimea lui.

Pentru prepararea mediului lichid a fost preferată apa deionizată. Mediul realizat este utilizat pentru efectul combinat asupra creșterii și a metabolismului tulpinilor fungice de *Botrytis*.

S-a preferat prepararea unui mediu proaspăt pentru a se evita un impact tehnologic asupra compoziției naturale a acestuia. Nu au fost utilizate antibiotice. Nu au fost utilizați stimulatori de creștere fungică. A fost evitată utilizarea cartofilor noi.

Preparare: 9 kg cartofi spălați, decojiți și tăiați în cuburi de 12mm. Se cântăresc cuburile de cartof și se fierb în apă deionizată, în vase de sticlă (metal smaltuit, inox) timp de 30 min. Se strecoară prin tifon. Se adaugă zaharoza 20g/l și se amestecă până la dizolvare. Se adaugă biomasa vegetală 3g/l. Biomasa vegetală se introduce sub formă de pulbere provenită din material vegetal (frunze de căpșun), uscat în prealabil la termostat la 60°C.

Se completează în final până la 18l cu apa deionizată pentru a se compensa evaporarea.

Mediul lichid se toarnă în bioreactoare sau vase de creștere din inox, hipoaerate, prevăzute cu sistem de agitare magnetică a conținutului. Vasul de creștere se umple cu mediu lichid până la 72-75% din volumul interior.

Dupa realizarea mediului s-a efectuat imediat ajustarea pH-ului la $5,6 \pm 0,2$ cu soluții molare de HCl și NaOH.

Nu a fost realizată clarificarea mediului lichid datorită efectului nefavorabil asupra tulpinilor fungice ale fitopatogenului.

Sterilizarea la cald s-a realizat cu vapori de apă, în autoclav, sub presiune, 20 min la 121°C, 1,1 atm. Prin controlul procesului de sterilizare s-a urmărit corelarea dintre temperatură și presiune pentru a evita supraîncălzirea și formarea compuşilor toxici din zaharuri.



Volume variabile ale mediul de creștere de până la 18l/vas nu au influențat caracteristicile finale ale produsului.

Mediul lichid inoculat cu cele 3 tulpini fungice selectate pentru producerea de elicitori este menținut în termostat la întuneric și la temperatura de 25-27°C pentru o perioadă de 21 de zile. Mediul este agitat prin intermediul unui agitator magnetic la intervale de 12 ore pentru o durată de 5-7min.

Inocularea mediului s-a realizat la 24h după sterilizare, dar acesta poate fi și păstrat la 2-4°C până la maxim 10 zile până la inoculare.

Inocularea și transferul izolatelor fungice pure din eprubete s-a realizat individual pentru fiecare tulpină fungică.

Pentru a verifica eficiența purificării fungilor izolați utilizați la inocularea mediului de creștere, au fost realizate în paralel inoculări pe medii favorabile dezvoltării bacteriilor (Mediul Topping).

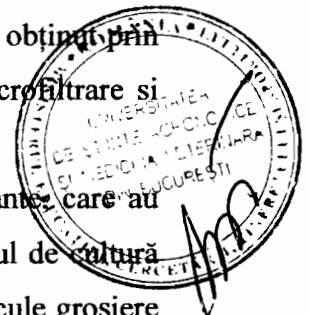
În scopul asigurării unui impact cât mai redus asupra structurilor moleculare, s-au utilizat procedee succesive de filtrare ale mediului lichid de creștere până la separari fracționale și selectarea intervalului în care greutatea moleculară ale amestecului de compuși prezintă activitate elicitoare și induce reacția de apărare a plantei.

Cultura simultană în mediu lichid a celor 3 tulpinilor aparținând fitopatogenului *Botrytis* cu respectarea condițiilor menționate anterior determină eliberarea în mediu a unui amestec complex de exometaboliți specifici, neuniformi ca structură și greutate moleculară și care stimulează reacția naturală de apărare a plantelor de căpșun.

Fracțiunile moleculare în care compușii cu efect elicitor sunt prezenți și activi s-au obținut prin trecerea succesivă a mediului de creștere fungică prin procedee de filtrare, microfiltrare și ultrafiltrare tangentială, obținându-se filtratul E2 (E2).

Filtrarea și microfiltrarea s-a realizat printr-o baterie succesivă de cartușe filtrante, care au acoperit o arie moleculară de separare a compușilor fără efect elicitor din mediul de cultură lichid din domeniul 10-10³ micrometri, până la 1-10 micrometri, respectiv pentru particule grosiere și fine din mediul de cultură fungică.

Procedeele de ultrafiltrare aplicat a permis separarea compușilor moleculari din domeniul 10⁻³-10⁻¹ micrometri sau 10-10⁴ angstromi responsabili de stabilirea caracterului elicitor. Domeniului molecular căruia îi aparțin compușii din mediul lichid de creștere fungică, care manifestă efect elicitor asupra plantelor de căpșun este cuprins între 5000Da și 2000 kDa. Pentru ultrafiltrarea mediului lichid de creștere s-a utilizat unitatea SEPA CF II OSMONICS, INC. ca unitate de filtrare tangentială cu membrană de polisulfon ce permit reținerea



Handwritten signature.

compușilor cu greutate moleculară de peste 5000Da și sub 2000 kDa, cu o suprafață de 140x190mm, capacitate de 70ml/min, presiunea maximă de 69 bar (1000psi).

Filtratul colectat s-a depozitat la 4°C în vase de plastic închise etanș sau la o temperatură ambientală sub 15°C, condiții în care prezintă stabilitate timp de 1-3 luni.

Nu s-au format complexe moleculare între diverși compuși prezenți în filtrat care să poată altera structura și rolul lor elicitor.

Absența oricăror elemente de înmulțire fungice sau bacteriene constituie o condiție necesară a acestui produs.

Compoziția filtratului reprezintă de fapt compoziția produsului final (filtratul E2) utilizat în inducerea rezistenței sistemice a plantelor de căpșun față de agentul fitopatogen *Botrytis cinerea*.

Modificări în procedura de obținere prin filtrare pot duce la modificări severe ale activității moleculelor elicitoare și / sau posibile reacții adverse fitotoxice.

Compoziția produsului cuprinde ca ingrediente active: proteine solubile, glucide reducătoare, flavonoide, polifenoli, enzime (pectin liaza, chitinaza, celuloza, carboximetilceluloza, β-1,3 glucanaza) și aminoacizi (asparagina, glutamina, serina, histidina, glicina, treonina, alanina, arginina, tirozina, valina, metionina, fenilalanina, izoleucina, leucina, lizina) determinate conform metodologiei clasice.

Proteine solubile total 1,06–22,67 mg/l, Glucide total reducătoare 1,98–19,39 mg/l, Flavonoide total 0,01–0,4485 μg/l, Polifenoli totali 39,42–336,51 mg/l, Pectin liaza 0,637–0,513 U/ml, Chitinaza 0,423–0,627 U/ml, Celuloza 0,012–1,98 U/ml, Carboximetilceluloza 0,018–0,940 U/ml, β-1,3 glucanaza – 1,109–7,092 U/ml, Aminoacizi continut total 456,19–467,79 mmol/100ml, Asparagina 28,81–38,54 nmoli/100ml, Glutamina 28,55–30,56 nmoli/100ml, Serina 40,92–61,28 nmoli/100ml, Histidina 5,66–13,21 nmoli/100ml, Glicina 22,98–45,25 nmoli/100ml, Treonina 25,21–43,04 nmoli/100ml, Alanina 35,11–50,12 nmoli/100ml, Arginina 99,93–126,24 nmoli/100ml, Tirozina 7,37–9,24 nmoli/100ml, Valina 38,06–38,78 nmoli/100ml, Metionina 9,67–19,43 nmoli/100ml, Fenilalanina 11,59–31,29 nmoli/100ml, Izoleucina 14,43–19,44 nmoli/100ml, Leucina 21,00–29,03 nmoli/100ml, Lizina 0,99–17,45 nmoli/100ml.

