



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

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

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

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **29.11.2012** BOPI nr. **11/2012**

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

(73) Titular:  
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU PEDOLOGIE, AGROCHIMIE ȘI PROTECȚIA MEDIULUI, BD. MĂRĂȘTI NR. 61, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **CENTRUL DE BIOCHIMIE APLICATĂ ȘI BIOTEHNOLOGIE-BIOTEHNOL-BUCUREȘTI, 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**

(56) Documente din stadiul tehnicii:  
**G. COGĂLNICEANU, M. MITOI, F. HELEPCIUC, M. MATEI, S. MATEI, "BIOCHEMICAL CHANGES INDUCED IN REGENERANTS OF FRAGARIA X ANANASSA DUCH. BY THE IN VITRO TREATMENT WITH FUNGAL ELICITORS", ROMANIAN BIOTECHNOLOGICAL LETTERS, VOL. 15, NR. 4, PP. 5512-5518, AUG. 2010; FR 2799935 A1; V. REPKA, "EARLY DEFENCE REPOSENSE INDUCED BY TWO DISCTINCT ELICITORS DERIVED FROM BOTRYTIS CINEREA", BIOLOGIA PLANTARUM, VOL. 50, NR. 1, PP. 94-106, 2006**

(54) **TULPINI DE *BOTRYTIS CINEREA* PRODUCĂTOARE DE ELICITORI FUNGICI, PRODUS PENTRU IMUNIZAREA PLANTELOR DE CĂPȘUN CONTRA AGENȚILOR PUTREGAIULUI CENUȘIU ȘI METODĂ DE APLICARE**



# RO 126736 B1

1           Invenția se referă la trei tulpini fitopatogene virulente de *Botrytis cinerea*, care se  
dezvoltă simultan în mediu lichid de creștere, la compoziția unui produs pentru imunizarea  
3 plantelor de căpșun, și la metoda de aplicare a acestuia în tratamentul preventiv al putre-  
gaiului cenușiu la căpșun.

5           Prezența căpșunelor ca 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  
7 infectate.

9           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  
11 aplicat fungicide chimice sistemice pentru a distruge infecțiile fungice ale plantelor de  
căpșun. Majoritatea substanțelor chimice folosite în combaterea bolilor la căpșun sunt  
13 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  
15 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  
17 alimentare destinate consumului uman, cu efecte în domeniul patologiei umane, dar și al  
poluării mediului.

19           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  
21 superioară celor nerezistente. În plus, agenții patogeni reprezintă tulpini distincte și, din  
această cauză, un soi de căpșun are un spectru de rezistență redus. Sensibilitatea la boli  
23 a plantelor de căpșun nu este sinonimă însă cu absența mecanismelor de rezistență din  
codul lor genetic.

25           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  
27 apărare al plantelor este comparabil cu răspunsul în cazul vaccinării la oameni, deoarece  
căile de semnalizare s-au conservat în timpul evoluției acestora.

29           Plantele au dezvoltat în timp procese sofisticate de activare a mecanismelor de  
inducere a imunității sistemice. Răspunsul de rezistență sistemică în plante poate fi împărțit  
31 în linii mari în rezistență sistemică dobândită și rezistență sistemică indusă. Deși sunt fiecare  
eficace împotriva unei game largi de agenți patogeni, răspunsurile lor sunt specifice pentru  
33 diferite clase de agenți patogeni. Fiecare cascadă de semnalizare este indusă și transmisă  
prin combinații ale diferitelor molecule de semnalizare.

35           Sistemul de apărare al plantei presupune o interacțiune complexă pentru  
recunoașterea anticipată a evenimentelor patologice generatoare de semnale care sunt  
37 recunoscute și transmise de la locul de inoculare intra- și intercelular către întreaga plantă.  
Aceste semnale declanșează o serie de reacții de apărare indusă, cu scopul de a bloca sau  
39 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  
41 domeniu. Spre exemplu, sunt documente în care creșterea rezistenței plantei s-a realizat pe  
baza procedurilor de manipulare genetică: **DE 4234131 (A1)**, **US 2002004944 (A1)**,  
43 **US 20030192075**, **DE 202006009259 (U1)**, **MX 200700090 (A)**, **US 20100011468** și  
**US 2010122374 (A1)**.

45           Rezistența sistemică a fost indusă la cereale (orz, porumb, ovăz, orez și grâu),  
cucurbitacee (castravete și pepene verde), leguminoase (fasole, mazăre și soia), solanacee  
47 (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  
49 pe frunze și rădăcină.

# RO 126736 B1

Rezistența la boli poate fi indusă în plantele de căpșun 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. 1  
3

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 mediată prin mecanisme multiple ce 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 acidul salicilic, a fitoalexinelor. Produsele de degradare a 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. 5  
7  
9  
11  
13

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 atât 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 plantă. Un alt mecanism al inducerii rezistenței sistemice în plante este considerat cel de formare a enzimelor hidrolitice (cum ar fi chitinazele,  $\beta$ -1,3-glucanazele, proteazele), a altor proteine legate de patogeneză, precum peroxidazele. Chitinazele plantei sunt raportate a fi inhibitori potențiali ai creșterii fungice și, în combinație cu  $\beta$ -1,3-glucanaza, atacă o serie de ciuperci. Prezența chitinazelor și a  $\beta$ -1,3-glucanazelor poate fi indusă coordonat într-un număr de țesuturi ale plantei de atacul agentului patogen, cât și de prezența moleculelor semnal. 15  
17  
19  
21  
23  
25

S-a cercetat proprietatea de acțiune asupra sistemelor naturale de apărare ale plantelor de către substanțele chimice anorganice reprezentate de mercur, cupru, ionii de aluminiu, acizii arahidonic, fosforic, salicilic, fulvici și humici, iar dintre cele organice, oligozaharidele de origine vegetală, reprezentate de oligoglucani, oligochitină, oligochitosan, oligogalacturonide, enzime de tipul celulei, polipeptide, glicoproteine și aminoacizi. Rezultatele sunt prezentate în lucrările autorilor: Boller et al. (1995; *Annu Rev 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 Mol Biol*), Coleman et al. (1992, *Physiol Mol Plant Pathol*), 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*). 27  
29  
31  
33  
35  
37  
39  
41

Cercetările informaționale privind efectele unor tipuri de molecule semnal (oligopeptide, acid ganoderic, oligozaharide, glicoproteine, lipide, melanine, acid manuronic, glucoză, galactoză, difenil eter de acid  $\beta$ -aminobutiric sau acid  $\beta$ -amino valerice, xantan,  $\beta$  oligo 1-3 glucani etc.) asupra plantelor, mediile speciale de creștere a fungilor, compușii rezultați în plantă în urma acțiunii moleculelor semnal, modul de aplicare a produselor sau tipul de patogeni asupra cărora se manifestă efectul sunt exemplificate în cadrul unor 43  
45  
47

# RO 126736 B1

1 documente precum: **US 5830919**, **US 5888501 (A)**, **US 6387847**, **US 2004033902 (A1)**,  
2 **US 2006148710 (A1)**, **US 20060178270**, **UA 29953 (U)**, **CN 101358179 (A)**, **CN 101353676 (A)**,  
3 **FR 2922412 (A1)** și **US 7682615**.

4 **US 6326016** prezintă un agent de inducere a rezistenței plantelor împotriva  
5 microorganismelor fitopatogene, prin utilizarea unui extract din biomasa fungică a unui  
6 microorganism nepatogen.

7 G. Cogălniceanu, M. Mitoi, F. Helepiciuc, M. Matei, S. Matei, în lucrarea *Biochemical*  
8 *changes induced in regenerants of Fragaria X Ananassa Duch. by the in vitro treatment with*  
9 *fungal elicitors*, *Romanian Biotechnological Letters*, vol. 15, nr. 4, pp. 5512-5518, august  
10 2010 - prezintă tratarea *in vitro* a unor plante de căpșun cu elicitori fungici obținuți:

11 a) din tulpina de *Botrytis cinerea* BcF1 (E1),  
12 b) dintr-un amestec de tulpini de *Botrytis cinerea* BcF1, BcF7, BcS1 și BcP2 (E2),  
13 c) dintr-un amestec de tulpini de *Trichoderma viride* și *Penicillium chrysogenum* (E3) sau  
14 d) dintr-un amestec de tulpini de *Botrytis cinerea*, *Trichoderma viride* și *Penicillium*  
15 *chrysogenum* BcF1, BcF7, BcS1, BcP2, TvP456, TvP1, ThP8, PcA2 (E4).

