



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2012 00890**

(22) Data de depozit: **27/11/2012**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/06/2017** BOPI nr. **6/2017**

(41) Data publicării cererii:
30/10/2013 BOPI nr. **10/2013**

(73) Titular:
• **CORAX- BIONER CEU S.A.**,
PIAȚA LIBERTĂȚII NR.1, ET.3, CAM.319,
MIERCUREA-CIUC, HR, RO

(72) Inventatori:
• **OANCEA FLORIN**, *STR.PAȘCANI NR.5,*
BL.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;
• **MARA GYONGYVER**, *PIAȚA LIBERTĂȚII*
NR. 10, SC. C, AP. 35, MIERCUREA CIUC,
HR, RO;
• **ȘESAN TATIANA EUGENIA**,
BD.IULIU MANIU NR.55, BL.17, SC.E, ET.9,
AP.208, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• **MATHE ISTVAN**,
PIAȚA MAJLATH GUSZTAV KAROLY NR.4,
SC.A, AP.24, MIERCUREA CIUC, HR, RO;
• **RĂUT IULIANA**,
ALEEA BARAJUL BISTRIȚA NR.12, BL.4,
ET.4, AP.54, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;

• **ABRAHAM BEATA**,
STR. MIHAI EMINESCU NR. 1, SC.A, AP.22,
MIERCUREA CIUC, HR, RO;
• **SZABOLCS LANYI**, *STR.MIKO NR.21,*
MIERCUREA- CIUC, HR, RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:

F. OANCEA, T. E. ȘESAN, I. RĂUT, S. LANYI, "ACTIVATOR FUNGIC PE BAZĂ DE TRICHODERMA PENTRU PRODUCERE DE COMPOSTURI SUPRESIVE ȘI ODORANTE DESTINATE CULTURILOR ORNAMENTALE", 2010; **M. REY, J. DELGADO-JARANA, T. BENITEZ**, "IMPROVED ANTIFUNGAL ACTIVITY OF MUTANT OF TRICHODERMA HARZIANUM CECT 2413 WHICH PRODUCED MORE EXTRACELLULAR PROTEINS", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, ISSUE 5, VOL. 55, PP. 604-608, 2001

(54) **TULPINĂ DE TRICHODERMA HARZIANUM ȘI COMPOZIȚIE
CU ELIBERARE CONTROLATĂ CARE CONȚINE
RESPECTIVA TULPINĂ**



RO 128889 B1

1 Prezenta invenție se referă la o tulpină de *Trichoderma harzianum* care protejează
2 plantele ornamentale față de unele boli, produce exohidrolaze cu rol în degradarea mate-
3 rialului vegetal, și sintetizează compuși volatili odoranți, ca și la o compoziție cu eliberare
4 controlată, care conține această tulpină, destinată accelerării producerii de composturi
5 supresive și odorante, aplicabile ca mulci pentru protecția și nutriția culturilor ornamentale.

6 Sunt cunoscute o serie întreagă de tulpini de ciuperci microscopice aparținând
7 genului *Trichoderma*, care sunt antagoniste pentru agenții fitopatogeni, și au o competență
8 saprofită ridicată, colonizând diferitele substraturi și conferindu-le caracteristici supresive
9 pentru bolile plantelor. Brevetul **EP 1400586 (B1)** descrie o tulpină de *Trichoderma*
10 *asperellum*, T34 (2), cu numărul de depozit CECT 20147, Colección Española de Cultivos
11 Tipo, Valencia, Spania, ce are capacitatea de a coloniza substraturi de creștere pentru
12 plante cum sunt, de exemplu, turba, compostul (compost din lemn de esență tare, compost
13 din coajă de conifere, compost din lemn de plută, compost din nămoluri de la stațiile de epu-
14 rare, compost din resturi vegetale etc.) sau formulări de tip CTV (compost - turbă - vermiculit).
15 Substratul rezultat prin colonizare cu această tulpină prezintă avantajul de a fi supresiv
16 atât față de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*, cât și față de *Rhizoctonia solanii*.
17 Procedul revendicat pentru realizarea substratului supresiv implică distribuția unei cantități
18 efective din tulpina de T34 (2), în substratul de creștere, pentru suprimarea atacului agenților
19 fitopatogeni. Brevetul **US 7070984 (B2)** se referă la tulpina Li49 de *T. viride*, depozitată la
20 ATCC cu numărul PTA-1225, ce are o capacitate ridicată de a coloniza diferitele substraturi,
21 și care acționează ca parazit al agenților fitopatogeni, în special al celor din genurile
22 *Fusarium* și *Rhizoctonia*. Tulpina este cultivată aseptice pe un mediu lichid, iar biomasa este
23 recuperată și adăugată în proporție de cel puțin 10% într-un suport organic alcătuit din boabe
24 de cereale, turbă și compost. Biopreparatul astfel rezultat este utilizat pentru tratament
25 împotriva agenților fitopatogeni din sol, în doză de 5 livre pentru 1 acru (5,6 kg per ha).
26 Brevetul **US 4900348** revendică folosirea tulpinilor de *Trichoderma hamatum* ATCC 20764
27 sau 20765, în combinație cu bacteriile *Xanthomonas maltophilia* ATCC 53199 și
28 *Flavobacterium balustinum* ATCC 53199, pentru realizarea unui compost supresiv pentru
29 *Rhizoctonia solanii*, *Pythium ultimum* și *Fusarium*, pornind de la scoarță de lemn de esență
30 tare, scoarță de lemn de rășinoase sau nămol de la stațiile de epurare, ca substrat de com-
31 postare.

32 Tulpinile de *Trichoderma* au și o semnificativă activitate de degradare a materialului
33 vegetal, datorită producerii de enzime hidrolitice, în special celuloze. Brevetul **TW 1287535**
34 **(B)** prezintă tulpina TC103 de *Trichoderma spp.*, depozitată sub numărul BCRC 930070 la
35 Bioresources Collection and Research Center, Taipei, ce are capacitatea de a accelera
36 degradarea bagasei/reziduurilor de lemn, cu formare de compost. Cererea de brevet
37 **RO 127471 (A1)** protejează tulpina Td85 de *T. pseudokoningii*, număr de depozit DSM
38 23661, care prezintă concomitent antagonism față de agenții fitopatogeni din sol, capacitate
39 ridicată de mineralizare a materialului vegetal, și rezistență la compușii biofumiganți eliberați
40 din biomasă de crucifere, și care este destinată pentru accelerarea mineralizării biomasei
41 vegetale rezultate prin distrugerea culturilor „verzi” de crucifere, de protecție în timpul iernii.

42 Pentru unele tulpini de *Trichoderma* s-a evidențiat capacitatea de a produce compuși
43 aromați, cum este, de exemplu, 6-pentil-pirona, care au și o activitate antifungică semnifica-
44 tivă. Cererea de brevet **WO 9520879 (A2)** revendică utilizarea metaboliților antifungali pro-
45 duși de diferite tulpini de *Trichoderma*, 6-pentil-alfa-pironă, delta-decanolactonă și massoi-
46 lactonă, singuri sau împreună cu tulpinile care produc astfel de metaboliți, pentru combate-
47 rea bolilor fungice ale plantelor de cultură.