Produsul a fost condiționat prin tratare cu CaCO₃ în proporție de 1%.

Prezenta invenție se referă, de asemenea, la metodele de aplicare a produsului pentru imunizarea plantelor.

Tratamentul cu produsul fungic pentru stimularea reacției de apărare a plantelor de căpșun se face prin aplicare prin pulverizare fină cu ajutorul unui atomizor cu o dispersie de 60–80 μm



particulelor, la o distanță de peste 50 cm deasupra plantelor în zilele 1 și 4 de la începerea tratamentului, la un volum de filtrat de 40-60ml/m² suprafață de cultură, urmată de aplicarea diluată cu apă a produsului în raportul filtrat:apa (1:2) respectiv, la 50% din concentrația inițială a produsului pentru tratamentele din zilele 6 și 8 de la începerea tratamentului.

Pentru aplicarea în sol se mențin aceleași intervale între tratamente și concentrații ale filtratului, dar în funcție de caracteristicile tipului de sol, a capacității pentru apă în câmp și în funcție de necesitățile hidrice ale tipului de cultură, se estimează numărul de plante și se introduc cantități corespunzătoare de produs în apa de udare.

Nu este necesară repetarea tratamentului dacă ulterior apar fenomene meteorologice nefavorabile.

Produsul prevede, de asemenea, posibilitatea utilizării în paralel și a tratamentelor cu fungicide specifice căpșunului având ca substanță activă fenhexamid, iprodion, captan, dicloran și metil tiophanat.

Fungicidele care pot fi utilizate suplimentar după aplicarea produsului de inducere a rezistenței plantelor de căpșun sunt Teldor 500 SC- 1,70 l/ha, Rovral 500 SC – 2,2 l/ha, Captan 50WP – 6,75 Kg/ha, Botran 75 W- 0,98 kg/ha, Topsin M 70 – 1,70 kg/ha. În zilele 1 și 4 de la începerea tratamentului se pulverizează fin Captan+Teldor (1/1), iar în zilele 6 și 8 Captan+Botran (1/1) pentru pulverizările pe plantă, iar în sol, în zilele 1 și 4 Topsin M +Rovral (1/1) și Topsin M în zilele 6 și 8 de la începerea tratamentului.

Concentrația la care filtratul este aplicat pentru a induce rezistență la plante este de obicei format din 0,02g/l echivalenți de glucoză. Produsul obținut poate să fie ambalat și transportat sub formă lichidă în containere cu volume diferite de către utilizatorul final.

Produsul prevede posibilitatea diluării compoziției pentru inducerea rezistenței plantelor împotriva microorganismelor fitopatogene, ingredientele active ale produsului se pot asocia cu un diluant acceptabil în agricultură (apa).

Nu se recomandă utilizarea produsului pentru tratamente la căpșun, împreună cu agenți tensioactivi de tipul (sulfonat de naftalină, sulfat de alchil, alchilfenol etoxilat etc.) în cazul aplicărilor prin dispersie.

Nu se aplică produsul în diluții mai mari decât cele prevăzute în metoda de utilizare.

Nu se concentrază produsul prin tratamente termice.

Produsul nu conține aditivi de tipul inhibitorilor, agenților de îmbunătățire a aderenței la plante, antispumanților sau coloranților.

Aplicarea produsului este deosebit de eficientă în prevenirea apariției de focare produse de agenții patogeni fungici din genul *Botrytis* în cultura căpșunului.



Exemplu 2

EVOLUȚIA STĂRII FITOSANITARE A CULTURILOR DE CĂPȘUN LA TRATAMENTUL CU PRODUSUL FUNGIC CU EFECT ELICITOR, ÎN CONDIȚII CONTROLATE

În cadrul experiențelor organizate în vase de vegetație în seră s-au folosit două soiuri de căpșun, semirezistent-Marmolada, respectiv rezistent Elsanta la fitopatogenul *Botrytis cinerea*. Variantele experimentale au cuprins: martor Marmolada, martor Elsanta, tratament chimic cu fungicide de contact (ziua 1 Captan+ Teldor, ziua 4 Captan+Teldor, ziua 6 Captan+ Batron, ziua 8 Captan+Batron) tratament chimic cu fungicide sistemice la sol (ziua 1-Topsin+Rovral, ziua 4-Topsin+Rovral, ziua 6-Topsin M, ziua 8-Topsin M), Tratamente cu filtratele E1,E2, E3 și E4 aplicate pe plantă și la sol în zilele 1, 4, 6 și 8 de la începerea tratamentului. La 48h de la terminarea tratamentului a fost inoculat patogenul *Botrytis cinerea*.

S-au recoltat plantele de căpșun inoculate cu patogeni (variantele martor;tratate chimic la plantă și la sol; tratate cu extractele E1,E2,E3 și E4 în câte 3 repetiții din fiecare variantă.

Plantarea stolonilor de căpșun s-a efectuat în ghivece cu 3 kg sol/ghiveci. Vasele de vegetație au fost așezate în seră pentru monitorizarea cât mai bună a factorilor de mediu. Factorii de vegetație, lumină, temperatură, umiditate, au fost înregistrați zilnic.

Asupra plantelor s-au efectuat observații și determinări în timpul perioadei de vegetație cât și la recoltarea pentru analize a materialului biologic care au cuprins: dinamica creșterii în înălțime a plantelor de căpșun; dinamica formării numărului de frunze; ritmul de creștere al plantelor; evoluția petelor de boală în timpul perioadei de vegetație, înainte și după inocularea cu patogeni la 24 ore, 48 ore, 72 ore și la 7 zile; suprafața foliară; numărul de frunze total pe plantă; numărul de frunze sănătoase și afectate; procentul de frunze afectate față de numărul total de frunze; procentul de atac față de suprafața foliară. La probele recoltate s-a evaluat masa plantelor, înălțimea plantelor, numărul de frunze. Pentru aprecierea rezultatelor s-a efectuat interpretarea statistică a datelor.

Monitorizarea stării fitosanitare a plantelor tratate cu filtratele E1, E2, E3 și E4 care ulterior au fost infectate experimental cu *Botrytis* a arătat faptul că, în privința numărului de frunze afectate, la soiul Elsanta, se remarcă variantele tratate cu produsul E2 la plantă și sol cu cel mai mic procent de frunze afectate de 3,45 % respectiv 4%. La soiul Marmolada variantele tratate cu E1 și E3 au prezentat cel mai mic procent de frunze afectate (tratament la plantă), iar la tratamentul la sol se remarcă varianta tratată cu E2. La soiul Elsanta, după 48 de ore de la inocularea cu patogen, la varianta martor s-au remarcat pete, procentul de atac fiind de 0,57% din totalul suprafeței foliare, iar după 2 zile procentul fiind de 25,75%. Cel mai mic



procent de atac s-a remarcat la varianta tratată cu E2 la plantă, de 0,23% (Fig.5). Analiza varianței pentru dimensiunea petelor după 7 zile de la aplicarea inoculului la soiul Elsanta (Tabel 1) arată o reducere foarte semnificativă a valorilor de la varianta tratată cu E2 aplicat foliar. La soiul Marmolada procentul cel mai mic de atac din totalul suprafeței foliare s-a remarcat pentru varianta tratată cu E2 la sol.