16 **FR 2799935 A1** descrie un procedeu de stimulare a reacției de apărare naturală a  
17 plantelor, de exemplu, împotriva *Botrytis*. Căpșunile nu sunt menționate în mod explicit.  
18 Acest procedeu cuprinde aplicarea la nivelul frunzelor, rădăcinii sau prin injectarea plantelor  
19 cu cel puțin o enzimă de tip celuloză,  $\beta$ -1,3-glucanază, xilanază, galactanază, manază,  
20 chitinază, sau cu o peptidă neenzimatică, ce se obțin pornind de la microorganisme fungice  
21 (de exemplu, *Trichoderma*, *Penicillium* sau *Aspergillus*) sau bacteriene.

22 V. Repka, *Early defence response induced by two distinct elicitors derived from*  
23 *Botrytis cinerea*, *Biologia Plantarum*, vol. 50, nr. 1, pp. 94-106, 2006 - dezvăluie o tulpină de  
24 *Botrytis cinerea* izolată din vie, din care sunt obținuți doi elicitori: cinereină și botrycină.

25 Prin această invenție se urmărește problema combaterii bolilor la plantele de căpșun  
26 cu produse nepoluante pentru mediu, cât și îmbogățirea arsenalului ecologic utilizat în creș-  
27 terea randamentului acestor culturi.

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

33 Moleculile semnal provin de la trei tulpini noi de *Botrytis cinerea*, extrem de virulente,  
34 nemodificate genetic, care, conform invenției, sunt:

35 Tulpina de *Botrytis cinerea*, BcS1, depozitată cu numărul P999 la Microbial Strain  
36 Collection of Latvia, University of Latvia, pe 13.09.2010, care prezintă colonii alb cenușii  
37 lănoase cu rari scleroți negri pe mediul Czapek, colonii cenușii cu numeroși scleroți negri pe  
38 mediul cu cartof, dextroză, agar, conidiofori bruni, septați, lungi, ramificați intercalar sau  
39 apical, conidii netede, neseptate, hialine spre galben brun obovoide cu hilul protuberant și  
40 capacitatea de a produce enzime cu rol elicitor de tip chitinaze,  $\beta$ -1,3-glucanaze, poli-fenol  
41 oxidaze, fenil-alanina-amoniu liaze și peroxidaze.

42 Tulpina de *Botrytis cinerea*, BcP2, depozitată cu numărul P1000 la Microbial Strain  
43 Collection of Latvia, University of Latvia, pe 13.09.2010, care prezintă colonii dense lănoase,  
44 cenușiu închis cu numeroși scleroți negri, conidiofori înalți, subțiri, bruni, septați, netezi, cu  
45 ramificații intercalare care poartă capete conidiale, conidii netede, neseptate, hialine spre  
46 brun deschis, ovoide sau subgloboase, hilul slab protuberant și capacitatea de a produce  
47 enzime cu rol elicitor de tip chitinaze,  $\beta$ -1,3-glucanaze, poli-fenol oxidaze, fenil-alanina-  
amoniu liaze și peroxidaze.

# RO 126736 B1

Tulpina de *Botrytis cinerea* BcF7, depozitată cu numărul P1001 la Microbial Strain Collection of Latvia, University of Latvia, pe 13.09.2010, care prezintă colonii hialine inițial, deschise la culoare în centru, lânoase și cu nuanțe brune spre margini, cu scleroți negri dezvoltați în număr moderat, conidiofori înalți, bruni, netezi, septați, ramificați neregulați, cu capete conidiale apicale și intercalare, conidii brune deschise, netede, neseptate, elipsoidale până la obovoide, cu hil protuberant și capacitatea de a produce enzime cu rol elicitor de tip chitinaze,  $\beta$ -1,3- glucanaze, poli-fenol oxidaze, fenil-alanina-amoniu liaze și peroxidaze.

Produsul pentru inducerea reacției de apărare a plantelor de căpșun împotriva fitopatogenului *Botrytis cinerea* este un ultrafiltrat format din exometaboliții cu rol elicitor din domeniul molecular 5000...2000 kDa, care sunt eliberați în mediul de creștere de către amestecul tulpinilor fungice de *Botrytis cinerea* BcS1, BcP2, BcF7, în prezența biomasei vegetale de căpșun, și conține: 1,06...22,67 mg/l proteine solubile totale, 1,98...19,39 mg/l glucide reducătoare totale, 0,01...0,4485  $\mu$ g/l flavonoide totale, 39,42...336,51 mg/l polifenoli totali, 0,637...0,513 U/ml pectin liază, 0,423...0,627 U/ml chitinază, 0,012...1,98 U/ml celuloză, 0,018-0,940 U/ml carboximetilceluloză, 1,109...7,092 U/ml  $\beta$ -1,3 glucanază, 456,19...467,79 mmol/100 ml conținut total aminoacizi, 28,81...38,54 nmoli/100 ml asparagină, 28,55...30,56 nmoli/100 ml glutamină, 40,92...61,28 nmoli/100 ml serină, 5,66...13,21 nmoli/100 ml histidină, 22,98...45,25 nmoli/100 ml glicină, 25,21...43,04 nmoli/100 ml treonină, 35,71...50,12 nmoli/100 ml alanină, 99,93...126,24 nmoli/100 ml arginină, 7,37...9,24 nmoli/100 ml tirozină, 38,06...38,78 nmoli/100 ml valină, 9,67...19,43 nmoli/100 ml metionină, 11,59...31,29 nmoli/100 ml fenilalanină, 14,43...19,44 nmoli/100 ml izoleucină, 21,00...29,03 nmoli/100 ml leucină, 0,99...17,45 nmoli/100 ml lizină.

Metoda de aplicare a produsului constă în aceea că se administrează preventiv pe plantă sau în sol, 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...60 ml/m<sup>2</sup>, prin pulverizare fină cu grad de dispersie de 60...80  $\mu$  pe plantă, sau în apa de irigație, iar după aplicarea tratamentului nu este necesară repetarea lui în cursul sezonului de vegetație.

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 prezența unor particularități genetice;
- tulpinile utilizate produc exometaboliți care intră în compoziția produsului și sunt compuși biotici, naturali, care nu prezintă efect inhibitor asupra microbiotei filosferice sau edafosferice, nu modifică biodiversitatea specifică de la aceste niveluri, sunt netoxici pentru plantă, nepoluantă 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;