RO 128889 B1

Nu s-au pus încă în evidență tulpini de <i>Trichoderma</i> , active în protecția plantelor ornamentale față de o serie de boli, și care să prezinte concomitent și capacitatea de:	1
(i) producere de celuloze/p-glucanaze, cu rol în accelerarea descompunerii materialului vegetal din substraturile de compostat, și	3
(ii) sinteza unor compuși volatili care sunt, în același timp, antifungici și odoranți.	5
Tulpinile antagoniste din această categorie, care au capacitatea de a sintetiza exohidrolaze implicate în degradare materialului vegetal și compuși odoranți antifungici, ar permite realizarea unor composturi supresive și odorante, utilizabile ca mulci pentru protecția și nutriția culturilor ornamentale din spațiile verzi.	7 9
Pentru astfel de tulpini este necesară și realizarea unor compoziții cu eliberare controlată, care să faciliteze colonizarea materialelor destinate compostării și, în special, a scoarței de copac ce este utilizată ca mulci organic pentru grădini și spații verzi. Pentil-pironele volatile produse de tulpinile de <i>Trichoderma</i> au un efect fungistatic și asupra celulelor vegetative/propagulelor din aceeași tulpină (Sahay Bagnon et al., 2000, Process Biochem., 36:103-109), colonizarea ulterioară de către aceeași tulpină a unui substrat în care se dezvoltă deja o populație producătoare de 6-pentil-pironă fiind limitată.	11 13 15
Această invenție se referă la tulpina de <i>Trichoderma harzianum</i> Td50b, depozitată cu numărul de depozit NCAIM (P) F 001412 la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms, Universitatea Corvinus din Budapesta, Ungaria, care produce exohidrolaze cu rol în degradarea materialului vegetal, și prezintă antagonism pentru unii agenți patogeni ai culturilor ornamentale, inclusiv datorită sintetizării de compuși volatili odoranți cu activitate antifungică.	17 19 21
Un alt obiect al acestei invenții este un procedeu prin care să fie selectate rapid tulpinile care sunt antagoniste <i>in vitro</i> pentru diferiții agenți fitopatogeni, producând exohidrolaze cu rol în degradarea componentelor materialului vegetal, și sintetizând compuși volatili odoranți cu activitate antifungică. De asemenea, această invenție se referă și la o compoziție cu eliberare controlată, care: facilitează colonizarea materialelor destinate compostării, asigurând supraviețuirea propagulelor neeliberate și după colonizarea inițială a substratului cu tulpina producătoare de compuși volatili fungistatici, inclusiv pentru propagulele aceleași tulpini aflate în stare de dormanță, și, în final, accelerează procesul de obținere a composturilor destinate utilizării pentru mulcirea solului culturilor ornamentale.	23 25 27 29 31
Tulpina de <i>Trichoderma harzianum</i> Td50b este antagonistă <i>in vitro</i> față de <i>Rhizoctonia solanii</i> , <i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>Pythium ultimum</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Alternaria alternata</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> ; protejează culturile ornamentale de bolile produse de ciupercile fitopatogene din sol, implicate în complexul de răsărire (<i>Rhizoctonia</i> , <i>Pythium</i> , <i>Fusarium</i>) și producătoare de putregaiuri (<i>Botrytis cinerea</i>), produce celuloze cu rol în degradarea materialului vegetal din substraturile de compostat, sintetizează 6-pentil-pirona, compus volatil care este, în același timp, antifungic și odorant, și accelerează formarea de compost supresiv din coajă de brad.	33 35 37 39
Tulpina <i>T. harzianum</i> Td50b, număr depozit NCAIM (P) F 001412, a fost selectată din izolate naturale prin următoarele etape:	41
- distribuirea aseptică a unui mediu agarizat, care conține, ca principală sursă de carbon, un derivat de celuloză, într-o placă cu 24 de godeuri;	43
- inocularea mediului agarizat cu 5 izolate de testat, distribuite randomizat, și menținerea unor godeuri martor neinoculate;	45
- acoperirea cu o folie de plastic sterilă, care permite schimbul de gaze;	
- incubarea timp de 3 zile la 25°C;	47

RO 12889 B1

1 - depunerea plăcii cu 24 godeuri în care s-au dezvoltat izolatele de testat peste o altă
2 placă cu 24 de godeuri cu mediu agarizat, în care a fost crescută timp de 2 zile o ciupercă
3 microscopică, agent fitopatogen, față de care se testează antagonismul izolatelor;

4 - incubarea timp de 5 zile, la 25°C, a plăcilor reunite, cu placa cu mediu cu izolate de
5 *Trichoderma* deasupra plăcii cu ciuperca fitopatogenă de testat, separate între ele de folia
de plastic ce permite schimbul de gaze;

6 - determinarea creșterii ciupercii fitopatogene test prin analiza imaginii plăcii de micro-
7 titrare preluate de un sistem de fotodocumentare, și calcularea procentului de inhibiție cu
8 ajutorul formulei: $(A_1 - A_n)/A_1 \times 100$, unde A_1 este suprafața acoperită de agentul fitopatogen
9 în varianta martor netratat, iar A_n este suprafața acoperită de agentul fitopatogen în varianta
10 în care a fost confruntat cu compușii volatili produși de unul dintre izolatele de testat;

11 - analiza statistică a rezultatelor prin analiza variantei și identificarea eventualelor
12 izolate active datorită producerii de compuși volatili;

13 - inundarea mediului agarizat pe care au crescut izolatele de *Trichoderma* cu o soluție
14 de Roșu de Congo 0,1% și, după 5 min, înlăturarea soluției de roșu de Congo și spălarea
15 cu o soluție 1 M NaCl pentru 20 min;

16 - evidențierea zonelor clare de celuloliză în jurul coloniilor de *Trichoderma* producă-
17 toare de celulaze.

18 Compoziția cu eliberare controlată, pe baza tulpinii *T. harzianum* Td50b, este
19 alcătuită din 76 părți rumeguș de lemn parțial hidrolizat, 10 părți făină, 5,3 părți esteri etilici
20 ai acizilor grași, 4 părți alcool polivinilic, 3,8 părți lecitină, 0,5 părți săpun de potasiu, 0,4 părți
21 glicerol și minimum 10^6 ufc/g *T. harzianum* Td50b.

22 Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:

23 - asigurarea unei colonizări uniforme și reproductibile de către tulpina Td50b, cu
24 propagule eliberate succesiv din compoziția conform prezentei invenții, datorită acumulării
25 preponderente în componenta hidrofobă a compoziției a 6-pentil-pironei, compus volatil pro-
26 dus de populația provenită din primul val eliberat, deja dezvoltată în substrat, și fungistatic,
27 pentru propagulele aceleiași tulpini;

28 - accelerarea procesului de obținere a composturilor supresive și odorante, prin folo-
29 sirea compoziției care eliberează succesiv inocul de propagule ale tulpinii Td50b, înalt produ-
30 cătoare de celulaze;

31 - formarea unui compost supresiv pentru bolile plantelor ornamentale, și cu caracte-
32 ristici odorante superioare, prin utilizarea tulpinii Td50b ca activator de compostare.

33 În continuare invenția va fi descrisă în detaliu în următoarele exemple.

34 Exemplul 1

35 Tulpina de *Trichoderma harzianum* Rifai, tulpina Td50b, a fost izolată dintr-o probă
36 de compost de coajă de brad provenită de la Ștefănești, Argeș (latitudine, 44°, 51', 53,49" N;
37 longitudine 24°, 57', 0,67"E). Izolatele au fost obținute folosind mediul selectiv propus de
38 William et al., 2003 (**Appl. Environ. Microbiol.**, 69: 4190-4191), care conține 0,2 g $MgSO_4$
39 $\cdot 7H_2O$, 0,9 g K_2HPO_4 , 1,0 g NH_4NO_3 , 0,15 g KCl, 0,15 g Roz Bengal (sare de sodiu, R3877
40 Sigma, Sigma - Aldrich, Saint Louis, MO, SUA), 3 g glucoză, 20 g agar în 950 ml apă disti-
41 lată, la care se adaugă, după sterilizare (prin autoclavare la 121°C, pentru 20 min), ingre-
42 diente care-i conferă specificitatea. Ingredientele antimicrobiene utilizate, care-i conferă spe-
43 cificitatea (exprimate per litru de mediu), au fost: 0,25 g cloramfenicol (C0378 Sigma -
44 Aldrich), 9 ml de soluție stoc de streptomycină (1% masă/volum, S6501 Sigma-Aldrich), 0,2 g
45 pentacloronitrobenzen (quintozene, P2205 Sigma - Aldrich) și 1,5 ml propamocarb condițio-
46 nat (Previcur 607 SL, Bayer Crop Science, Monheim am Rhein, Germania, 607 g ingredient
47 activ per litru). Toate aceste ingrediente s-au adus la 40 ml cu apă distilată sterilă, au fost
48 sterilizate prin filtrare, și apoi s-au adăugat la mediul bazal răcit la limita de solidificare.

RO 128889 B1

Selecția tulpinii Td50b din izolatele obținute pe mediu selectiv, de mai sus, a fost realizată prin procedeul descris mai jos.