Tabel 1 - Analiza varianței pentru dimensiunea petelor după 7 zile de la aplicarea inoculului cu patogen la soiul Elsanta

Varianta experimentală soiul Elsanta	Tratament - pe planta				Tratament - la sol				
	Valori relative		Dif.		Valori relative		Dif.		Semnif.
	cm ²	cm ²	%		cm ²	cm ²	%		
V1 Martor	105.28	0.00	100.00	Mt	105.47	0.00	100.00	Mt	
V2 tratat chimic	27.90	-77.38	26.50	OO	83.33	-22.15	79.00	N	
V3 tratat cu E1	4.67	-100.61	4.44	OO	4.67	-100.81	4.43	OO	
V4 tratat cu E2	1.00	-104.28	0.95	OOO	1.00	-104.47	0.95	OO	
V5 tratat cu E3	39.67	-65.61	37.68	O	39.67	-65.81	37.61	O	
V6 tratat cu E4	14.00	-91.27	13.30	OO	13.67	-91.81	12.96	OO	
DL5% = 49.510					DL5% = 51.140				
DL1% = 70.470					DL1% = 72.790				
DL0,1% = 101.910					DL0,1% = 105.260				
Semnif exp.	**				Semnif exp.	**			

Exemplul 3

INFLUENȚA APLICĂRII PRODUSULUI FUNGIC ASUPRA COMPOZIȚIEI BIOCHIMICE A PLANTELOR DE CĂPȘUN CULTIVATE ÎN CONDIȚII CONTROLATE

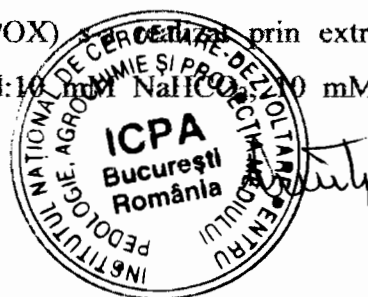
Materialul biologic a constat din două varietăți de plante de căpșun, Elsanta și Marmolada. Plantele supuse experimentelor au fost crescute în seră în condițiile descrise la exemplul 2.

Plantele au fost testate pentru evaluarea efectului aplicării unor tratamente cu produsul fungic E2 pe plantă și în sol asupra activității unor enzime legate de patogenitate precum: peroxidaza (POX) și fenilalanin-amonium-liaza (PAL) cu rol important în sistemul de apărare al plantelor.

În acest sens au fost realizate variante experimentale de tratament chimic și cu filtrate fungice aplicate pe plante și în sol: martor, tratament chimic cu fungicide și cu filtratele: (E1) -cu o tulpina de *Botrytis cinerea*, (E2) *Botrytis cinerea* tulpinile-BcS1, BcP2, BcF7, (E3) cu tulpini antagoniste și (E4) cu tulpini de *Botrytis* și de antagonisti.

Pentru obținerea omogenatului, de la fiecare variantă experimentală s-au prelevat frunze tinere care au fost cântărite (cca 500 mg) și mojarate cu nisip de cuarț.

Dozarea activității peroxidazelor (POX) prin extracția enzimatică în tampon Tris-HCl 20 mM, pH 8 conținând: 10 mM NaHCO₃, 10 mM Mg Cl₂, 0,1 mM



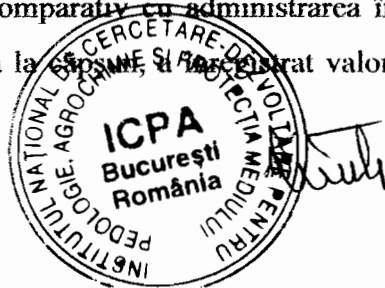
[Handwritten signature]

Na₂EDTA, 10 mM β-mercaptoetanol, 10% sucroză, 0,1% Triton X-100, la 4°C timp de 4 ore. Omogenatul a fost supus apoi centrifugării timp de 10 min la 12.000 rot/ min. Supernatantul obținut a fost supus dozării enzimatică. Activitatea enzimatică a peroxidazelor s-a determinat prin incubarea enzimei în prezența H₂O₂ 3% și guaiacol 30mM. S-a înregistrat spectrofotometric modificarea DO_{470nm} la intervale de 1 min., timp de 5 min. O unitate de activitate enzimatică reprezintă modificarea densității optice cu 0,1 unități /min. Activitatea peroxidazică a fost exprimată în unități / ml enzimă.

Dozarea activității L-fenilalanin-amonium-liazei (PAL) s-a realizat prin extracția enzimatică în 5 ml tampon borat de sodiu 0,1 M (pH 7,0) ce conține 0,1 g polivinilpirolidonă (PVP). Omogenatul a fost centrifugat la 10.000 rpm timp de 35 minute la 4 °C, iar supernatantul obținut a fost supus dozării. Amestecul de reacție a fost compus din 0,4 ml extract enzimatic, 0,5 ml tampon borat 0,1M (pH 8,8) și 0,5 ml de L-fenilalanină 12 mM. Amestecul de reacție a fost incubat apoi pe baia de apă la 30 °C timp de 30 de minute. Ca punct de referință, s-a realizat un amestec ce a constat din 0,4 ml extract enzimatic și 1 ml tampon borat. Activitatea PAL a fost determinată spectrofotometric prin înregistrarea ratei de conversie a L-fenilalaninei la acid trans-cianaminic, la DO_{290nm}. Coeficientul de extincție utilizat pentru calcularea cantității de acid trans-cianaminic formată a fost de 9630 M⁻¹ (Dickerson și colab., 1984). Activitatea enzimatică a fost exprimată în unități /ml enzimă.

Analiza parametrilor biochimici după aplicarea tratamentelor pe plantă sau la nivelul solului a arătat faptul că, la genotipurile de căpșun testate, soiurile Elsanta și Marmolada, activitatea POX (enzimă implicată în sistemul de răspuns antioxidant) nu este indusă de tratamentul chimic cu fungicide. În ceea ce privește activitatea L-fenilalanin-amonium-liazei PAL (o enzimă cu rol important în reacțiile de apărare a plantelor), la genotipurile de căpșun s-au înregistrat diferențe valorice atât între genotipuri cât și ca urmare a modului de aplicare a tratamentului.

La plantele de căpșun din soiurile Marmolada și Elsanta tratate pe plantă sau la sol, cu câte 4 tipuri de extracte fungice diferite, analizele comparative ale rezultatelor obținute au relevat faptul că există diferențe semnificative în ceea ce privește inducerea activității POX, diferențe apărute atât ca urmare a modului de aplicare a tratamentelor (plantă / sol) cât și datorită tipului de filtrat utilizat și a genotipului testat. Valori crescute ale activității POX induse de tratamentul cu E2 au fost înregistrate la ambele soiuri testate, comparativ cu martorii și cu tratamentele chimice cu fungicide, iar în privința modului de administrare, după aplicarea filtratului fungic E2 pe plantă comparativ cu administrarea în sol. Activitatea L-fenilalanin-amonium-liazei (PAL) evaluată la ambele soiuri și înregistrat valori crescute la ambele



soiuri testate după tratamentul pe plantă cu filtratul E2 de *Botrytis cinerea* tulpinile Bc S1, Bc P2, Bc F7 și cu filtratul E3 aplicat la sol (Fig.4).

Exemplul 4

INFLUENȚA APLICĂRII PRODUSULUI FUNGIC ASUPRA MICROFLOREI FILOSFERICE ȘI RIZOSFERICE A PLANTELOR DE CĂPȘUN CULTIVATE ÎN CONDIȚII CONTROLATE

În rizosferă, numărul de funghi exprimat în unitati formatoare de colonii (ufc/g sol uscat) s-a determinat prin însămânțarea diluțiilor de sol pe mediul PDA, incubare 14 zile și numărarea coloniilor rezultate. Au fost identificați taxonii care alcătuiesc micocenozele edafice, pe baza caracteristicilor morfologice evidențiate de examinarea prin microscopie optică a preparatelor lamă-lamelă efectuate.

Pentru studierea influenței filtratului E2 aplicat pe frunze și în sol asupra cenozelor fungice din filosferă, comparativ cu filtratele E1, E3 și E4, cu tratamentele chimice cu fungicide și cu martorul din experiențele organizate în seră, de la plantele de căpșun, soiurile Marmolada și Elsanta s-au recoltat câte 3 frunze/vas/repetiție, în total 9 frunze/variantă experimentală. S-au decupat pătrate cu latura de 1cm din zona mijlocie a părții drepte a foliolelor, care au fost agitate timp de 30 min în eprubete cu ser fiziologic steril din care au fost efectuate însămânțări pe mediul PDA, în placi Petri de 10cm diametru. După incubare la 25°C timp de 5-7 zile, acestea au fost examinate pentru determinarea densității fungilor exprimată în ufc/cm² de suprafață foliară și stabilirea apartenenței taxonomice a coloniilor dezvoltate.