# RO 126736 B1

- 1 - aplicarea produsului se face prin dispersie avansată, fapt ce permite acoperirea  
unor suprafețe mari, un consum eficient, pierderi reduse, inducerea reacției imune fiind  
3 posibilă atât în cazul administrării pe plantă, cât și în sol;
- 5 - produsul conține cantități foarte mici de compuși activi, dar care sunt suficiente  
pentru a sensibiliza membrana citoplasmatică;
- 7 - nu utilizează biomasa fungică și nici procedee tehnice de prelucrare a acesteia;
- 9 - efectul produsului asupra plantei este sistemic, se menține în timp, schimbarea  
gradului de umiditate în sol sau în atmosferă neinfluențând decât parțial reacția plantei sub  
acest aspect, ca urmare, nu este necesară repetarea aplicării lui după precipitații;
- 11 - aplicarea produsului nu influențează calitatea biologică a fructelor de căpșun, ci  
capacitatea de rezistență la infectare a fructelor depozitate, în absența aplicării de conservanți,  
deci asigură protecția pentru planta întregă, cu efecte care se extind post-recoltare;
- 13 - produsul prezintă compatibilitate ecologică cu alte produse care îndeplinesc  
cerințele de obținere a etichetei de utilizare în agricultura ecologică;
- 15 - 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  
17 chimice;
- 19 - 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;
- 21 - aplicarea lui poate fi asociată cu strategiile clasice (fungicide) pentru a oferi o mai  
bună acoperire protectivă;
- 23 - asigură compatibilitatea cu aplicațiile de reintrare în circuit din agricultura durabilă.  
Prezentarea pe scurt a figurilor:
- 25 - fig. 1 - tulpina BcS1 de *Botrytis cinerea* în cultură;
- 27 - fig. 2 - tulpina BcP2 de *Botrytis cinerea* în cultură;
- 29 - fig. 3 - tulpina BcF7 de *Botrytis cinerea* în cultură;
- 31 - fig. 4 - procentul de atac din totalul suprafeței foliare la soiul Elsanta în experiența  
de evaluare a efectului aplicării pe plantă a filtratului E2;
- 33 - fig. 5 - nivelul activității enzimelor POX și PAL în plantele de căpșun cultivate în  
seră, pentru evidențierea efectului produsului pe bază de elicitori fungici. Variante  
experimentale: M1 - martor căpșun Marmolada; P1 - tratament pe plantă; P2 - tratament la  
35 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;  
37 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  
39 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  
41 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;
- 43 - fig. 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  
45 E2, simplu și în combinație cu fungicide.
- Prezenta invenție se ilustrează prin următoarele exemple:
- 47 **Exemplul 1.** Plantele nemodificate genetic reacționează la atacul patogenilor în  
funcție de tipul și intensitatea "semnalelor" pe care aceștia le emit.

# RO 126736 B1

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.	1 3
Tulpinile selectate provin din medii diferite (sol agricol aflat sub cultură de căpșun, fructe, plante de <i>Eustoma grandiflorum</i> ), asigurându-se și unele particularități genetice. Selecția tulpinilor nemodificate genetic aduce avantajul unei relative stabilități genetice în timp, în condițiile utilizării lor.	5 7
Calitățile tulpinilor selecționate influențează caracteristicile finale ale produsului prin influența indusă în timpul creșterii în cultură.	9
Tulpinile fungice selecționate de <i>Botrytis cinerea</i> sunt: BcS1, BcP2, BcF7.	
<i>Botrytis cinerea</i> , tulpina BcS1, a fost izolată din sol agricol aflat sub cultură de căpșun, de la Băiculești, județul Argeș. Încadrarea taxonomică a tulpinii de <i>Botrytis cinerea</i> este <i>Filum Ascomycota</i> , subfilum <i>Pezizomycotina</i> , clasa <i>Leotiomycetes</i> , ordinul <i>Helotiales</i> , familia <i>Sclerotiniaceae</i> , genul <i>Botryotinia</i> , specia <i>Botrytis cinerea</i> sau <i>Botryotinia cinerea</i> (De Bary) Whetzel (fig. 1, tulpina BcS1 de <i>Botrytis cinerea</i> ).	11 13 15
Descriere:	
Tulpina BcS1 este depozitată cu numărul P999 la Microbial Strain Collection of Latvia, University of Latvia, pe 13.09.2010.	17
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.	19
Prezintă conidiofori bruni, netezi lungi septați, cu grosimi de 10,91...14,31 μm, ramificați intercalar sau cel mai adesea apical.	21
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.	23 25
Scleroții negri au diametrul de 2...5 μm și formă variabilă.	
Originea izolatului este un sol agricol din județul Argeș, România.	27
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-amonioliaze (0,317...0,811 U/ml) și peroxidaze (0,129...0,398 U/ml).	29
<i>Denumirea taxonomică:</i>	31
<i>Botrytis cinerea</i> Pers. ex Fr, stadiul conidial al <i>Botryotinia fuckeliana</i> (de Bary) Whetzel SYN. <i>Sclerotinia fuckeliana</i> (de Bary) Fuckel	33
<i>Mediu:</i>	
Cultivarea pe PDA (cartofi-dextroză-agar), Merk, ord. no. 10130.0500, 39 g/l mediu de cultură, pH 5,6 ± 0,2, autoclavat 15 min la 121°C.	35
<i>Condițiile de depozitare:</i>	37
Culturi pure în eprubete cu mediul PDA înclinat, la 2...5°C.	
<i>Condiții de testare a viabilității:</i>	39
Incubare pe mediul de cultură PDA, pH 5,6 ± 0,2 la 22...25°C.	
<i>Botrytis cinerea</i> , tulpina BcP2, a fost izolată de pe plante de <i>Eustoma grandiflorum</i> . Încadrarea taxonomică a tulpinii de <i>Botrytis cinerea</i> este <i>Filum Ascomycota</i> , subfilum <i>Pezizomycotina</i> , clasa <i>Leotiomycetes</i> , ordinul <i>Helotiales</i> , familia <i>Sclerotiniaceae</i> , genul <i>Botryotinia</i> , specia <i>Botrytis cinerea</i> sau <i>Botryotinia cinerea</i> (De Bary) Whetzel (fig. 2, Tulpina BcP2 de <i>Botrytis cinerea</i> ).	41 43 45
Descriere:	
Tulpina BcP2 este depozitată cu numărul P1000 la Microbial Strain Collection of Latvia, University of Latvia, pe 13.09.2010.	47

# RO 126736 B1

1 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  
3 1,180 mm/h.

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

Conidiile neseptate, netede, hialine până la brune deschis, ovale sau subgloboase,  
7 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.

9 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),  
11 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 U/ml) și peroxidaze (0,386...0,906 U/ml).

13 *Denumirea taxonomică:*

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

*Mediu:*

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

19 *Condițiile de depozitare:*

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

21 *Condiții de testare a viabilității:*

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

23 *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*  
25 este *Filum Ascomycota*, subfilum *Pezizomycotina*, clasa *Leotiomycetes*, ordinul *Helotiales*,  
familia *Sclerotiniaceae*, genul *Botryotinia*, specia *Botrytis cinerea* sau *Botryotinia Cinerea* (De  
27 Bary) Whetzel (fig. 3, Tulpina BcF7 de *Botrytis cinerea*).

*Descriere:*

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

31 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.  
33 Scleroții închiși la culoare se dezvoltă într-un număr moderat. Rata de creștere pe PDA este  
de 0,885 mm/h.

35 Conidioforii sunt înalți, brunii, septați, cu pereți netezi, neregulat ramificați, care poartă  
capete conidiale intercalate și apicale.

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

39 Scleroții negri variază ca formă și au diametre de 2...7 mm.

Originea izolatului este pe fructe de căpșun bolnave din România.

41 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-  
43 amoniu liaze (0,236...0,413 U/ml) și peroxidaze (0,334...0,391 U/ml).

*Denumirea taxonomică:*

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

*Mediu:*

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



# RO 126736 B1

<i>Condițiile de depozitare:</i>	1
Culturi pure în eprubete cu mediul PDA înclinat, la 2...5°C.	
<i>Condiții de testare a viabilității:</i>	3
Incubare pe mediul de cultură PDA, pH 5,6 ± 0,2, la 22...25°C.	
Prezența invenției 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 <i>Botrytis cinerea</i> în laborator, pentru obținerea de preinocul, urmată de pregătirea mediului lichid de creștere.	5
	7
	9
Pentru realizarea preinoculului, în laborator se pregătesc tulpinile fungice de colecție BcS1, BcF7 și BcP2 de <i>Botrytis cinerea</i> , care sunt cultivate pe mediul solid PDA (cartofi-dextroză-agar), Merk, ord. no. 10130.0500, 39 g/l mediu de cultură, pH 5,6 ± 0,2, autoclavat 15 min la 121°C, repartizat în eprubete cu mediu înclinat.	11
	13
Pentru creștere, tulpinile sunt incubate la termostat la 27°C timp de 30 de 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 10 <sup>7</sup> ...10 <sup>9</sup> 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.	15
	17
	19
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.	21
	23
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 atât competiția intertulpinală, cât și mecanismele biochimice interne ale tulpinilor implicate în atacul 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 <i>Botrytis cinerea</i> , am optat pentru cultura lor pe mediu lichid, biomasa fungică dezvoltându-se atât la suprafață, cât și în profunzimea lui.	25
	27
	29
	31
Pentru prepararea mediului lichid a fost preferată apa deionizată. Mediul realizat este utilizat pentru efectul combinat asupra creșterii și a metabolismului tulpinilor fungice de <i>Botrytis</i> . 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.	33
	35
<i>Preparare:</i> 9 kg cartofi spălați, decojiți și tăiați în cuburi de 12 mm. Se cântăresc cuburile de cartof și se fierb în apă deionizată, în vase de sticlă (metal smălțuit, inox) timp de 30 min. Se strecoară prin tifon. Se adaugă zaharoza 20 g/l și se amestecă până la dizolvare. Se adaugă biomasă vegetală 3 g/l. Biomasă 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 18 l cu apă 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.	37
	39
	41
	43
	45
După realizarea mediului s-a efectuat imediat ajustarea pH-ului la 5,6±0,2 cu soluții molare de HCl și NaOH.	47
Nu a fost realizată clarificarea mediului lichid datorită efectului nefavorabil asupra tulpinilor fungice ale fitopatogenului.	49

# RO 126736 B1

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

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

Mediul lichid inoculat cu cele 3 tulpini fungice selectate pentru producerea de elictori  
7 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 h,  
9 pentru o durată de 5...7 min.