Într-o placă având 24 de godeuri (Corning® Costar® cell culture plates, 24 well, flat bottom, Corning, Tewksbury, MA, SUA), s-a distribuit aseptice mediu care permite concomitent și evidențierea activității endo-celulazice. Acest mediu agarizat, utilizat și pentru identificarea celulozei, constă în mediu bazal (1 l de mediu bazal conține: 5 g tartrat de amoniu, 1 g KH₂PO₄, 0,5 g MgSO₄ · 7H₂O, 0,1 g extract de drojdie, 0,001 g CaCl₂ · 2H₂O - 0,1 ml dintr-o soluție stoc 10 mg/ml), la care s-a adăugat 2% carboximetilceluloză de viscozitate mică (CMC 100 cP), și care s-a agarizat cu 20 g/l agar. Mediul s-a autoclavat la 121°C, timp de 20 min.

Godeurile cu mediu agarizat s-au inoculat cu 5 tulpini (4 izolate și o tulpină etalon, *Trichoderma atroviride* ATCC 74058, tulpină pentru care s-a pus în evidență producerea de 6-pentil-pironă, *Reithner et al., 2005, Fungal Genet. Biol., 42:749-760*) în 4 repetiții. S-a realizat și un martor (control) cu mediu agarizat, care nu a fost inoculat. Schema de randomizare pentru placa de 24 de godeuri, 6 variante (V₁ - martor neinoculat; V₂ - tulpină etalon; V₃ - V₆ - izolate de testat) în 4 repetiții, utilizată în cadrul experimentelor de selectare, este prezentată în tabelul 1.

Tabelul 1

Schema de randomizare a celor 6 variante (tulpini) în 4 repetiții, aplicată pentru placa cu 24 de godeuri

	1	2	3	4	5	6
A	V ₄	V ₅	V ₃	V ₆	V ₂	V ₁
B	V ₆	V ₂	V ₄	V ₅	V ₁	V ₃
C	V ₃	V ₁	V ₅	V ₂	V ₄	V ₆
D	V ₅	V ₃	V ₁	V ₄	V ₆	V ₂

Placa s-a acoperit cu folie de plastic sterilă (Breathe-Easy™ sealing membrane, Z380059 Sigma), care permite schimbul de gaze, și s-a incubat 3 zile la 25°C. S-a verificat vizual creșterea. În paralel s-a cultivat 2 zile fitopatogenul test *Rhizoctonia solanii* ATCC 66873 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, SUA, tulpină izolată din mulci de scoarță de conifere, aparținând grupului de anastomoză hifală AG-4, grup regăsit cu precădere ca agent cauzal al bolilor produse plantelor ornamentale), pe o altă placă de microtitrare cu 24 de godeuri, fiecare conținând 1,5 ml de mediu cartof - glucoză - agar, inoculat cu 0,1 ml de suspensie hifală de *R. solanii* conținând 2,5 mg hife per ml (suspensie reconstituită din miceliu cultivat pe mediu cartof - glucoză lichid). După inițierea dezvoltării coloniilor de *Trichoderma*, s-a depus placa de microtitrare cu mediu agarizat cu tulpini de *Trichoderma* peste cea care conține ciuperca test. Între cele două plăci s-a menținut folia sterilă, care permite schimbul de gaze. S-au incubat timp de 5 zile la 24°C plăcile reunite, cu placa cu mediu cu izolate de *Trichoderma* deasupra plăcii cu ciuperca fitopatogenă de testat, separate între ele de folia de plastic ce permite schimbul de gaze. Creșterea ciupericii fitopatogene test a fost determinată prin analiza imaginii plăcii de microtitrare, preluată de un sistem de fotodocumentare InGenius și prelucrată de către softul Dimension (Syngene, Cambridge, Marea Britanie). Procentul de inhibiție a fost calculat cu ajutorul formulei (1) de mai jos:

$$\frac{A_1 - A_n}{A_1} \times 100 \quad (1)$$

RO 12889 B1

1 unde A₁ este suprafața acoperită de agentul fitopatogen în varianta martor netratat, iar A_n
este suprafața acoperită de agentul fitopatogen în varianta în care a fost confruntat cu com-
3 pușii volatili produși de unul dintre izolatele de testat. Datele referitoare la inhibarea ciupercii-
test s-au prelucrat prin analiza variantei (Statistica 10, StatSoft, Tulsa, OK, SUA), deter-
5 minându-se activitatea de inhibare a izolatelor testate, comparativ cu tulpina etalon.

Mediul agarizat pe care au crescut izolatele de *Trichoderma* a fost inundat cu o
7 soluție de Roșu de Congo 0,1% și, după 5 min, soluția de Roșu de Congo a fost înlăturată
și au fost spălate plăcile cu o soluție NaCl 1 M, pentru 20 min. S-au identificat tulpinile de
9 *Trichoderma* producătoare de celulaze, prin evidențierea zonelor clare de celuloză în jurul
coloniilor.

11 La sfârșitul a peste 25 de cicluri de testări, în care au fost testate peste 100 izolate,
a fost identificată tulpina Td50b ca fiind cea care prezintă concomitent o activitate celulozoli-
13 tică semnificativă, evidențiată prin zone clare de celuloză în jurul coloniilor, și activitate inhi-
bitorie ridicată, datorată compușilor volatili.

15 Încadrarea taxonomică a tulpinii de *Trichoderma harzianum* Td50b este: *Filumul*
Ascomycota, *Clasa Sordariomycetes*, *Ordinul Hypocreales*, *Familia Hypocreaceae*, genul
17 *Trichoderma*.

Caracteristicile morfologice ale tulpinii Td50b sunt descrise mai jos:

19 - dezvoltarea coloniei: 4,5...7,5 (-9,0) cm diametru după 5 zile, pe mediul CGA, inițial
± hialină, ulterior albicioasă-verde, cu zone de mănunchiuri de conidiofori albastru-verzi;
21 reversul coloniei necolorat;

- conidiofori: ramificați piramidal, cu ramuri mai scurte spre apex;

23 - fialide: în grupuri de 2...4, destul de subțiri și adesea curbate, de (6) 8...14 (-20) X
2,4...3,0 μm;

25 - conidii subgloboase sau elipsoidale, de 3,6...4,5 μm în diametru cu pereții aspri;

27 - clamidospori prezenți în miceliul culturilor mai vârstnice, intercalări și uneori termi-
nali, cel mai adesea globoși, hialini, cu pereții netezi.

29 Caracteristicile fiziologice, de utilizare a diferitelor substraturi, sunt descrise în cele
ce urmează:

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

35 - surse de azot: optime: DL-leucina, L-cystina, DL-citrulina, DL-nor-leucina, azotatul
de amoniu, tartratul de amoniu; dezvoltare fungală moderată pe: L-arginină, L-leucină, glico-
col, asparagină, riboflavină, sulfat de amoniu, carbonat de amoniu, fosfat monobazic; dezvolt-
37 tare fungală slabă pe: triptofan, tirozină, D-serină, lizină, uree, azotați de sodiu, calciu și
potasiu.

39 Caracteristicile fizice de creștere și sporulare sunt:

41 - temperatura: temperatura optimă: 20...25°C; temperatura minimă: 2°C; temperatură
maximă: 37°C;

43 - reacția substratului de cultură: pH optim: 4,0...5,5; dezvoltare slabă a ciupercii la
valori de pH de la 9,0 la 13,0.

Identificarea realizată pe criterii morfologice a fost confirmată de analiza moleculară
45 a ITS1 (internal transcribed spacers 1) a clusterului pentru gena rRNA (marker universal
fungal BarCode, <http://www.isth.info>). S-au folosit primerii specifici ITS1 SR6R f și LR1 r
47 (conform protocol BarCode <http://www.isth.info/methods>). Secvențierea nucleotidică a fost
realizată cu metoda Dye Terminator Cycle Sequencing, folosind un secvențiator automat de
49 tip ABI PRISM 310 (Perkin Elmer, Waltham, MA, SUA). Compararea secvențelor s-a realizat
cu programul TrichoBlast (<http://www.isth.info/tools/blast/index.php>).