S-a calculat abundența relativă (A%) pentru fiecare taxon fungic și s-au încadrat genurile identificate în 3 clase de abundență.

După administrarea filtratelor și respectiv, a fungicidelor, la 14 zile de la tratament s-a realizat infectarea experimentală a plantelor de căpșun cu inocul de *Botrytis cinerea*.

Probe de sol prelevate la încheierea ciclului experimental în seră au fost analizate prin metoda însămânțării granulelor de 5mm diametru pe mediul suport apa-agar cu streptomycin și incubare timp de 5 zile. Placile Petri (3/variantă experimentală) au fost examinate prin microscopie optică pentru identificarea taxonilor dezvoltați și înregistrarea prezenței acestora în probe. Ulterior, s-a estimat numărul mediu de colonii și frecvența fiecărui taxon, aceștia fiind încadrați în 3 grupe de constanță care dau statutul de taxon constant, accesoriu și accidental.



[Handwritten signature]

Din punct de vedere microbiologic, solul utilizat în experimentele descrise la exemplul 2 conține un număr mare de bacterii și fungi, o microfloră diversificată, dar conține puțini antagoniști naturali, ceea ce îl recomandă pentru aplicarea de produse cu rol elicitor.

După aplicarea tratamentelor cu filtrate, tiparul de reacție a fost relativ asemănător, în sensul unei reduceri a numărului de taxoni la E1 și E3 și păstrarea unei diversități mai mari la E2 și E4. Se evidențiază menținerea slabă a răspunsului la E3 aplicat în sol.

Datele obținute ilustrează comparativ compoziția cenzelor fungice din filosfera plantelor de căpșun-soiul semirezistent Marmolada din experiențele organizate în seră, repartizarea taxonilor în 3 clase după abundența relativă (pondera în comunitate) precum și densitatea fungilor raportată la unitatea de suprafață foliară (Tabel 2).

Tratamentele chimice cu fungicide de contact administrate prin pulverizare au distrus total microflora filosferică, la această variantă nefiind izolat nici un taxon.

Rezultatele studiului aceluiași parametri la soiul rezistent Elsanta sunt analizate după administrarea filtratelor și respectiv, după ce s-a realizat infectarea experimentală a plantelor cu inocul de *Botrytis cinerea* (Tabel 3).

Dacă la aplicarea filtratelor, situația era relativ similară cu cea a matorului în privința numărului de specii care alcătuiau cenoza filosferică, după inocularea cu *Botrytis cinerea* s-a înregistrat un răspuns heterogen al fungilor la prezența patogenului, numărul de genuri care alcătuiesc cenoza filosferică variând între 1 și 6.

Genul *Botrytis* s-a dezvoltat cu o pondere de 50% la mator ca urmare a inițierii de infecții provocate de germinarea propagulelor din inocul, unde este codominant alături de *Aspergillus*. Acesta din urmă se dezvoltă în număr mare pe țesuturile îmbătrânite ale frunzelor, dominând cenozele la 7 din cele 11 variante experimentale. Restul genurilor au abundențe scăzute. Ca urmare a infecțiilor dezvoltate, densitatea fungilor la mator a fost de 900ufc/cm² suprafață foliară, superior tuturor celorlalte tratamente

Spre deosebire de mator, variantele tratate cu filtrate cu rol elicitor și fungicide nu conțin genul *Botrytis*. Acesta apare cu statut accesoriu în solul mator de la soiul de căpșun Marmolada și accidental la tratamentele cu fungicide și la administrarea în sol a filtratului E1, prezența sa datorându-se inoculării efectuate experimental, fie caracteristicilor de imunitate ale soiului semirezistent. Restul filtratelor, indiferent de modul de administrare, opresc proliferarea patogenului în sol. La soiul rezistent Elsanta (Tabel 4), acesta apare doar la mator cu statut de taxon accidental, fiind oprit, de asemenea, în dezvoltare de toate tratamentele aplicate (chimice și cele cu filtrate fungice).



Compararea datelor referitoare la sol cu cele anterioare prezentate pentru filosferă arată o diversitate specifică mai mare în cazul solului și o stabilitate mai mare a cenozeleor fungice la variantele experimentale tratate cu produsul fungic E2 cu rol imunostimulant.

Tabel 2- Microflora filosferică la experiența în seră cu căpșun - soiul Marmolada

Nr.	Taxoni identificați	Varianta experimentală										
		Martor	Tratament chimic		E1		E2		E3		E4	
			contact	sistemic	planta	sol	planta	sol	planta	sol	planta	sol
1	<i>Cladosporium</i>											
2	<i>Rhizopus</i>											
3	<i>Myrothecium</i>											
4	<i>Trichoderma</i>											
5	<i>Penicillium</i>											
6	<i>Alternaria</i>											
7	<i>Aureobasidium</i>											
8	<i>Fusarium</i>											
9	<i>Aspergillus</i>											
10	<i>Verticillium</i>											
11	<i>Paecilomyces</i>											
Nr. ufc/cm ² suprafața foliară		90	0	4	270	120	150	90	150	450	150	180

A=67-100%
A=34-66%
A=0-33%

Tabel 3 - Microflora filosferică la experiența în sera cu căpșun – soiul Elsanta

Nr.	Taxoni identificați	Varianta experimentală										
		Martor	Tratament chimic		E1		E2		E3		E4	
			contact	sistemic	planta	sol	planta	sol	planta	sol	planta	sol
1	<i>Aspergillus</i>											
2	<i>Epicoccum</i>											
3	<i>Fusarium</i>											
4	<i>Aureobasidium</i>											
5	<i>Cladosporium</i>											
6	<i>Alternaria</i>											
7	<i>Verticillium</i>											
8	<i>Scopulariopsis</i>											
9	<i>Cladosporium</i>											
10	<i>Botrytis</i>											
11	<i>Myrothecium</i>											
12	<i>Penicillium</i>											
Nr. ufc./cm ² suprafața foliară		90	0	0	120	60	90	140	60	60	30	20

A=67-100%
A=34-66%
A=0-33%

Tabel 4 - Microflora edafosferică la experiența în seră cu căpșun - soiul Elsanta

Nr.	Taxoni identificați	Varianta experimentală										
		Martor	Tratament chimic		E1		E2		E3		E4	
			contact	sistemic	planta	sol	planta	sol	planta	sol	planta	sol
1	<i>Fumicola</i>											
2	<i>Nematoclonus</i>											
3	<i>Botrytis</i>											
4	<i>Cunninghamella</i>											
5	<i>Acremonium</i>											
6	<i>Fusarium</i>											
7	<i>Candida</i>											
8	<i>Miceli sterila</i>											
9	<i>Myrothecium</i>											
10	<i>Mortierella</i>											
11	<i>Actinomicete</i>											
12	<i>Helminthosporium</i>											
13	<i>Rhizoglyphus</i>											
14	<i>Amblyosporium</i>											
15	<i>Papulopora</i>											
16	<i>Actinomucor</i>											
Nr. colonii izolate		6	8	6	8	9	10	10	10	5	13	9

Taxon constant
Taxon accesoriu
Taxon accidental



Handwritten signature.