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

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

Pentru a verifica eficiența purificării fungilor izolați, utilizați la inocularea mediului de  
15 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  
17 utilizat procedee succesive de filtrare a mediului lichid de creștere, până la separări  
fracționale și selectarea intervalului în care greutatea moleculară ale amestecului de compuși  
19 prezintă activitate elicitoare și induc reacția de apărare a plantei.

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

Fracțiile moleculare în care compușii cu efect elictor sunt prezenți și activi s-au  
25 obținut prin trecerea succesivă a mediului de creștere fungică prin procedee de filtrare,  
microfiltrare și ultrafiltrare tangențială, obținându-se filtratul E2 (E2). În afară de filtratul E2  
27 provenit de la tulpinile Bc S1, Bc P2 și BcF7 de *Botrytis cinerea*, s-au obținut, prin același  
procedeu, filtratele E1 - provenit de la o singură tulpină de *Botrytis cinerea*, E3 - provenit de  
29 la tulpini de fungi antagoniști, și E4 - provenit de la tulpini de *Botrytis cinerea*, și fungi  
antagoniști, pentru compararea efectului elictor al compozițiilor rezultate.

Filtrarea și microfiltrarea s-au realizat printr-o baterie succesivă de cartușe filtrante,  
33 care au acoperit o arie moleculară de separare a compușilor fără efect elictor din mediul de  
cultură lichid, din domeniul  $10...10^3 \mu$  până la  $1...10 \mu$ , respectiv, pentru particule grosiere  
35 și fine din mediul de cultură fungică.

Procedeele de ultrafiltrare aplicat a permis separarea compușilor moleculari din  
37 domeniul  $10^{-3}...10^{-1} \mu$  sau  $10...10^4 \text{ \AA}$ , responsabili de stabilirea caracterului elictor. Dome-  
niului molecular căruia îi aparțin compușii din mediul lichid de creștere fungică, ce manifestă  
39 efect elictor asupra plantelor de căpșun, este cuprins între 5000 Da și 2000 kDa. Pentru  
ultrafiltrarea mediului lichid de creștere s-a utilizat un sistem SEPA CF II OSMONICS, INC.  
41 ca unitate de filtrare tangențială, cu membrane de polietersulfon ce permit reținerea  
compușilor cu greutatea moleculară de peste 5000 Da și sub 2000 kDa, cu o suprafață de  
43  $140 \times 190 \text{ mm}$ , capacitate de 70 ml/min, presiunea maximă de 69 bar (1000 psi).

Filtratul colectat s-a depozitat la 4°C în vase de plastic închise etanș, sau la o  
45 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  
47 poată altera structura și rolul lor elictor.

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

# RO 126736 B1

Compoziția filtratului reprezintă de fapt compoziția produsul final (filtratul E2) utilizat în inducerea rezistenței sistemice a plantelor de căpșun față de agentul fitopatogen <i>Botrytis cinerea</i> .	1 3
Modificări în procedura de obținere prin filtrare pot duce la modificări severe ale activității moleculelor elicitoare și/sau posibile reacții adverse fitotoxice.	5
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: 1,06...22,67 mg/l proteine solubile totale, 1,98...19,39 mg/l glucide reducătoare totale, 0,01...0,4485 μg/l flavonoide totale, 39,42...336,51 mg/l polifenoli totali, 0,637...0,513 U/ml pectin liază, 0,423...0,627 U/ml chitinază, 0,012...1,98 U/ml celulază, 0,018...0,940 U/ml carboximetilcelulază, 1,109...7,092 U/ml β-1,3 glucanază, 456,19...467,79 mmol/100 ml conținut total aminoacizi, 28,81...38,54 nmoli/100 ml asparagină, 28,55...30,56 nmoli/100 ml glutamină, 40,92...61,28 nmoli/100 ml serină, 5,66...13,21 nmoli/100 ml histidină, 22,98...45,25 nmoli/100 ml glicină, 25,21...43,04 nmoli/100 ml treonină, 35,71...50,12 nmoli/100 ml alanină, 99,93...126,24 nmoli/100 ml arginină, 7,37...9,24 nmoli/100 ml tirozină, 38,06...38,78 nmoli/100 ml valină, 9,67...19,43 nmoli/100 ml metionină, 11,59...31,29 nmoli/100 ml fenilalanină, 14,43...19,44 nmoli/100 ml izoleucină, 21,00...29,03 nmoli/100 ml leucină, 0,99...17,45 nmoli/100 ml lizină.	7 9 11 13 15 17 19 21
Produsul a fost condiționat prin tratare cu CaCO <sub>3</sub> în proporție de 1%.	
Prezenta invenție se referă, de asemenea, la metodele de aplicare a produsului pentru imunizarea plantelor.	23
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 μ a 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...60 ml/m <sup>2</sup> suprafață de cultură, urmată de aplicarea diluată cu apă a produsului în raportul filtrat:apă 1:2, respectiv, la 50% din concentrația inițială a produsului, pentru tratamentele din zilele 6 și 8 de la începerea tratamentului.	25 27 29 31
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.	33 35
Nu este necesară repetarea tratamentului dacă ulterior apar fenomene meteorologice nefavorabile.	37
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 tiofanat.	39
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 50 WP - 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.	41 43 45
Concentrația în glucide la care filtratul este aplicat pentru a induce rezistență la plante este de 0,02 g/l echivalenți de glucoză. Produsul obținut poate să fie ambalat și transportat sub formă lichidă, în containere cu volume diferite, de către utilizatorul final.	47 49

# RO 126736 B1

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

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

7            Nu se aplică produsul în diluții mai mari decât cele prevăzute în metoda de utilizare.  
8 Nu se concentrează produsul prin tratamente termice.

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

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

13            **Exemplu 2. Evoluția stării fitosanitare a culturilor de căpșun la tratamentul cu**  
14 **produsul fungic cu efect elictor, în condiții controlate**

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

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

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

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

39            Monitorizarea stării fitosanitare a plantelor tratate cu filtratele E1, E2, E3 și E4 care  
40 ulterior au fost infectate experimental cu *Botrytis* a arătat faptul că, în privința numărului de  
41 frunze afectate la soiul Elsanta, se remarcă variantele tratate cu produsul E2 la plantă și sol,  
42 cu cel mai mic procent de frunze afectate, de 3,45%, respectiv, 4%. La soiul Marmolada,  
43 variantele tratate cu E1 și E3 au prezentat cei mai mic procent de frunze afectate (tratament  
44 la plantă), iar la tratamentul la sol se remarcă varianta tratată cu E2. La soiul Elsanta, după  
45 48 h de la inocularea cu patogen, la varianta martor s-au remarcat pete, procentul de atac  
46 fiind de 0,57% din totalul suprafeței foliare, iar după 7 zile valoarea fiind de 25,75%. Cei mai  
47 mic procent de atac s-a remarcat la varianta tratată cu E2 la plantă, de 0,23% (fig. 4). Analiza  
48 varianței pentru dimensiunea petelor după 7 zile de la aplicarea inoculului la soiul Elsanta

# RO 126736 B1

(tabelul 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.