RO 128889 B1

Tulpina Td50b este puternic antagonistă față de ciupercile fitopatogene: *Rhizoctonia solanii*, *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *Pythium ultimum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Sclerotinia sclerotiorum*. Gradul de antagonism al tulpinii de *Trichoderma harzianum* Td50b față de ciupercile fitopatogene s-a determinat *in vitro* prin metoda culturilor duble (Coskuntuna și Ozer, 2008, Crop Protection, 27:330-336). Tulpina de *Trichoderma harzianum* Td50b și cele ale agenților fitopatogeni de testat (*Rhizoctonia solanii* ATCC 66873, *Fusarium graminearum* DSM4527, *F. culmorum* ATCC 36017, *Pythium ultimum*, DSM 62987, *Botrytis cinerea* DSM 5144, *Alternaria alternata* DSM 62010, *Sclerotinia sclerotiorum* DSM 1946) au fost cultivate separat pe mediu cartof - glucoză - agar (CGA), timp de 7 zile, la 25°C și la întuneric. Din gazonul format după 7 zile au fost prelevate cu o preducea discuri de 0,5 mm care s-au deșus la 1 cm de pereții unei plăci Petri cu mediu cu diametrul de 9 cm, în părți opuse, fiecare disc fiind separat de aproximativ 6 cm. Interacția dintre colonii a fost determinată după 5 zile de incubare la 25°C și la întuneric, folosind cala propusă de Bell și colab. (Bell et al., 1982, *Phytopathology*, 72:379-382), cu 5 note: 1- tulpina de *Trichoderma* crește complet peste fitopatogen, acoperind întreaga suprafață; 2 - tulpina de *Trichoderma* crește pe mai mult de două treimi din suprafața mediului de cultură; 3 - tulpina de *Trichoderma* și patogenul cresc fiecare pe aproximativ jumătate din suprafața mediului; 4 - fitopatogenul crește pe mai mult de două treimi din suprafața mediului de cultură; 5 - fitopatogenul crește complet peste *Trichoderma*, acoperind întreaga suprafață. Experimentele s-au realizat în triplicat și s-au repetat de trei ori.

Din analiza rezultatelor experimentale obținute *in vitro* (tabelul 2), se constată că tulpina de *Trichoderma harzianum* Td50b prezintă antagonism marcat față de *Rhizoctonia solanii* ATCC 66873, *Fusarium graminearum* DSM4527, *F. culmorum* ATCC 36017, *Pythium ultimum*, DSM 62987, *Botrytis cinerea* DSM 5144, *Alternaria alternata* DSM 62010, *Scierotinia sclerotiorum* DSM 1946.

Tabelul 2

Antagonismul *in vitro* al tulpinii de *Trichoderma harzianum* Td50b față de agenți fitopatogeni

Agent fitopatogen	Activitate antagonistă	Comportare
<i>Rhizoctonia solanii</i> ATCC 66873	1,77	Puternic antagonist (PA)
<i>Fusarium graminearum</i> DSM4527	1,88	Puternic antagonist (PA)
<i>F. culmorum</i> ATCC 36017	1,88	Puternic antagonist (PA)
<i>Pythium ultimum</i> , DSM 62987	1,66	Puternic antagonist (PA)
<i>Botrytis cinerea</i> DSM 5144	1,44	Puternic antagonist (PA)
<i>Alternaria alternata</i> DSM 62010	2,00	Puternic antagonist (PA)
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> DSM 1946	1,88	Puternic antagonist (PA)

S-a determinat și activitatea enzimatică din micelii de *T. harzianum* Td50b, obținute prin creștere pe mediu lichid bazal, suplimentat cu 2% CMC. 1 l de mediu bazal conține: 5 g tartrat de amoniu, 1 g KH₂PO₄, 0,5 g MgSO₄ · 7H₂O, 0,1 g extract de drojdie, 0,001 g CaCl₂ · 2H₂O - 0,1 ml dintr-o soluție stoc 10 mg/ml, la care s-a adăugat 2% carboximetilceluloză de viscozitate mică (CMC 100 cP). Pe acest mediu, sterilizat prin autoclavare 20 min la 121°C, a fost cultivată tulpina *T. harzianum* Td50b timp de 7 zile. S-a colectat circa 1 g de micelii, care s-a omogenizat în tampon TRIS 100 mM (pH 7,5) la 4°C, pentru 1 h, folosind un

RO 128889 B1

1 *Thermomixer* (Eppendorf, Hamburg, Germania). S-a recuperat supernatantul după centrifugare la 10,000 x g la 4°C, pentru 20 min. Proteina totală din extract a fost determinată după
3 metoda Bradford, folosind albumina serică bovină ca standard. Activitatea enzimatică a fost
5 determinată folosind hârtia de filtru Whatman nr. 1 ca substrat. Hârtia de filtru a fost tăiată
7 în fâșii de 1 x 6 cm, din care s-au luat 50 mg care s-au suspendat, într-o eprubetă de
9 18 mm/10 ml, într-un ml tampon citrat - sodiu 0,05 M, pH de 4,8. Peste amestecul hârtie de
11 filtru - tampon s-au adăugat 0,5 ml de extract enzimatic. S-a vortexat pentru o suspendare
13 eficientă a hârtiei de filtru, și s-a incubat timp de 1 h la 45°C. După trecerea perioadei de
15 incubare, reacția s-a stopat cu 3 ml reactiv dinitrosalicilic DNS (ce conține 283,2 ml apă
17 deionizată, 2,12 g de acid 3,5 dinitrosalicilic, 3,96 g NaOH, 61,2 g de tartrat dublu de sodiu
19 și potasiu, 1,52 ml fenol lichid 89% și 1,66 g bisulfid de sodiu). Eprubeta a fost încălzită pe
baie de apă la fierbere timp de 5 min, pentru dezvoltarea reacției de culoare, după care s-a
citit densitatea optică la 545 nm. Activitatea enzimatică s-a exprimat în unități FPU (**Ghose,
1987, Pure Appl. Chem, 59:257-268**), folosind o curbă etalon de glucoză. 1 unitate FPU
este 0,37/activitatea enzimatică ce eliberează echivalentul a 2 mg glucoză unități enzimatică
(μmoli grupări reducătoare ce reacționează cu DNS eliberate per min). Tulpina Td50 a
produs în condițiile experimentale date 0,32 ± 0,08 FPU per mg proteină, ceea ce înseamnă
că este o tulpină înalt producătoare de celulază (**Kovacs et al., 2008, Enz. Microbiol.,
Technol., 43: 48-55**).

S-a determinat și capacitatea tulpinii Td50b de a produce și acumula 6-pentil-a-pironă
(6-PP). Tulpinile Td50b și ATCC 74058 au fost cultivate pe mediu lichid cartof-glucoză, în
condiții staționare, fără agitare, timp de 5 zile, la 25°C. După 5 zile, miceliul format a fost
omogenizat cu mediul de cultură cu un blender de laborator (Waring®, Laboratory Blender,
Fischer Scientific, Waltham, MA, SUA). Cantitatea de biomasă din omogenat a fost deter-
minată gravimetric, după filtrare pe hârtie Whatman nr. 1 și uscare la 110°C, până la masă
constantă. S-au luat 25 ml de omogenat biomasă - mediu de cultură, care au fost extrași cu
câte 25 ml de clorură de metilen. Frațiunile inferioare, conținând solventul cu densitate mai
mare decât cea a apei, s-au reunit, au fost uscate pe sulfat de sodiu anhidru, concentrate
la sec și reluate în 0,1 ml clorură de metilen. Determinarea 6-PP a fost făcută gaz-cromato-
grafic, cu detector spectrometru de masă. S-a folosit un gaz-cromatograf Agilent 700, echipat
cu spectrometru de masă quadrupol (Agilent, Santa Clara, CA, SUA). 6-PP a fost separată
pe o coloană DB-5 (diametru interior 0,32 mm, lungime 30 m, grosimea filmului 0,25 μm). S-a
aplicat 1 μl de probă în modul split, cu un raport de splitare de 1:100 până la sfârșitul
perioadei de separare. Coloana a fost menținută la 40°C pentru 2 min, urmată de o creștere
de 20°C/min până la 120°C, care a fost menținută pentru 2 min, și apoi la 210°C cu 10°C/min.
Temperatura detectorului și a injectorului a fost de 250°C. S-a folosit heliul ca gaz purtător,
cu un debit de 1,2 ml/min. Pentru cuantificare s-a realizat o curbă etalon folosind 6-PP pură
(Sigma-Aldrich). Cantitatea determinată de 6-PP a fost raportată la volumul de mediu de
cultură și la cantitatea de biomasă uscată determinată gravimetric din respectivul mediu de
cultură. S-a lucrat în triplicat. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul 3, ca medii ale
celor trei repetiții, comparativ cu date raportate pentru alte tulpini de *Trichoderma* cultivate
pe medii lichide. Aceste rezultate susțin capacitatea tulpinii Td50b de a sintetiza cantități
semnificative de 6-PP.