Exemplul 5

EFFECTUL PRODUSULUI FUNGIC ASUPRA PLANTELOR DE CĂPȘUN DIN SOIUL SENGANA SENGANA ÎN CÂMPUL EXPERIMENTAL

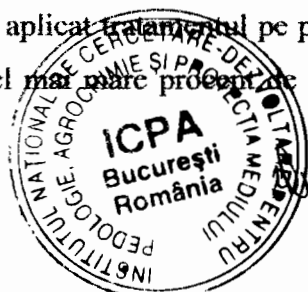
S-a folosit soiul de căpșun Senga Sengana, sensibil la *Botrytis*, cultivat în câmp. Perioada de desfășurare a experienței, mai-iulie 2010. Variantele experimentale cuprind variante de tratament (Factor A-tratamente aplicate) cu a1-martor, a2-tratament chimic, a3-extract fungic E2, a4-extract fungic E4, a5-extract fungic E2+tratament chimic, a6-extract fungic E4+tratament chimic) și variante de aplicare (Factor B-modul de aplicare) cu b1-aplicare pe planta, b2-aplicare în sol. Pentru tratamentul chimic s-au utilizat fungicide de contact și sistemice (Captan 50WP – conc. 6,75 kg/ha, Teldor - conc. 1,70 kg/ha, Batron - conc. 0,98 kg/ha, Topsin M- conc. 1,70 kg/ha, Rovral-conc. 2,2 kg/ha.

Tratamentul pentru variantele cu fungicide de contact cuprinde, pentru zilele 1 și 4 de la începerea tratamentului, combinația Captan +Teldor (1/1) pulverizat fin și pentru zilele 6 și 8, combinația Captan+Batron (1/1), iar pentru tratamentul cu fungicide sistemice în zilele 1 și 4, combinația Topsin M+Rovral (1/1), introdus în sol și pentru zilele 6 și 8, Topsin M Cantitatea de soluție folosită la tratament cu extractele fungice E2 și E4: 40-60 ml de lichid pulverizat/plantă cu un grad de dispersie de 60-80μ, sau aplicat în sol.

În cazul variantelor de tratament combinat (extracte fungice și fungicide) s-a aplicat succesiv tratamentul cu extracte și ulterior tratamentul cu fungicid.

S-a efectuat monitorizarea parametrilor biometrici și de caracterizare a stării fitosanitare a plantelor, ca: evoluția petelor de boală în timpul perioadei de vegetație; suprafața foliară; numărul de frunze și fructe sănătoase și afectate; procentul de frunze afectate față de numărul total de frunze; procentul de atac față de suprafața foliară. Compararea rezultatelor s-a efectuat cu ajutorul analizei statistice a datelor.

S-a remarcat faptul că plantele martor netratate chimic la sol au prezentat un număr de frunze afectate mai mare comparativ cu cele tratate cu E2 și E4 la plantă și la sol și cu fungicide (Tabel 5). La variantele tratate cu E2, la plantă și la sol s-a observat procentul cel mai mic de frunze afectate. Variantele tratate cu produsul E2 și E4 și cele cu tratament chimic pe plantă au prezentat pete de atac pe frunze în număr foarte redus. Frunzele au fost afectate înainte de tratament, iar procesul de extindere a petelor de necroză fost semnificativ redus după tratament, la variantele tratate chimic la plantă și la cele tratate cu E2 și E4 la plantă și la sol. Procentul de frunze afectate a fost mai mare la plantele la care am efectuat tratamentul la sol comparativ cu variantele la care am aplicat tratamentul pe partea vegetativă. S-a remarcat faptul că varianta martor a prezentat cel mai mare procent de frunze afectate, iar extinderea



Handwritten signature.

pectelor a fost foarte rapidă comparativ cu variantele tratate chimic sau cu E2 și E4, atât la plante cât și la sol.

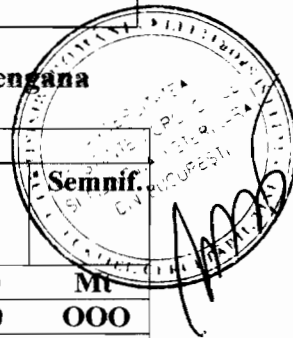
Din analiza statistică a datelor (Tabel 6) se poate aprecia faptul că cel mai mare procent de fructe afectate a fost observat la martor (27,66%), ritmul de extindere a petelor a fost foarte rapid în intervalul de monitorizare (7zile), diferențele fiind foarte semnificative între martor și variantele cu filtrate fungice sau cu tratamente combinate (filtrat+tratament chimic). Fructele recoltate din variantele tratate cu produsul E2 s-au pastrat bine în condiții de depozitare, cu 3-4 zile mai mult decât cele tratate cu fungicide sau netratate.

Tabelul 5 - Analiza varianței pentru procentul de frunze afectate - soiul Senga Sengana

Varianta experimentală soiul Senga Sengana	Tratament - pe planta				Tratament - la sol			
	Valori relative	Dif. buc.	%	Semnif	Valori relative	Dif. buc.	%	Semnif.
	buc				buc			
V1 martor	22.35	0.00	100	Mt	22.35	0.00	100.00	Mt
V2Tratam.chimic	4.05	-18.30	18.12	OOO	14.59	-7.76	65.28	OOO
V3 Tratament E2	0.53	-21.82	2.37	OOO	0.94	-21.41	4.21	OOO
V4 Tratament E4	0.86	-21.49	3.85	OOO	0.97	-21.38	4.34	OOO
V5E2+ trat.chimic	1.02	-21.33	4.56	OOO	1.64	-20.71	7.34	OOO
V6E4+trat.chimic	1.56	-20.79	6.98	OOO	3.80	-18.55	17.00	OOO
Media	5.06	-17.29	22.65	OOO	7.38	-14.97	33.03	OOO
DL5% = 2.290 DL1% = 3.600 DL0,1% = 6.130					DL5% = 1.990 DL1% = 3.120 DL0,1% = 5.310			
Semnif exp.	***				Semnif exp.	***		

Tabelul 6 - Analiza varianței pentru procentul de fructe afectate - soiul Senga Sengana

Varianta experimentală soiul Senga Sengana	Tratament - pe planta				Tratament - la sol			
	Valori relative	Dif.	%	Semnif.	Valori relative	Dif.	%	Semnif.
	buc.	buc			buc.	buc		
V1 martor	27.66	0.00	100.00	Mt	27.66	0.00	100.00	Mt
V2 Tratament chimic	11.45	-16.21	41.40	OOO	8.85	-18.81	32.00	OOO
V3 Tratament E 2	4.11	-23.55	14.86	OOO	5.60	-22.06	20.25	OOO
V4 Tratament E 4	3.02	-24.65	10.90	OOO	3.25	-24.41	11.75	OOO
V5 E2+trat.chimic	3.33	-24.33	12.04	OOO	5.87	-21.79	21.22	OOO
V6 E4+trat.chimic	3.81	-23.85	13.77	OOO	4.83	-22.83	17.46	OOO
Media	8.90	-18.76	32.16	OOO	9.34	-18.32	33.78	OOO
DL5% = 1.480 DL1% = 2.330 DL01% = 3.970					DL5% = 1.480 DL1% = 2.320 DL01% = 3.960			
Semnif exp.	***				Semnif exp.	***		



Handwritten signature

REVENDICĂRI

1 Tulpină de *Botrytis cinerea*, BcS1, depozitată cu numărul P999 la Microbial Strain Collection of Latvia, University of Latvia, pe 13.09.2010 caracterizată prin aceea că prezintă colonii alb cenușii lănoase cu rari scleroți negri pe mediul Czapek, colonii cenușii cu numeroși scleroți negri pe mediul PDA, conidioforilor brun, septați, lungi, ramificați intercalat sau apical, conidii netede, neseptate, hialine spre galben brun obovoide cu hilul protuberant și capacitatea de a produce enzime cu rol elictor de tip chitinaze, β -1,3-glucanaze, poli-fenol oxidaze, fenil-alanina-amoniu liaze și peroxidaze.