Tabelul 1

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

Varianta experimentală soiul Elsanta	Tratament pe plantă				Tratament la sol			
	Valori relative	Dif.		Semnif.	Valori relative	Dif.		Semnif.
	cm <sup>2</sup>	cm <sup>2</sup>	%		cm <sup>2</sup>	cm <sup>2</sup>	%	
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 DL1% = 70,470 DL0,1% = 101,910					DL5% = 51,140 DL1% = 72,790 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 tulpină de *Botrytis cinerea*, (E2) *Botrytis cinerea* tulpinile - BcS1, BcP2, BcF7, (E3) cu tulpini antagoniste și (E4) cu tulpini de *Botrytis* și de antagoniști.

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

Dozarea activității peroxidazelor (POX) s-a realizat prin extracția enzimatică în tampon Tris-HCl 20 mM, pH = 8, conținând: 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM Mg Cl<sub>2</sub>, 0,1 mM Na<sub>2</sub> EDTA, 10 mM β-mercaptoetanol, 10% sucroză, 0,1% Triton X-100, la 4°C, timp de 4 h. Omogenatul a fost supus apoi centrifugării timp de 10 min la 12000 rot/min. Supernatantul obținut a fost supus dozării enzimatică. Activitatea enzimatică a peroxidazelor s-a determinat prin incubarea enzimei în prezența H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% și gaiacol 30 mM. S-a înregistrat spectrofotometric modificarea

# RO 126736 B1

1 DO<sub>290nm</sub> la intervale de 1 min, timp de 5 min. O unitate de activitate enzimatică reprezintă  
2 modificarea densității optice cu 0,1 unități/min. Activitatea peroxidazică a fost exprimată în  
3 unități/ml enzimă.

4 Dozarea activității L-fenilalanin-amonium-liazei (PAL) s-a realizat prin extracția  
5 enzimatică în 5 ml tampon borat de sodiu 0,1 M (pH = 7,0) ce conține 0,1 g polivinilpirolidonă  
6 (PVP). Omogenatul a fost centrifugat la 10000 rpm timp de 35 min la 4°C, iar supernatantul  
7 obținut a fost supus dozării. Amestecul de reacție a fost compus din 0,4 ml extract enzimatic,  
8 0,5 ml tampon borat 0,1 M (pH = 8,8) și 0,5 ml de L-fenilalanină 12 mM. Amestecul de reacție  
9 a fost incubat apoi pe baia de apă la 30°C, timp de 30 min. Ca punct de referință, s-a realizat  
10 un amestec ce a constat din 0,4 ml extract enzimatic și 1 ml tampon borat. Activitatea PAL  
11 a fost determinată spectrofotometric prin înregistrarea ratei de conversie a L-fenilalaninei la  
12 acid trans-cianaminic, la DO<sub>290nm</sub>. Coeficientul de extincție utilizat pentru calcularea cantității  
13 de acid trans-cianaminic formată a fost de 9630 M<sup>-1</sup> (Dickerson și colab., 1984). Activitatea  
14 enzimatică a fost exprimată în unități/ml enzimă.

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

22 La plantele de căpșun din soiurile Marmolada și Elsanta tratate pe plantă sau la sol  
23 cu câte 4 tipuri de extracte fungice diferite, analizele comparative ale rezultatelor obținute au  
24 relevat faptul că există diferențe semnificative în ceea ce privește inducerea activității POX,  
25 diferențe apărute atât ca urmare a modului de aplicare a tratamentelor (plantă/sol), cât și  
26 datorită tipului de filtrat utilizat și a genotipului testat. Valori crescute ale activității POX  
27 induse de tratamentul cu E2 au fost înregistrate la ambele soiuri testate, comparativ cu  
28 martorii și cu tratamentele chimice cu fungicide, iar în privința modului de administrare, după  
29 aplicarea filtratului fungic E2 pe plantă comparativ cu administrarea în sol. Activitatea  
30 L-fenilalanin-amonium-liazei (PAL) evaluată la căpșun a înregistrat valori crescute la ambele  
31 soiuri testate, după tratamentul pe plantă cu filtratul E2 de *Botrytis cinerea* la tulpinile Bc S1,  
32 Bc P2, Bc F7 și cu filtratul E3 aplicat la sol (fig. 5).

33 **Exemplul 4.** *Influența aplicării produsului fungic asupra microflorei filosferice și*  
34 *rizosferice a plantelor de căpșun cultivate în condiții controlate*

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

40 Pentru studierea influenței filtratului E2 aplicat pe frunze și în sol asupra cenozelor  
41 fungice din filosferă, comparativ cu filtratele E1, E3 și E4, cu tratamentele chimice cu  
42 fungicide, și cu martorul din experiențele organizate în seră, de la plantele de căpșun, soiuri-  
43 rile Marmolada și Elsanta, s-au recoltat câte 3 frunze/vas/repetiție, în total 9 frunze/variantă  
44 experimentală. S-au decupat pătrate cu latura de 1 cm din zona mijlocie a părții drepte a  
45 foliolelor, care au fost agitate timp de 30 min în eprubete cu ser fiziologic steril, din care au  
46 fost efectuate însămânțări pe mediul PDA, în plăci Petri de 10 cm diametru. După incubare  
47 la 25°C, timp de 5...7 zile, acestea au fost examinate pentru determinarea densității fungilor  
48 exprimată în ufc/cm<sup>2</sup> de suprafață foliară, și stabilirea apartenenței taxonomice a coloniilor  
49 dezvoltate.

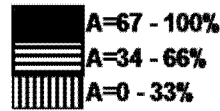
# RO 126736 B1

S-a calculat abundența relativă (A%) pentru fiecare taxon fungic, și s-au încadrat genurile identificate în 3 clase de abundență.	1
După administrarea filtratelor și, respectiv, a fungicidelor, la 14 zile de la tratamente, s-a realizat infectarea experimentală a plantelor de căpșun cu inocul de <i>Botrytis cinerea</i> .	3
Probele de sol prelevate la încheierea ciclului experimental în seră au fost analizate prin metoda însămânțării granulelor de 5 mm diametru pe mediul suport apă-agar cu streptomycină și incubare timp de 5 zile. Plăcile Petri (3/variantă experimentală) au fost examinate prin microscopie optică, pentru identificarea taxonilor dezvoltati 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.	5 7 9 11
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 puțini antagoniști naturali, ceea ce îl recomandă pentru aplicarea de produse cu rol elicitor.	13
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 păstrării unei diversități mai mari la E2 și E4. Se evidențiază menținerea slabă a răspunsului la E3 aplicat în sol.	15 17
Datele obținute ilustrează comparativ compoziția cenozelor fungice din filosfera plantelor de căpșun - soiul semirezistent Marmolada, din experiențele organizate în seră, repartizarea taxonilor în 3 clase, după abundența relativă (ponderea în comunitate), precum și densitatea fungilor raportată la unitatea de suprafață foliară (tabelul 2).	19 21
Tratamentele chimice cu fungicide de contact administrate prin pulverizare au distrus total microflora filosferică, la această variantă nefiind izolat niciun taxon.	23
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 <i>Botrytis cinerea</i> (tabelul 3).	25
Dacă, la aplicarea filtratelor, situația era relativ similară cu cea a martorului în privința numărului de specii care alcătuiau cenoză filosferică, după inocularea cu <i>Botrytis cinerea</i> s-a înregistrat un răspuns heterogen al fungilor la prezența patogenului, numărul de genuri care alcătuiesc cenoză filosferică variând între 1 și 6.	27 29
Genul <i>Botrytis</i> s-a dezvoltat cu o pondere de 50% la martor, ca urmare a inițierii de infecții provocate de germinarea propagulelor din inocul, unde este codominant alături de <i>Aspergillus</i> . 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 martor a fost de 900 ufc/cm <sup>2</sup> suprafață foliară, superioară tuturor celorlalte tratamente.	31 33 35
Spre deosebire de martor, variantele tratate cu filtrate cu rol elicitor și fungicide nu conțin genul <i>Botrytis</i> . Acesta apare cu statut accesoriu în solul martor de la soiul de căpșun Marmolada, și accidental la tratamentele cu fungicide și la administrarea în sol a filtratului E1, prezența sa datorându-se fie 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 (tabelul 4), acesta apare doar la martor cu statut de taxon accidental, fiind oprit, de asemenea, în dezvoltare de toate tratamentele aplicate (chimice și cele cu filtrate fungice).	37 39 41 43
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 cenozelor fungice la variantele experimentale tratate cu produsul fungic E2 cu rol imunostimulant.	45 47