Randamentul de sinteză al 6-pentil-a-pironei de către tulpinile testate, comparativ cu cel raportat pentru alte tulpini cultivate pe medii lichide

Tulpina	Condiții de creștere	Concentrația finală	Referința
<i>T. harzianum</i> Td50b	Mediu cartof-glucoză, 25°C, 5 zile	350 mg/l 83,41 mg/h	exemplul 1
<i>T. atroviride</i> ATCC 74058	Mediu cartof-glucoză, 25°C, 5 zile	238 mg/l 65,75 mg/g	exemplul 1
<i>T. harzianum</i> IMI 206040	Mediu extract de malț-glucoză, 29°C, 5 zile	182 mg/l 60,67 mg/g	Serrano-Carreon et al., 2004 ¹
<i>T. harzianum</i> , Indian străin	Mediu cartof-glucoză, 30°C, 5 zile	455 mg/l 98,91 mg/g	Kalyani et al., 2000 ²
<i>T. konigii</i> 7a, IMI 308475	Mediu cartof-glucoză, 20°C, 7 zile	145	Simon et al., 1988 ³

¹ - Serrano-Carreon et al., 2004, Biotechnol. Lett., 26:1403-1406.

² - Kalyani et al., 2000, Appl. Microbiol. Biotechnol., 53:610-612.

³ - Simon et al., 1988, Soil Biol. Biochem., 20:263-264.

Exemplul 2

Tulpina *T. harzianum* Td50b a fost testată din punct de vedere al antagonismului *in situ* pe resturi vegetale de trandafir față *Botrytis cinerea* DSiyL5144 (izolată inițial de pe trandafiri). Au fost prelevate discuri cu diametrul de 1 cm de frunze verzi și de petale de trandafir (*Rosa hybrida* ev. Sonia), care au fost inoculate cu 0,3 ml suspensie de spori 10⁶ conidii/ml de *B. cinerea* DSM 5144, aplicați prin stropire cu un atomizor de sticlă cu dop metalic și pară de cauciuc (model 15-RD, DeVilbiss Helathcare, Somerset, PA, SUA). Discurile inoculate au fost plasate în rulouri de șervete de hârtie umezite, iar rulourile de hârtie au fost plasate înăuntru unor pungă transparente de polietilenă. Pungile au fost închise și menținute la temperatura camerei, timp de 3 zile în cazul petalelor și, respectiv, de 7 zile în cazul frunzelor, pentru a se dezvolta simptomele caracteristice infecției cu *B. cinerea*.

Discurile de petale și de frunze cu simptome de putregai cenușiu au fost apoi lăsate să se usuce timp de 10 zile, pentru a simula resturile uscate de trandafiri infectate cu *Botrytis cinerea*. Discurile infectate și uscate au fost apoi imersate timp de 20 s în suspensii de spori de *T. harzianum* Td50b în tampon fosfat salin steril, 104 și 105 spori/ml, și, respectiv, în tampon fosfat salin steril, în cazul unei variante martor, iar apoi au fost distribuite câte 12 în plăci Petri cu diametrul de 15 cm. Experimentul a inclus următoarele variante:

V₁ - martor inoculat cu *B. cinerea* și netratat ulterior;

V₂ - martor inoculat cu *B. cinerea* și tratat ulterior cu tampon fosfat salin steril;

V₃ - inoculat cu *B. cinerea* și tratat cu *T. harzianum* Td50b 104 spori/ml;

V₄ - inoculat cu *B. cinerea* și tratat cu *T. harzianum* Td50b 104 spori/ml.

Fiecare variantă s-a lucrat în 4 repetiții, fiecare repetiție fiind reprezentată de 12 discuri de petale, respectiv, frunze, dispuse în plăci Petri de 15 cm. Petri-urile cu diferite repetiții au fost amplasate randomizat în cadrul procedurilor experimentale.

Plăcile Petri au fost menținute timp de 24 h la întuneric, la 25°C, în cameră umedă (Model HCP108, Memmert, Schwabach, Germania), și apoi au fost trecute în cameră climatică (Model SGC 120 LED, Weiss Gallenkamp, Loughborough, Marea Britanie), unde au fost menținute la 60 μmol fotoni/m²/s, cu o fotoperioadă de 12 h, la 20°C și 70% umiditate, timp de 3 zile pentru petale și, respectiv, de 7 zile pentru frunze.

RO 12889 B1

După incubare s-a estimat suprafața pe care s-au format conidiofori de *B. cinerea*, prin disecție și examinare vizuală la microscop binocular, folosind următoarea scară de notare: 0 - sub 1%; 1 - între 1 și 25%; 2 - între 25 și 50%; 3 - între 50 și 75%; 4 - între 75 și 99%; 5 - peste 99%. Intensitatea medie a sporulării a fost calculată ca medie ponderată pe fiecare repetiție, conform formulei (2) de mai jos:

$$I = \frac{\sum_{i=1}^n n_i p_i}{\sum_{i=1}^n p_i} \quad (2)$$

unde: n_i , sunt notele conform scării de mai sus, iar p_i sunt ponderile procentuale din total note ale fiecărei note.

Datele au fost prelucrate statistic prin analiza variantei (Statistica 10, StatSoft).

Rezultatele experimentului sunt prezentate în tabelul 4. Aceste rezultate dovedesc o capacitate semnificativă a tulpinii *T. harzianum* Td50b de a inhiba sporularea ciupercii microscopice fitopatogene *B. cinerea* pe resturi vegetale de trandafir.

Tabelul 4

Influența tratamentului cu suspensie de spori T. harzianum Td50b asupra sporulării fitopatogenului B. cinerea pe resturi vegetale de trandafir

Variantă	Intensitatea medie a sporulării pe frunze	Intensitatea medie a sporulării pe petale
V ₁ - martor inoculat cu <i>B. cinerea</i> și netratat ulterior	3,25 a	4,12 a
V ₂ - martor inoculat cu <i>B. cinerea</i> și tratat ulterior cu tampon fosfat salin steril	3,62 a	4,37 a
V ₃ - inoculat cu <i>B. cinerea</i> și tratat cu <i>T. harzianum</i> Td50b 104 spori/ml	0,88 b	1,37 b
V ₄ - inoculat cu <i>B. cinerea</i> și tratat cu <i>T. harzianum</i> Td50b 104 spori/ml	0,75 a	1,12 a
DL5%	0,88	0,75

a, b - Valorile urmate de aceeași cifră nu diferă semnificativ pentru $P > 0,05$.

Acest antagonism pronunțat *in situ* are semnificație practică, prezența antagonistului Td50b reducând formarea inoculului primar de *B. cinerea* din resturile vegetale infectate de trandafir și, implicit, ciclul de dezvoltare al putregaiului cenușiu al trandafirului.

Exemplul 3

Tulpina *T. harzianum* Td50b a fost testată din punct de vedere al capacității antagoniste *in vivo*, pentru protecția plantelor ornamentale împotriva agenților fitopatogeni de sol. Semințe de mușcată hibridă (*Peiargonium x hortorum*) „Moulin Rouge” au fost însămânțate pe 18 aprilie, pentru a obține plantele stoc, din care s-au obținut prin butășire, la începutul lunii septembrie, plantele pentru experimente. Butășii au fost plasați în cameră umedă în vermiculit, pentru a stimula dezvoltarea rădăcinilor. După trei săptămâni, butășii uniformi ca dezvoltare a rădăcinilor și tulpinii au fost plantați în ghivece de plastic de 15 cm, conținând un substrat de creștere îmbogățit cu nutrienți pentru primele săptămâni de creștere (Canna Terra Professional Plus, Canna International BV, Oosterhout, Olanda). Ghivecele au fost menținute în condiții de seră, la $22 \pm 2^\circ\text{C}$ în timpul zilei, și $17 \pm 2^\circ\text{C}$ în timpul nopții, cu

RO 128889 B1

o fotoperioadă de 12 h, suplimentată cu lumină cu intensitatea de 160 mE/m²/s, provenită din lămpi cu halogen, atunci când intensitatea luminoasă scădea sub 500 mE/m²/s. Substratul conținea rezerve de nutrienți inițiale, astfel încât plantele au fost fertilizate numai după trei săptămâni de creștere, prin aplicarea a 100 ml de soluție nutritivă 1 g/l de îngrășământ 20-8-20 (N-P₂O₅-K₂O, Eurofertil, TimacAgro România).