2. Tulpină de *Botrytis cinerea*, BcP2, depozitată cu numărul P1000 la Microbial Strain Collection of Latvia, University of Latvia, pe 13.09.2010, caracterizată prin aceea că prezintă colonii dense lănoase, cenușiu închis cu numeroși scleroți negri, conidiofori înalți, subțiri, brun, septați, netezi, cu ramificații intercalare care poartă capete conidiale, conidii netede, neseptate, hialine spre brun deschis, ovoide sau subgloboase, hilul slab protuberant și capacitatea de a produce enzime cu rol elictor de tip chitinaze, β -1,3-glucanaze, poli-fenol oxidaze, fenil-alanina-amoniu liaze și peroxidaze.

3. Tulpină de *Botrytis cinerea*, BcF7, depozitată cu numărul P1001 la Microbial Strain Collection of Latvia, University of Latvia, pe 13.09.2010, caracterizată prin aceea că prezintă colonii hialine inițial, deschise la culoare în centru, lănoase și cu nuanțe brune spre margini, cu scleroți negri dezvoltați în număr moderat, conidiofori înalți, brun, netezi, septați, ramificați neregulat, cu capete conidiale apicale și intercalare, conidii brune deschis, netede, neseptate, elipsoidale până la obovoide, cu hil protuberant și capacitatea de a produce enzime cu rol elictor de tip chitinaze, β -1,3-glucanaze, poli-fenol oxidaze, fenil-alanina-amoniu liaze și peroxidaze.

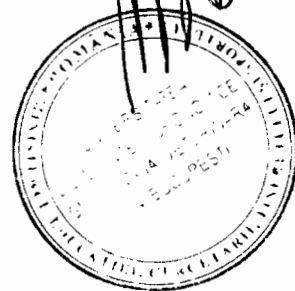
4. Produs pentru inducerea reacției de apărare a plantelor de căpșun împotriva fitopatogenului *Botrytis cinerea* caracterizat prin aceea că este un ultrafiltrat format din exometaboliții cu rol elictor din domeniul molecular 5000Da-2000kDa care sunt eliberați în mediul de creștere de către amestecul tulpinilor definite la revendicările 1, 2 și 3, în prezența biomasei vegetale de căpșun și conține proteine solubile total 1,06-22,67 mg/l, glucide total reductoare 1,98-19,39mg/l, flavonoide total 0,01-0,4485 μ g/l, polifenoli totali 39,42-336,51mg/l, pectin liază 0,637-0,513 U/ml, chitinază 0,423-0,627 U/ml, celulază 0,012-1,98 U/ml, carboximetilcelulază 0,018-0,940 U/ml, β -1,3 glucanază - 1,109-7,092 U/ml, aminoacizi conținut total 456,19-467,79mmol/100ml, asparagină 28,81-38,54 nmoli/100ml, glutamină 28,55-30,56nmoli/100ml, serină 40,92-61,28nmoli/100ml, histidină 5,66-13,21nmoli/100ml,



[Handwritten signature]

glicină 22,98–45,25nmoli/100ml, treonină 25,21–43,04nmoli/100ml, alanină 35,71–50,12nmoli/100ml, arginină 99,93–126,24nmoli/100ml, tirozină 7,37–9,24 nmoli/100ml, valină 38,06–38,78nmoli/100ml, metionină 9,67-19,43 nmoli/100ml, fenilalanină 11,59–31,29 nmoli/100ml, izoleucină 14,43–19,44 nmoli/100ml, leucină 21,00–29,03 nmoli/100ml, lizină 0,99-17,45 nmoli/100ml.

5 Metode de aplicare a produsului definit la revendicarea 4, caracterizat prin aceea că produsul se aplică preventiv pe plantă sau în sol, se administrează în 4 tratamente succesive, de două ori cu produsul concentrat la un interval de 4 zile și de două ori cu produsul diluat la 50% la un interval de 2 zile, câte 40-60ml/m², prin pulverizare fină (60-80 microni) pe plantă, sau în apa de irigație, iar după aplicarea tratamentului nu este necesară repetarea lui în cursul sezonului de vegetație.



[Handwritten signature]

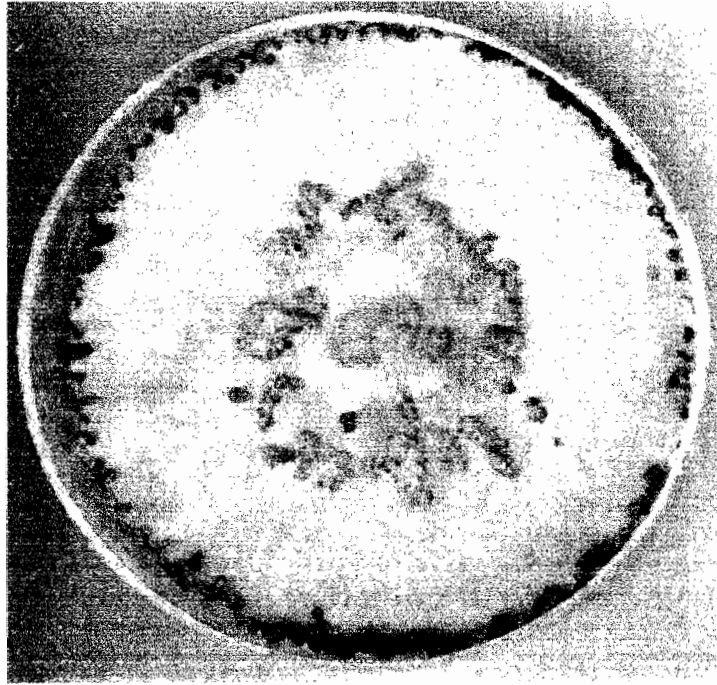
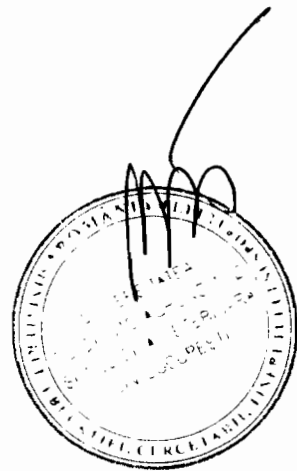


Figura 1



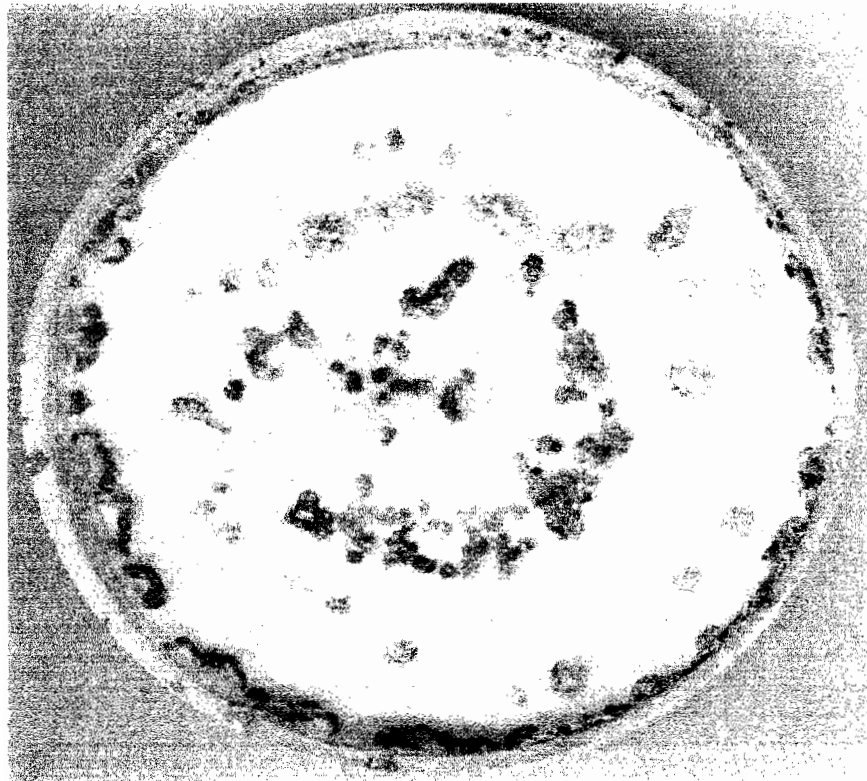
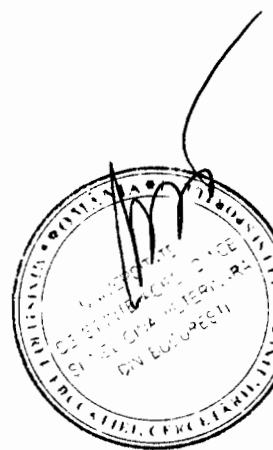