Tabelul 2

*Microflora filofosferică la experiența în seră cu căpșun - soiul Marmolada*

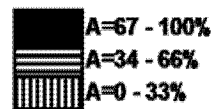
Nr.	Taxoni identificați	Varianta experimentală										
		Martor	Tratament chimic		Extract 1		Extract 2		Extract 3		Extract 4	
			contact	sistemic	planta	sol	planta	sol	planta	sol	planta	sol
1	<i>Cladosporium</i>											
2	<i>Rhizopus</i>											
3	<i>Myrothecium</i>											
4	<i>Trichoderma</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>											
<b>Nr. ufc/cm<sup>2</sup> suprafața foliară</b>		<b>90</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>270</b>	<b>120</b>	<b>150</b>	<b>90</b>	<b>150</b>	<b>450</b>	<b>150</b>	<b>180</b>



Tabelul 3

*Microflora filofosferică la experiența în seră cu căpșun - soiul Elsanta*

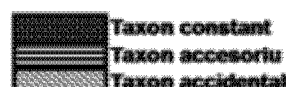
Nr.	Taxoni identificați	Varianta experimentală										
		Martor	Tratament chimic		Extract 1		Extract 2		Extract 3		Extract 4	
			contact	sistemic	planta	sol	planta	sol	planta	sol	planta	sol
1	<i>Aspergillus</i>											
2	<i>Epicoccum</i>											
3	<i>Fusarium</i>											
4	<i>Aureobasidium</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>											
<b>Nr. ufc/cm<sup>2</sup> suprafața foliară</b>		<b>90</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>120</b>	<b>60</b>	<b>90</b>	<b>140</b>	<b>60</b>	<b>60</b>	<b>30</b>	<b>120</b>





## Microflora edafosferică la experiența în seră cu căpșun - soiul Elsanta

Nr.	Taxoni identificați	Varianta experimentală										
		Martor	Tratament chimic		Extract 1		Extract 2		Extract 3		Extract 4	
			contact	sistemic	planta	sol	planta	sol	planta	sol	planta	sol
1	<i>Hemicola</i>											
2	<i>Nematoctonus</i>											
3	<i>Botrytis</i>											
4	<i>Cunninghamella</i>											
5	<i>Acremonium</i>											
6	<i>Fusarium</i>											
7	<i>Candida</i>											
8	Miceli sterile											
9	<i>Myrothecium</i>											
10	<i>Mortierella</i>											
11	<i>Actinomicete</i>											
12	<i>Helminthosporium</i>											
13	<i>Rhizoctonia</i>											
14	<i>Amblyosporium</i>											
15	<i>Papulaspora</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

**Exemplul 5. Efectul produsului fungic asupra plantelor de căpșun din soiul Senga Sengana în câmpul experimental**

S-a folosit soiul de căpșun Senga Sengana, sensibil la *Botrytis*, cultivat în câmp. Perioada de desfășurare a experienței a fost mai-iulie 2010. Variantele experimentale au cuprins 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 plantă, b2 - aplicare în sol. Pentru tratamentul chimic s-au utilizat fungicide de contact și sistemice (Captan 50 WP - 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...80 μ, 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 (tabelul 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, precum și cele cu

# RO 126736 B1

1 tratament chimic pe plantă au prezentat pete de atac pe frunze în număr foarte redus.  
 3 Frunzele au fost afectate înainte de tratament, iar procesul de extindere a petelor de necroză  
 5 a fost semnificativ redus după tratament, la variantele tratate chimic la plantă și la cele tratate  
 7 cu E2 și E4 la plantă și la sol. Procentul de frunze afectate a fost mai mare la plantele la care  
 9 am efectuat tratamentul la sol, comparativ cu variantele la care am aplicat tratamentul pe  
 11 partea vegetativă. S-a remarcat faptul că varianta martor a prezentat cel mai mare procent  
 13 de frunze afectate, iar extinderea petelor a fost foarte rapidă, comparativ cu variantele tratate  
 15 chimic sau cu E2 și E4, atât la plante, cât și la sol.

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

Tabelul 5

Analiza varianței pentru procentul de frunze afectate - soiul Seaga Sengana

Varianta experimentală soiul <i>Senga</i> <i>Sengana</i>	Tratament pe plantă				Tratament pe 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	Mt	
V2 tratam. chimic	4,05	-18,30	18,12	000	14,59	-7,76	65,28	000	
V3 tratament E2	0,53	-21,82	2,37	000	0,94	-21,41	4,21	000	
V4 tratament E4	0,86	-21,49	3,85	000	0,97	-21,38	4,34	000	
V5 E2+trat.chimic	1,02	-21,33	4,56	000	1,64	-20,71	7,34	000	
V6 E4+trat.chimic	1,56	-20,79	6,98	000	3,8	-18,55	17,00	000	
Media	5,06	-17,29	22,65	000	7,38	-14,97	33,03	000	
DL5% = 2,290 DL1% = 3,00 DL 0,1% = 6,130				DL5% = 1,990 DL 1% = 3,120 DL 0,1% = 5,310					
Semnif. exp. ***				Semnif. exp. ***					

*Analiza varianței pentru procentul de fructe afectate - soiul Senga Sengana* 3

Varianta experimentală soiul <i>Senga</i> <i>Sengana</i>	Tratament pe plantă				Tratament pe sol			
	Valori relative	Dif.	%	Semnif.	Valori relative	Dif.	%	Semnif.
	buc.	buc.			buc.	buc.		
V1 martor	27,66	0	100,00	Mt	27,66	0	100,00	Mt
V2 tratament chimic	11,45	-16,21	41,40	OOO	8,85	-18,81	32,00	OOO
V3 tratament E2	4,11	-23,55	14,86	OOO	5,60	-22,96	20,25	OOO
V4 tratament E4	3,02	-24,65	10,90	OOO	3,25	-24,41	11,75	OOO
V5 E2+tratament chimic	3,33	-24,33	12,04	OOO	5,87	-21,79	21,22	OOO
V6 E4+tratament 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
DL 5% = 1,480 DL 1% = 2,330 DL 0,1% = 3,970				DL5% = 1,480 DL1% = 2,320 DL 0,1% = 3,960				
Semnif. exp. ***				Semnif. exp. ***				

# RO 126736 B1

## Revendicări

1  
3  
5  
7  
9  
11  
13  
15  
17  
19  
21  
23  
25  
27  
29  
31  
33  
35  
37  
39  
41  
43  
45

1. Tulpină de *Botrytis cinerea* BcS1, depozitată cu numărul P999 la Microbial Strain Collection of Latvia, University of Latvia, pe 13.09.2010, care prezintă colonii alb cenușii lănoase, cu rari scleroți negri pe mediul Czapek, colonii cenușii cu numeroși scleroți negri pe mediul cu cartof, dextroză, agar, conidiofori brun, septați, lungi, ramificați intercalar sau apical, conidii netede, neseptate, hialine spre galben brun, obovoide cu hilul protuberant și capacitatea de a produce enzime cu rol elicitor de tip chitinaze,  $\beta$ -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, care 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 elicitor de tip chitinaze,  $\beta$ -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, care 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 brun deschis, netede, neseptate, elipsoidale până la obovoide, cu hil protuberant și capacitatea de a produce enzime cu rol elicitor de tip chitinaze,  $\beta$ -1,3-glucanaze, poli-fenol oxidaze, fenil-alanina-amoniu liaze și peroxidaze.