Experimentul de testare *in vitro* a inclus următoarele variante:

V₁ - martor neinoculat (cu fitopatogen sau Td50b);

V₂ - martor inoculat cu *T. harzianum* Td50b, 10⁴ spori/ml, la 4 săptămâni de la transplantare;

V₃ - martor inoculat cu *P. ultimum*, DSM 62987, 10⁶ propagule/ml, la 8 săptămâni după transplantare;

V₄ - martor inoculat cu *T. harzianum* Td50b, 10⁴ spori/ml, la 4 săptămâni de la transplantare, și cu *Pythium ultimum*, DSM 62987, 10⁶ propagule/ml, la 8 săptămâni după transplantare.

Fiecare variantă a inclus 12 ghivece, care au fost aranjate în blocuri de câte trei per repetiție, într-o schemă randomizată de tip pătrat latin, 4 variante în 4 repetiții.

La 4 săptămâni de la transplantarea butașilor în sol au fost inoculate variantele V₂ și V₄ cu câte 50 ml de tampon fosfat steril, 0,1 M, pH de 7,2, conținând 10⁴ ufc/ml spori de *T. harzianum* Td50b. Tulpina antagonistă a fost cultivată pe plăci Roux conținând mediu cartof - glucoză - agar, timp de 7 zile. Sporii formați au fost reluați în tampon fosfat steril, 0,1 M, pH de 7,2. Normalizarea numărului de propagule a fost făcută prin numărare la cameră de numărare. Celelalte variante, V₁ și V₃, au fost tratate cu câte 50 ml tampon fosfat steril, 0,1 M, pH de 7,2.

La 8 săptămâni de la transplantarea butașilor au fost inoculate variantele V₃ și V₄ cu *Pythium ultimum*. Întrucât la temperatura camerei *P. ultimum* nu produce zoospori (**Van der Plaats-Niterink, 1981, Monograph of the genus Pythium. Institute of the Royal Netherlands Academy of Sciences and Letters, Baarn, Olanda, pp. 164-167**), suspensia de propagule de *P. ultimum* a fost realizată din hife și oospori, fiind preparată prin cultivare pe mediu lichid (erlenmeyer-e de 250 ml) care conțineau 100 ml de mediu lichid cartof - glucoză, incubat pe un agitator rotativ, la 150 rot/min, timp de 7 zile la 24°C. Numărul de propagule a fost determinat prin numărare la cameră de numărare, aducându-se la 10⁶ ufc/ml în mediu lichid cartof - glucoză.

La 4 săptămâni de la infecția cu *P. ultimum*, respectiv, 12 săptămâni de la butășire, a fost cântărită masa proaspătă și cea uscată a rădăcinilor și a părților aeriene (tulpini și frunze) ale plantelor de mușcată. Datele au fost prelucrate statistic prin analiza variantei (Statistica 10, StatSoft).

Rezultatele sunt prezentate în tabelul 5, și demonstrează atât existența unui antagonism al tulpinii *Trichoderma harzianum* Td50b față de *P. ultimum*, cât și capacitatea acestei tulpini de a determina o stimulare a creșterii plantelor de mușcată, în condițiile experimentale date.

Tabelul 5

Efectul tratamentelor cu T. harzianum Td50b asupra dezvoltării bolii produse de P. ultimum la mușcate și asupra creșterii plantelor de mușcată

Variantă experimentală	Masă rădăcină, g		Masă tulpină, g	
	proaspătă	uscată	proaspătă	uscată
V ₁ - martor neinoculat	13,04 b	1,74 b	107,16 c	14,83 bc
V ₂ - <i>T. harzianum</i> Td50b, 10 ⁴ spori/ml	16,24 a	2,85 a	127,42 a	17,12 a

Tabelul 5 (continuare)

Variantă experimentală	Masă rădăcină, g		Masă tulpină, g	
	proaspătă	uscată	proaspătă	uscată
V ₃ - <i>P. ultimum</i> , DSM 62987, 10 ⁶ propagule/ml	10,62 c	1,25 c	105,74 c	14,24 c
V ₄ - <i>T. harzianum</i> Td50b, 10 ⁴ spori/ml <i>P. ultimum</i> , DSM 62987, 10 ⁶ propagule/ml	14,08 ab	2,34 a	116,41 b	16,35 ab
DL 5%	1,72	0,35	9,24	1,07

Un alt experiment a avut ca scop determinarea capacității tulpinii Td50b de a proteja răsadurile de plante ornamentale de căderea plantulelor produsă de *Rhizoctonia solanii*.

Inoculul de *Rhizoctonia solanii* ATCC 66873, grup de anastomoză AG4, a fost cultivat pe tărâțe de grâu timp de 10 zile. Tărâțele de grâu au fost sitate pentru a obține fracția de 0,25...0, 5 mm, spălate cu apă distilată, repartizate în plăci Roux și sterilizate, repetat de două ori, prin autoclavare la 121°C, timp de 30 min. Tărâțele au fost distribuite câte 100 g în plăci Roux de 450 ml, umectate cu câte 50 ml tampon fosfat steril, 0,1 M, pH 7,2, și inoculate cu 1 ml suspensie de 10⁶ propagule/ml obținute din culturi pe mediu agarizat.

Substratul de creștere pentru plantele ornamentale a fost reprezentat de substratul Potground H70 (Klasmann - Delimann, Geeste, Germania), cu pH 6,0, care conține 25% turbă blondă 0...7 mm, 75% turbă neagră și 1,5 g/l îngrășământ complex NPK, destinat producerii de răsaduri de legume și flori.

Creșterea răsadurilor de flori ornamentale s-a realizat în tăvițe alveolare cu 32 de alveole (model EPE 32, Marcoser, Matca, Galați, România), care aveau un volum de 102 ml pentru fiecare alveolă.

Plantele ornamentale folosite pentru experiment au fost panseluțele (*Viola x wittrockiana* cv. Berna), petuniile (*Petunia x hybrida* ev. Colour parade F1), creasta cocoșului (*Celosia cristata*, ev. Orange).

Substratul de creștere a fost amestecat cu tărâțe infectate, în raport de 0,25% v/v; 7 ml din acest amestec inoculat a fost distribuit în alveolele fiecărei tăvițe, iar peste acest substrat infectat cu *Rhizoctonia solanii* au fost depuși câte 68 ml de substrat de creștere sterilizat prin iradiere gamma. În cazul variantei martor neinoculat, substratul de creștere a fost amestecat cu tărâțe de grâu sterilizate prin autoclavare și umectate cu tampon fosfat steril, 0,1 M, pH de 7,2.

Tratamentele împotriva căderii plantulelor s-au efectuat cu o suspensie de *T. harzianum* Td50b, și cu un produs standard chimic, propamocarb condiționat (Previcur 607 SL, Bayer Crop Science, 607 g ingredient activ per litru). Tulpina Td50b a fost aplicată ca suspensie 10⁴ spori în tampon fosfat steril, 0,1 M, pH 7,2, câte 3,25 ml pentru fiecare alveolă (corespunzând unei doze de 10³ spori/g de substrat). Propamocarbul condiționat a fost diluat 1% în apă deionizată, iar din această soluție s-au aplicat câte 3 ml per alveolă cu diametru de 6,2 cm, corespunzând unei doze recomandate de 10 ml produs condiționat per metru pătrat de sol pentru răsaduri. Martorul neinoculat și varianta netratată cu produse împotriva căderii plantulelor au fost tratate cu câte 3,25 ml tampon fosfat steril, 0,1 M, pH 7,2.

În fiecare alveolă au fost introduse semințe din plantele ornamentale deja precizate. Plantulele au fost menținute în condiții de seră, la 22±2°C în timpul zilei, și 17±2°C în timpul nopții, cu o fotoperioadă de 12 h, suplimentată cu lumină cu intensitatea de 160 mE/m²/s,

RO 128889 B1

provenită din lămpi cu halogen, atunci când intensitatea luminoasă scădea sub 500 mE/m²/s. Substratul conținea rezerve de nutrienți inițiale, astfel încât plantele au fost fertilizate numai după două săptămâni de creștere, prin aplicarea a 100 ml de soluție nutritivă 1 g/l de îngrășământ 20-8-20 (N-P₂O₅-K₂O, Eurofertil, TimacAgro România).