Figura 2



Handwritten signature

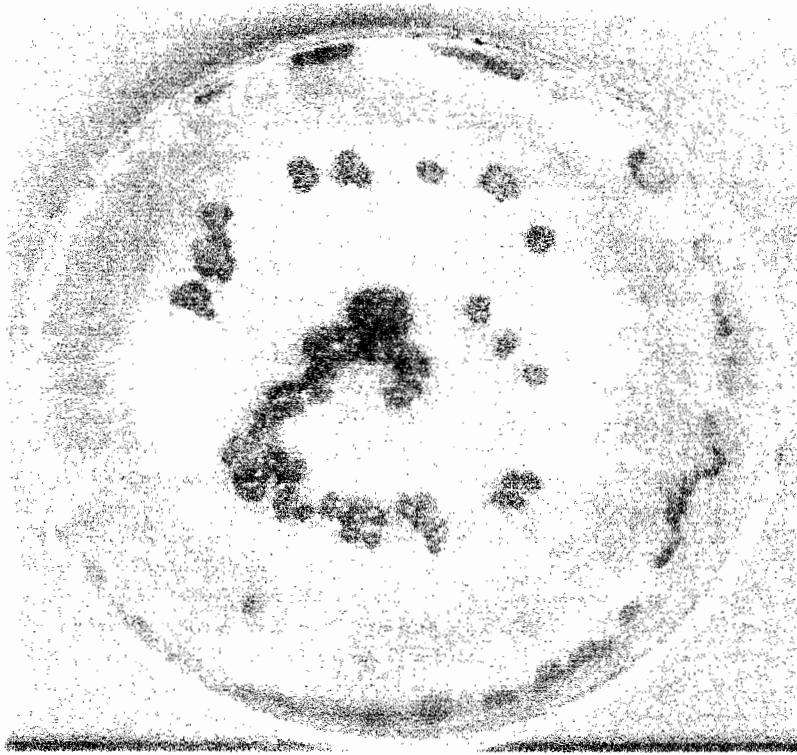


Figura 3



A handwritten signature in black ink, located at the bottom right of the page.

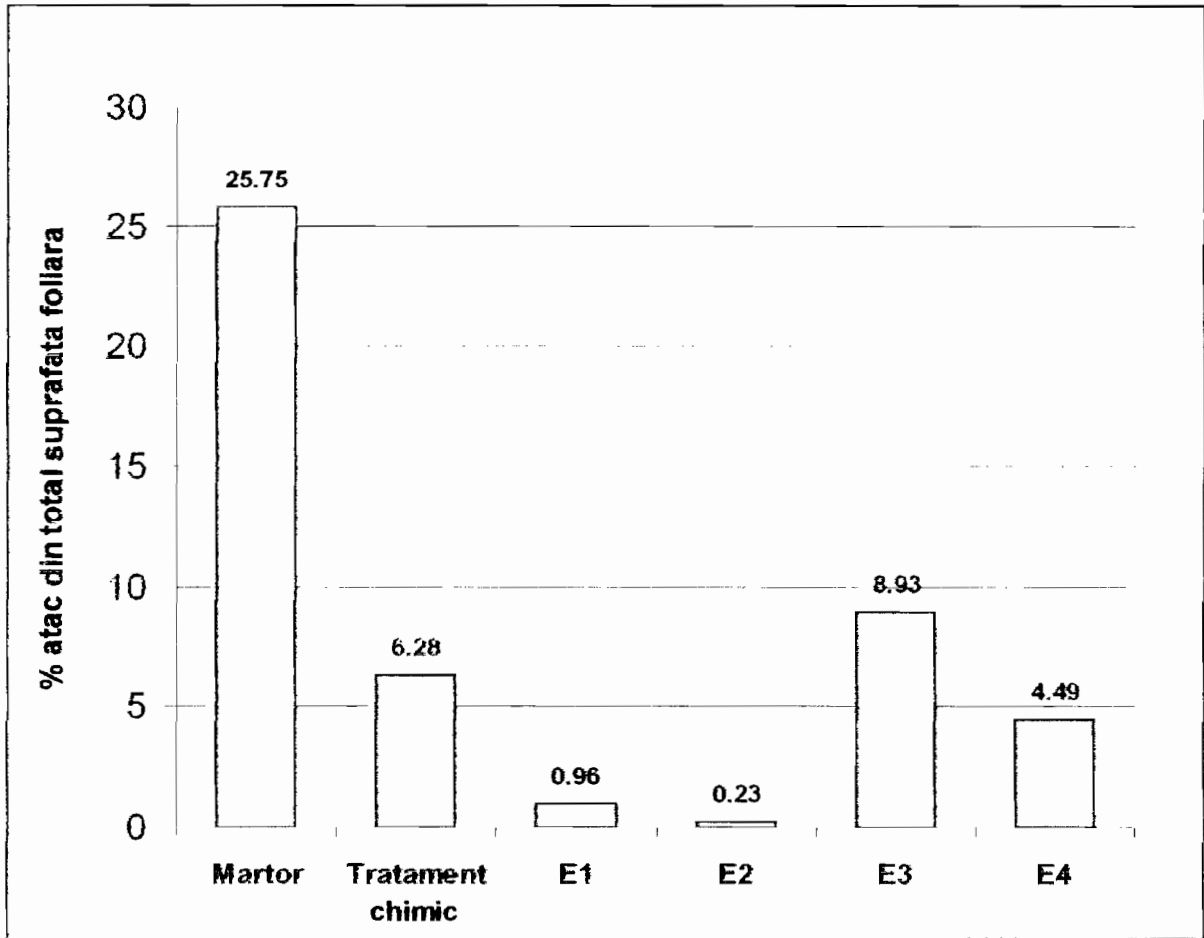
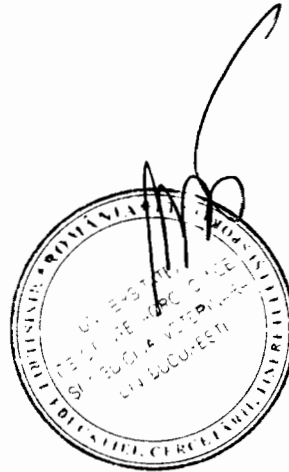