4. Produs pentru imunizarea plantelor de căpșun împotriva fitopatogenului *Botrytis cinerea*, caracterizat prin aceea că este un ultrafiltrat format din exometaboliți cu rol elicitor din domeniul molecular 5000...2000 kDa, 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: 1,06...22,67 mg/l proteine solubile totale, 1,98...19,39 mg/l glucide reducătoare totale, 0,01...0,4485  $\mu$ g/l flavonoide totale, 39,42...336,51 mg/l polifenoli totali, 0,637...0,513 U/ml pectin liază, 0,423...0,627 U/ml chitinază, 0,012...1,98 U/ml celulază, 0,018...0,940 U/ml carboximetilcelulază, 1,109...7,092 U/ml  $\beta$ -1,3 glucanază, 456,19...467,79 mmol/100 ml conținut total aminoacizi, 28,81...38,54 nmoli/100 ml asparagină, 28,55...30,56 nmoli/100 ml glutamină, 40,92...6 1,28 nmoli/100 ml serină, 5,66...13,21 nmoli/100ml histidină, 22,98...45,25 nmoli/100 ml glicină, 25,21...43,04 nmoli/100 ml treonină, 35,71...50,12 nmoli/100 ml alanină, 99,93...126,24 nmoli/100 ml arginină, 7,37...9,24 nmoli/100 ml tirozină, 38,06...38,78 nmoli/100ml valină, 9,67...19,43 nmoli/100 ml metionină, 11,59...31,29 nmoli/100 ml fenilalanină, 14,43...19,44 nmoli/100 ml izoleucină, 21,00...29,03 nmoli/100 ml leucină, 0,99...17,45 nmoli/100 ml lizină.

5. Metodă de aplicare a produsului definit la revendicarea 4, în care 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...60 ml/m<sup>2</sup>, prin pulverizare fină cu grad de dispersie de 60...80  $\mu$  pe plantă, sau în apa de irigație, iar după aplicarea tratamentului nu este necesară repetarea lui în cursul sezonului de vegetație.

(51) Int.Cl.  
**A01N 63/04** (2006.01),  
**C12N 1/14** (2006.01),  
**A01P 3/00** (2006.01)



Fig. 1

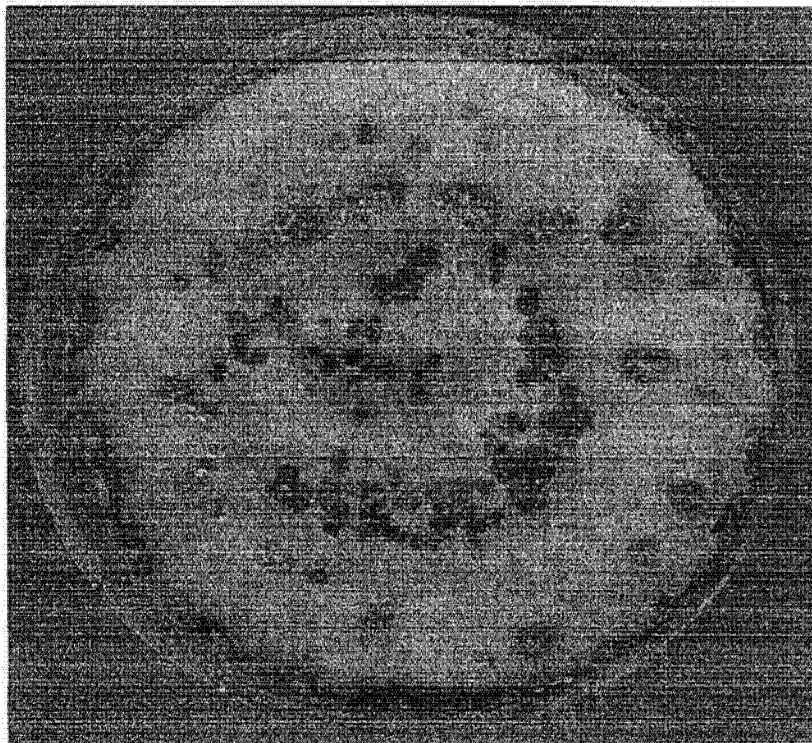


Fig. 2

(51) Int.Cl.  
A01N 63/04 (2006.01),  
C12N 1/14 (2006.01),  
A01P 3/00 (2006.01)

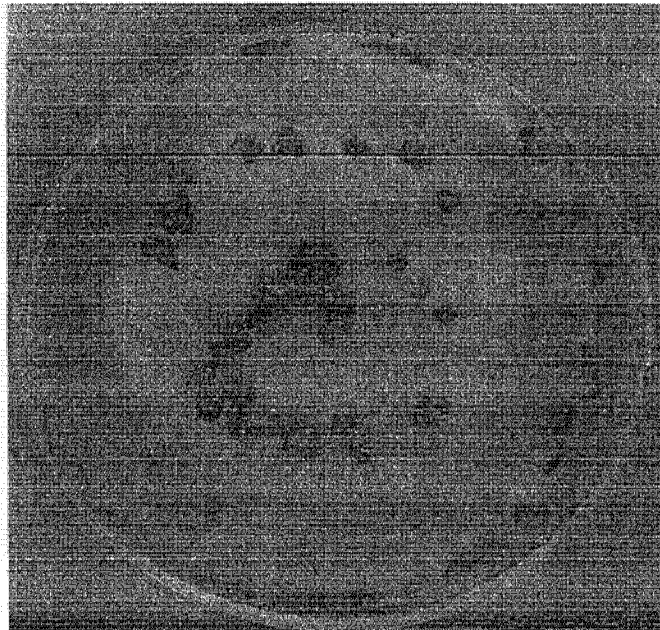


Fig. 3

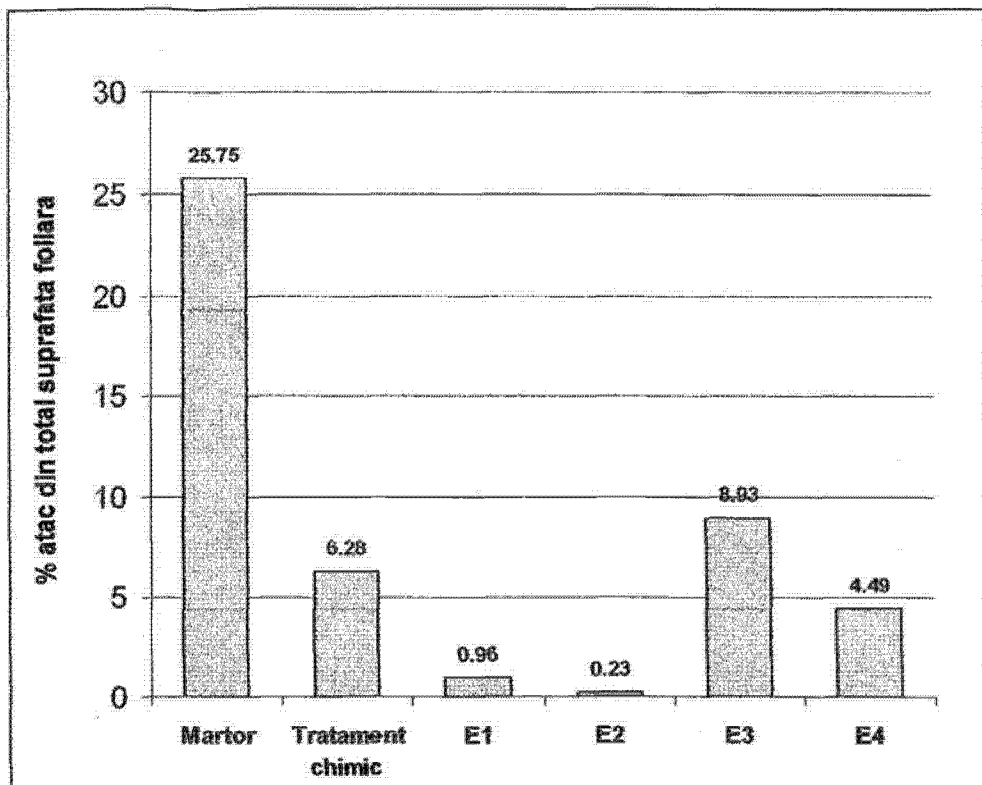


Fig. 4

(51) Int.Cl.  
A01N 63/04 (2006.01);  
C12N 1/14 (2006.01);  
A01P 3/00 (2006.01)