Fiecare variantă, V₁ - martor neinfestat; V₂ - variantă infestată cu *R. solanii* și netratată cu produse împotriva căderii plantulelor; V₃ - tratament cu produs chimic; V₄ - tratament cu *T. harzianum* Td50b, a fost realizată în 4 repetiții, fiecare repetiție fiind reprezentată de o tavă cu alveole. Tavile cu alveole au fost aranjate în bloc randomizat în seră, plantele gazdă fiind randomizate între blocuri, iar diferitele tratamente, în cadrul sub-blocurilor plantă gazdă.

La 3 săptămâni de la semănarea plantelor, a fost determinată rata de supraviețuire a răsadurilor de plante ornamentale. Datele au fost prelucrate statistic prin analiza variantei (Statistica 10, StatSoft).

Rezultatele sunt prezentate în tabelul 6, și arată o eficacitate ridicată a tulpinii Td50b în protecția față de căderea plantulelor determinată de *R. solanii* AG-4, similară cu cea a produsului chimic.

Tabelul 6

Influența tratamentelor cu *T. harzianum* Td50 asupra supraviețuirii plantulelor de plante ornamentale crescute pe substraturi inoculate cu *R. solanii* Ag

Varianta experimentală	Număr mediu plante per tavă cu 32 alveole:		
	<i>Viola x wittrockiana</i>	<i>Petunia x hybrida</i>	<i>Celosia cristata</i>
Martor neinoculat cu <i>R. solanii</i> AG-4 și netratat	24,25	25,75	25,5
Martor inoculat cu <i>R. solanii</i> AG-4 și netratat	4,0	6,5	9,25
Propamocarb, echiv. 10 ml p/c per m ²	19,5	20,25	22,5
<i>T. harzianum</i> Td50b, 10 ³ spori/g substrat	18,5	20,5	20,25
DL5%	8,25	7,5	7,5

Exemplul 4

Tulpina *T. harzianum* Td50b a fost multiplicată și inclusă într-o compoziție care să-i faciliteze colonizarea substratului de compostare. Multiplicarea s-a realizat pe un mediu industrial pe bază de zer. În zerul dulce, obținut de la fabricarea cașului, s-a determinat substanța uscată refractometric, s-a diluat până la 3% substanță uscată din zer cu apă deionizată, și apoi s-au adăugat 1,5% borhot de porumb de la fabricarea etanolului (masă/volum); 0,5% KH₂PO₄, (masă/volum); 0,5% (NH₄)₂SO₄ (masă/volum). S-au distribuit câte 100 ml în flacoane erlenmeyer de 500 ml, închise cu dop de vată, s-au sterilizat la 121°C timp de 25 min, după care s-au inoculat aseptice cu 5 ml de suspensie conținând 10⁷ spori/ml, și s-a incubat pentru 5 zile la 25°C, pe masă rotativă, 150 rot/min. Câte 10 ml de suspensie au fost utilizați pentru a inocula pungile de polipropilenă care conțineau câte 100 g rumeguș de brad umectat cu 50 ml de apă deionizată. Pungile de polipropilenă cu rumeguș umectat au fost în prealabil sterilizate la 121°C, timp de 25 min.

După inoculare, s-a incubat timp de 7 zile la cameră climatică (Model SGC 120 LED, Weiss Gallenkamp, Loughborough, Marea Britanie), unde au fost menținute la 60 μmol fotoni/m²/s, cu o fotoperioadă de 12 h, la 25°C și 70% umiditate. După 7 zile pungile au fost iluminate timp de 15 min cu lumină albastră 440...460 nm, 60 μmol fotoni/m²/s, iar apoi pungile au fost incubate la întuneric și la 25°C, timp de alte trei zile.

RO 12889 B1

1 Biomasa de *T. harzianum* amestecată cu rumeguș parțial degradat s-a malaxat în
raport de 1:1 cu o suspensie conținând 10% făină, 10% amestec de esteri etilici ai acizilor
3 grași, lecitină, săpun de potasiu, glicerină, lipide din ulei de rapiță și 4% alcool polivinilic
(26-88, pulbere EMPROVE®, Merck, Darmstadt, Germania). Pasta rezultată a fost extrudată
5 pe o mașină de făcut paste (Model TR95A, Helco, Craiova, România), iar tăiței rezultati au
7 fost granulați pe un echipament de sferonizare (model Spheronis R-250m Grabler, Ettlingen,
Germania). Granulele rezultate au fost uscate într-un uscător în pat fluid (Model TC20,
Retsch, Germania), la o temperatură maximă de 37°C.

9 Amestecul de esteri etilici ai acizilor grași, lecitină, săpun de potasiu, glicerină, lipide
nesaponificabile din ulei de rapiță s-a obținut conform procedurii descris în continuare.
11 1000 g de ulei degumat de rapiță, cu caracteristicile prezentate în tabelul 7, a fost adus într-o
autoclavă de 2 l din oțel inox, cu sistem de agitare și de încălzire, sub atmosferă protectoare
13 de azot.

Tabelul 7

Caracteristicile uleiului degumat de rapiță folosit

17	Apă și compuși volatili	% m/m	0,4
	Substanțe nesaponificabile	% m/m	1,4
19	Acizi grași liberi	% m/m	1,9
	Index de saponificare	mg KOH/g	169,5
21	Compoziția medie în acizi grași (% w/w): C16: 2,4; C18: 1,2 ; C18-1: 16,1; C18-2: 24,5; C18-3: 23 7,3; C20-1: 7,3; C22-1: 42,4		

25 S-au dizolvat 25 g de hidroxid de potasiu de puritate 98% în 210 g de etanol cu 0,3%
apă, iar soluția rezultată a fost adăugată în autoclav, peste uleiul degumat de rapiță. Se por-
nește agitarea și încălzirea la 40°C. După un timp de reacție de 8 h, masa de reacție s-a răcit
27 la temperatura camerei. S-au colectat 1225 g de masă transparentă de reacție (R1). 500 g
de produs P1 s-a tratat cu acid oleic tehnic, obținându-se un produs cu următoarea com-
29 poziție: (% m/m): esteri etilici de acizi grași (FAEE) 74,5; trigliceride 5,9; glicerol 7,1; săpun
de potasiu 11,4 și apă 1,1. 140 g din produsul de reacție (P1) a fost tratat prin agitare vigo-
31 roasă cu 60 g emulsifiant lecitină de soia lichidă, obținându-se un amestec cu următoarea
compoziție: (% m/m): esteri etilici de acizi grași (FAEE) 48,7; grăsimi nereacționate din ulei
33 de rapiță 4; glicerol 4,5; săpun de potasiu 7,5; lecitină 34,6 și apă 0,7. Acest amestec a fost
folosit pentru obținerea compoziției cu eliberare controlată, conținând *T. harzianum* Td50b.

35 Compoziția cu eliberare controlată, pe baza tulpinii *T. harzianum* Td50b, rezultată,
este alcătuită din 60 părți rumeguș de lemn parțial hidrolizat, 10 părți făină, 4,8 părți esteri
37 etilici ai acizilor grași, 4 părți alcool polivinilic, 3,5 părți lecitină, 0,75 părți săpun de potasiu,
0,45 părți glicerol, 0,4 părți grăsimi din ulei de rapiță, restul până la 100 părți apă, și minimum
39 10⁶ ufc/g *T. harzianum* Td50b.

41 Numărul de spori de *T. harzianum* Td50 din compoziția de mai sus a fost determinat
prin extragere în tampon fosfat salin, diluții seriale și cultivare pe mediul selectiv propus de
William et al., 2003, prezentat în detaliu în exemplul 1.

43 Compoziția a fost testată din punct de vedere al acțiunii de accelerare a vitezei de
degradare a materialului vegetal. Materialul vegetal (scoarță de brad) a fost măcinat și trecut
45 pe sita de 0,250 mm. Din pulberea măcinată s-au luat câte 10 g care s-au adus în flacon
erlenmayer de 50 ml împreună cu 20 ml apă distilată. S-a omogenizat prin agitare și s-a
47 tratat apoi cu 1 ml de suspensie de *T. harzianum* Td50b conținând 10⁶ spori/ml sau, respec-
49 tiv, cu 1 g de compoziție conform exemplului. Toate variantele s-au lucrat în 5 repetiții, iar
flacoanele erlenmeyer au fost menținut la temperatura camerei timp de 7 zile.