Figura 4



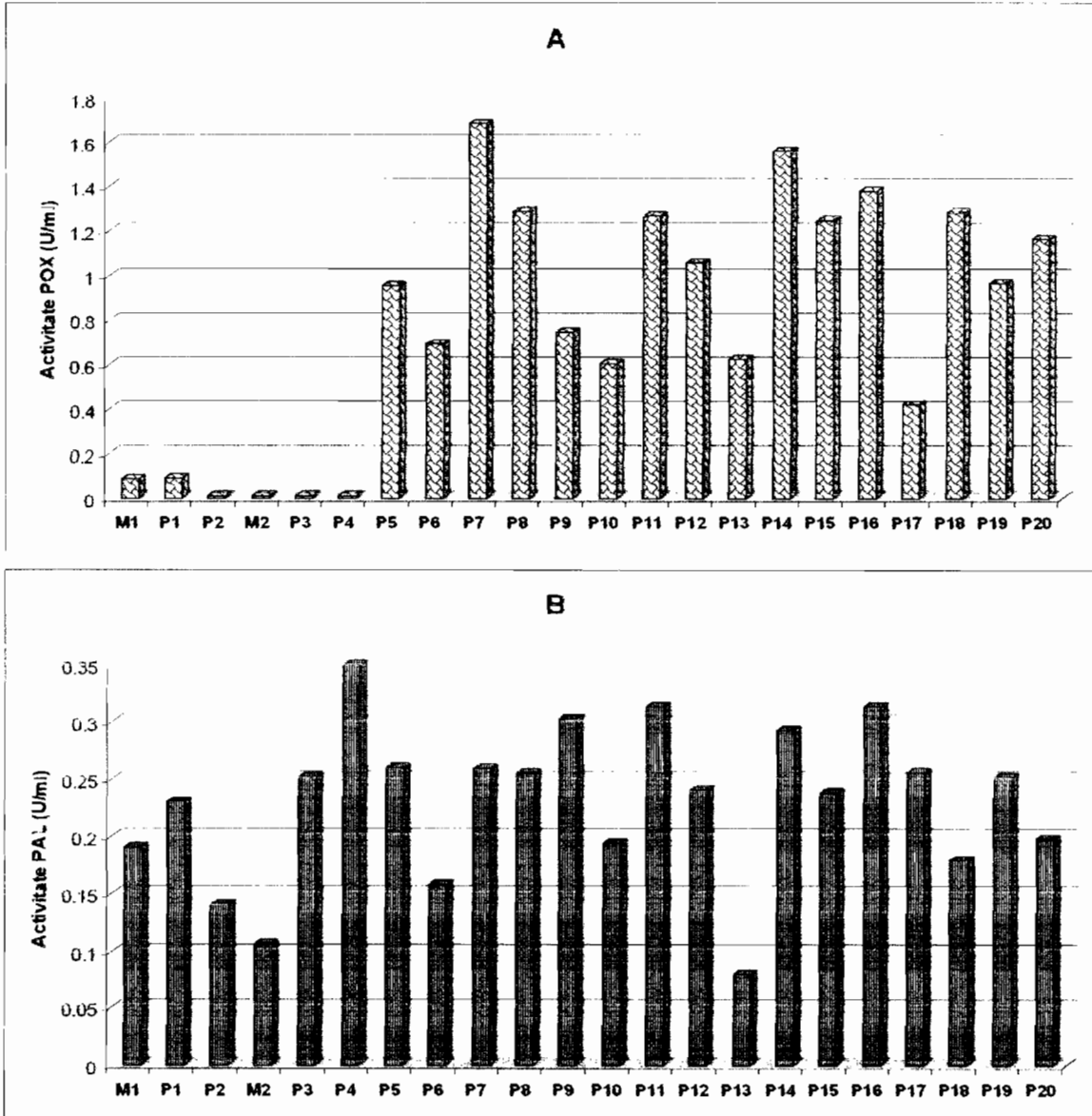


Figura 5



[Handwritten signature]

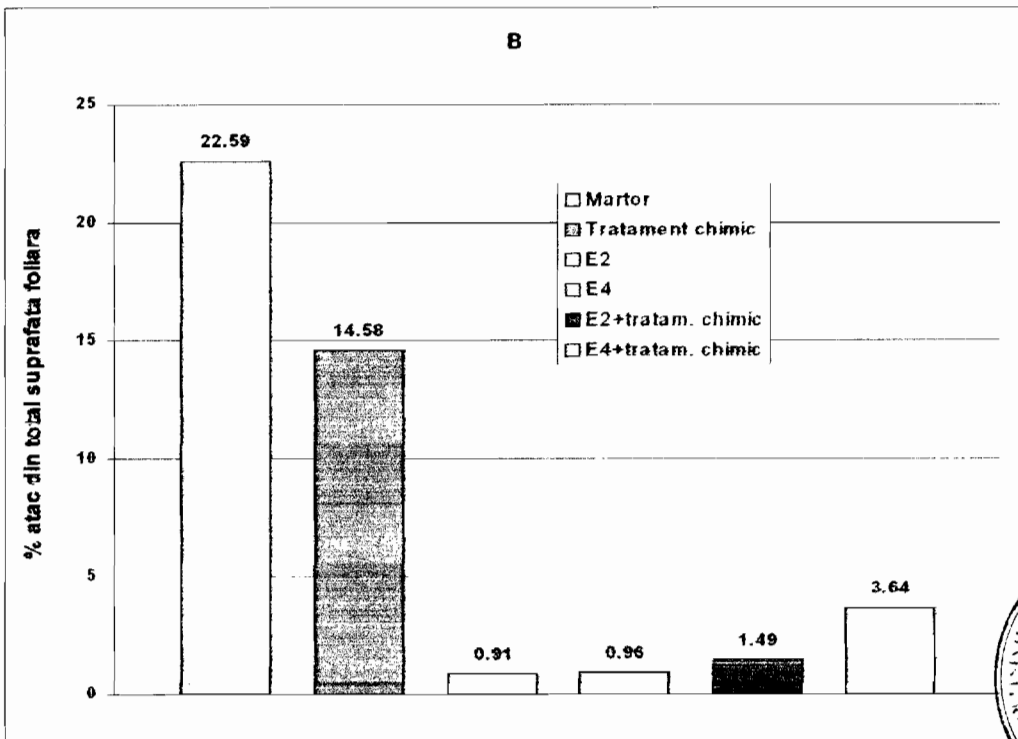
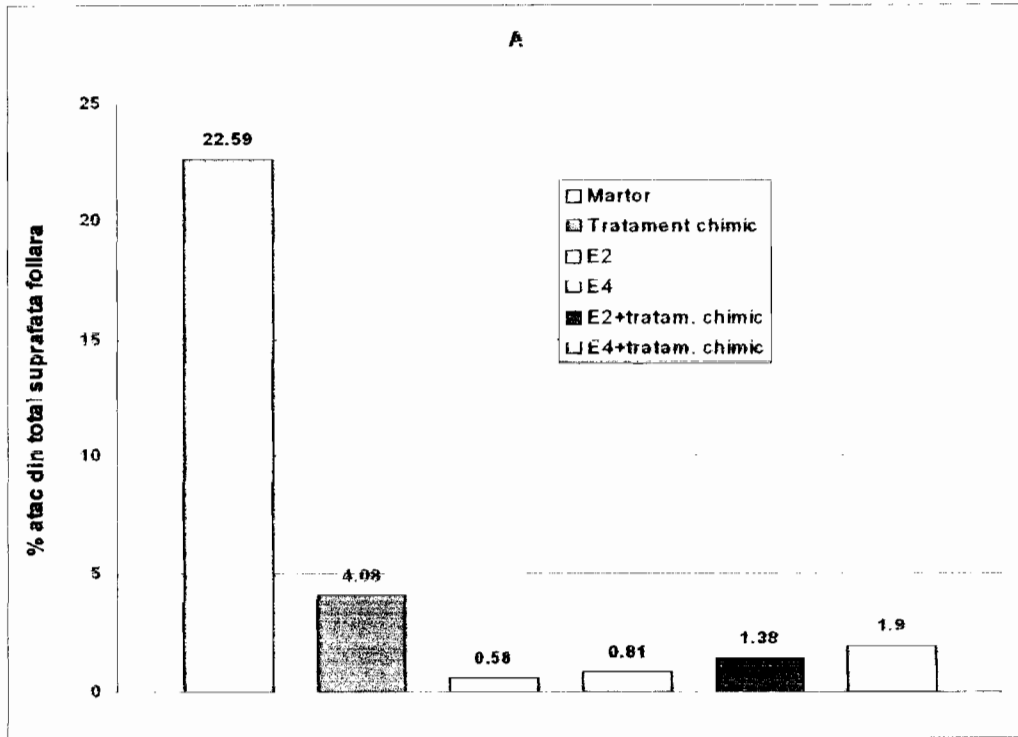


Figura 6