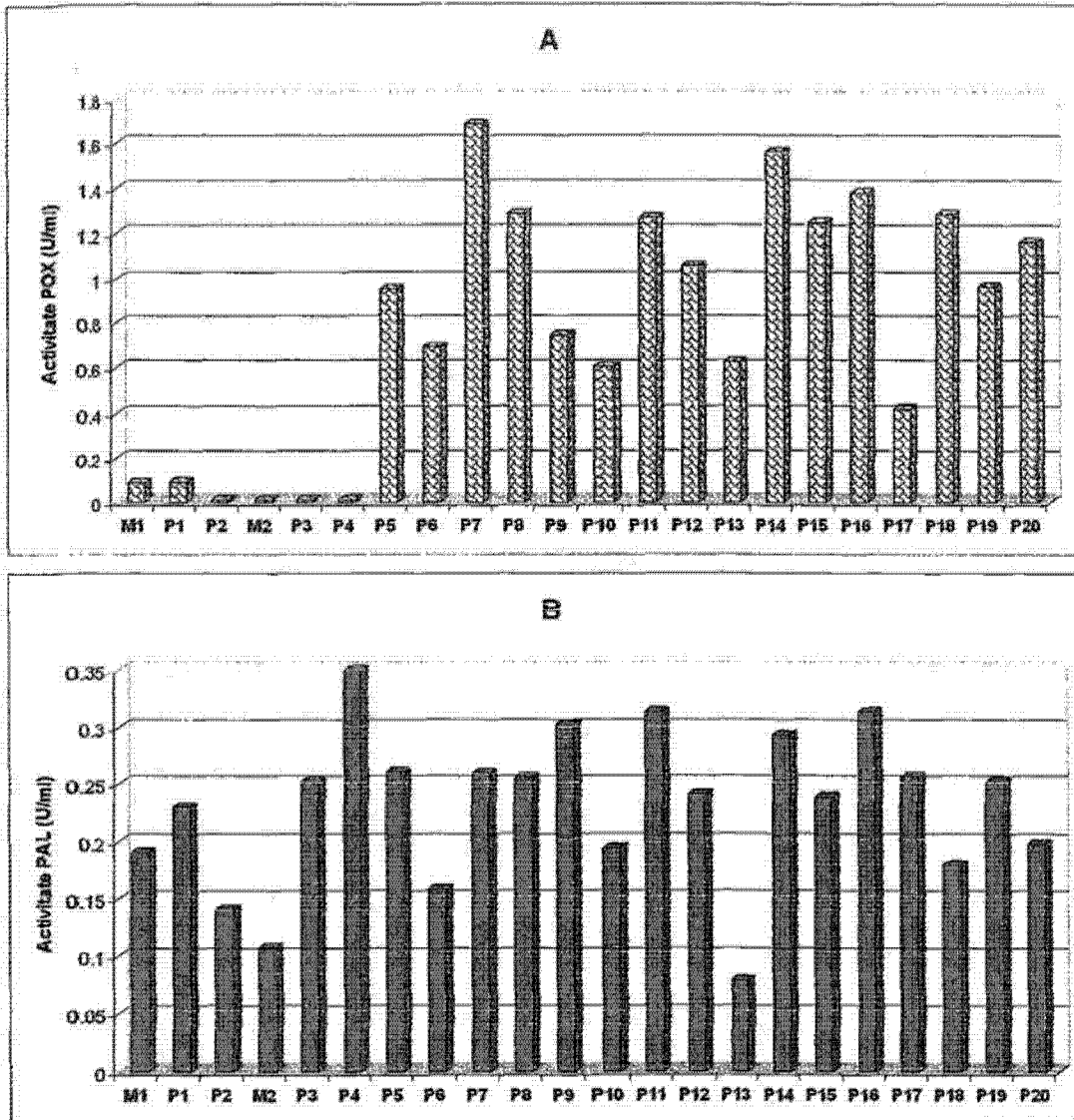


Fig. 5

(51) Int.Cl.  
**A01N 63/04** (2006.01),  
**C12N 1/14** (2006.01),  
**A01P 3/00** (2006.01)

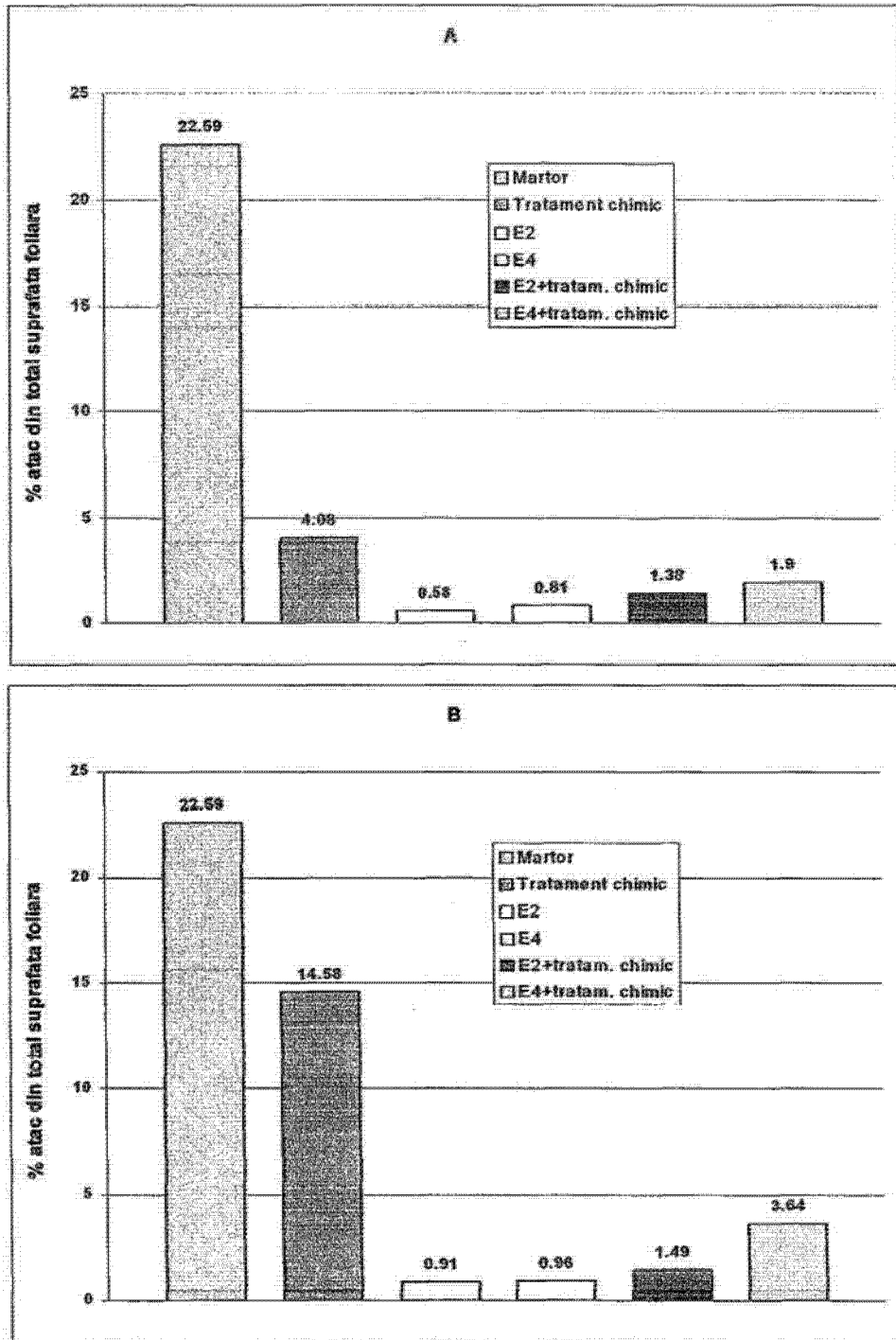


Fig. 6



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM  
 Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci  
 sub comanda nr. 601/2012