RO 128889 B1

După incubare, amestecul a fost trecut într-un vas de respirație Strathox (Strathkelvin Instruments Limited, Glasgow, Marea Britanie). S-au efectuat în paralel determinările de respirație/consum de oxigen timp de 12 h.

După efectuarea determinărilor de respirație, s-a prelevat câte 1 g de probe de material, care au fost extrase cu 1 ml clorură de metilen timp de 20 min. 0,45 ml din extract au fost trecuți într-un flacon de filtrare într-o singură etapă, cu membrană filtrantă de 0,2 μm din nailon (Thomson Instrument Company, Oceanside, CA, SUA), iar din filtrat s-a determinat 6-PP gaz-cromatografic, conform metodei prezentate deja.

Probele au fost analizate comparativ cu un martor fără inocul de *Trichoderma*, care a fost tratat numai cu apă sterilă și incubat la temperatura camerei, în aceleași condiții experimentale. Datele au fost prelucrate statistic prin analiza variantei (Statistica 10, StatSoft).

Rezultatele sunt prezentate în tabelul 8. Aceste rezultate demonstrează o capacitate ridicată de degradare a materialului vegetal de către tulpina Td50, care este semnificativ influențată de includerea acestei tulpini în compoziția realizată conform exemplului.

Tabelul 8

Degradarea scoarței de brad de către tulpina *T. harzianum* Td50b și acumularea de 6-pentil- α -pironă în mediu

VARIANTĂ	Respirație (mg/l O ₂ consumați, medie orară)	6-PP (Mg/g material)
<i>T. harzianum</i> Td50b suspensie 10 ⁶ spori/ml	1,06 ± 0,32 b	152 ± 23 b
Compoziție cf. ex 4 cu <i>T. harzianum</i> Td50b 10 ⁶ spori/g	1,68 ± 0,22 a	273 ± 32 a
Martor netratat cu <i>Trichoderma</i>	0,52 ± 0,14 c	ND

Valorile urmate de aceeași literă nu diferă semnificativ pentru P > 0,05. ND - nedetectabil.

Exemplul 5

Compoziția realizată conform exemplului 4 de mai sus a fost utilizată pentru obținerea de compost supresiv din coajă de brad, iar acest compost a fost testat din punct de vedere al protecției plantelor ornamentale față de unele boli produse de agenți fitopatogeni. 10 kg de coajă de brad măcinată grosier au fost trecute în ligheane de plastic de 30 l, și au fost tratate cu 100 ml *T. harzianum* Td50b suspensie 10⁶ spori/ml, sau cu compoziție conform exemplului 4, cu *T. harzianum* Td50b 10⁶ spori/g. S-a umectat cu 10 l de soluție 2% (m/v) îngrășământ complex NP 20-20 în apă de robinet, conținând 4 g N și 4 g P₂O₅, și s-a omogenizat. S-a lucrat față de un martor tratat cu 100 ml apă sterilă, fiecare variantă în 4 repetiții. S-a menținut la temperatura camerei timp de 90 zile, în zilele 22, 44 și 66 efectuându-se analize ale conținutului de celuloză, lignină și 6-PP. Celuloza a fost determinată după delipidizarea substratului prin extracție la Soxhlet cu benzen, tratare repetată cu o soluție alcalină de carbonat de sodiu, pentru îndepărtarea hemicelulozelor, hidroliză cu acid sulfuric, neutralizare cu hidroxid de sodiu și determinarea glucidelor reducătoare cu reactiv DNS. Lignina a fost determinată gravimetric din probe, după extracții repetate la reflux, cu soluții de acid sulfuric, ale materialului delipidizat. 6-PP a fost determinată gaz-cromatografic, după extragere în clorură de metilen, așa cum a fost deja prezentat.

RO 12889 B1

Toate experimentele au fost realizate în 4 repetiții, iar datele au fost prelucrate statistic prin analiza variantei (Statistica 10, StatSoft). Rezultatele sunt prezentate în tabelul 9 și demonstrează faptul că tratamentul cu tulpina Td50b accelerează descompunerea materialului vegetal, iar compoziția conform brevetului facilitează acest proces de accelerare a degradării materialului vegetal. Nivelul de 6-PP se stabilizează la valori apropiate în cazul ambelor tratamente la care s-a aplicat tulpina de *T. harzianum* Td50b, datorită volatilității compusului odorant.

Tabelul 9

Accelerarea degradării scoarței de brad din substratul de compostare de către tulpina *T. harzianum* Td50b și acumularea de 6-pentil- α -pironă în material

Variantă	Conținut celuloză (%)			Conținut lignină (%)			Conținut 6-PP ($\mu\text{g/g}$ material)		
	22 z	44 z	66 z	22 z	44 z	66 z	22 z	44 z	66 z
<i>T. harzianum</i> Td50b suspensie 10^6 spori/ml									
Compoziție cf. ex 4 cu <i>T. harzianum</i> Td50b 10^6 spori/g	37,52	30,23	25,47	27,15	24,63	23,27	143	154	128
Martor netratat cu <i>Trichoderma</i>	35,61	28,74	23,12	26,03	24,02	22,83	181	173	148
	39,62	33,51	28,72	28,22	26,17	24,43	ND	12	ND

Valorile urmate de aceeași literă nu diferă semnificativ pentru $P > 0,05$. ND - nedetectabil.

Compostul rezultat a fost folosit pentru tratamentul plantelor de trandafir împotriva atacului de Botrytis. Plantele de trandafir (*Rosa hybrida* cv. Sonia) s-au obținut prin butășire, în ghivece cu substrat Potground H70 (Klasmann - Delimann, Geeste, Germania), cu pH de 6,0, care conține 25% turbă blondă 0...7 mm, 75% turbă neagră și 1,5 g/l îngrășământ complex NPK. Plantele s-au înrădăcinat timp de 14 zile în condiții de umiditate crescută, obținute prin acoperirea ghivecelor cu folie de plastic. La 5 săptămâni de la plantare s-a procedat la tăierea plantelor înrădăcinate cu o foarfecă de grădină, la o înălțime de 7 cm.

Plantele au fost menținute în condiții de seră, la $22\pm 2^\circ\text{C}$ în timpul zilei și $17\pm 2^\circ\text{C}$ în timpul nopții, cu o fotoperioadă de 12 h, suplimentată cu lumină cu intensitatea de $160 \text{ mcE/m}^2/\text{s}$, provenită din lămpi cu halogen, atunci când intensitatea luminoasă scădea sub $500 \text{ mcE/m}^2/\text{s}$. Substratul conținea rezerve de nutrienți inițiali, astfel încât plantele au fost fertilizate numai după o săptămână de la finalizarea înrădăcinării, prin aplicarea a 50 ml de soluție nutritivă 1 g/l de îngrășământ 20-8-20 (N-P₂O₅-K₂O, Eurofertil, TimacAgro România) pe fiecare ghiveci.

După înrădăcinare, plantele au fost repartizate în blocuri experimentale, conform variantelor experimentale de mai jos:

V₁ - martor netratat, neinoculat;

V₂ - martor netratat, inoculat cu *B. cinerea* 10^6 spori/ml;

V₃ - martor tratat cu chlorotalonil (standard chimic), inoculat cu *B. cinerea* 10^6 spori/ml;

V₄ - compost coajă de brad, netratat cu *Trichoderma*, aplicat ca mulci după înrădăcinare; inoculat cu *B. cinerea* 10^6 spori/ml;

V₅ - compost coajă de brad, format după tratare cu *T. harzianum* Td50b suspensie 10^6 spori/ml, aplicat ca mulci după înrădăcinare, inoculat cu *B. cinerea* 10^6 spori/ml;

V₆ - compost coajă de brad, format după tratare cu compoziție conform exemplului 4 cu *T. harzianum* Td50b 10⁶ spori/g, aplicat ca mulci după înrădăcinare, inoculat cu *B. cinerea* 10⁶ spori/ml.

Compostul obținut din coajă de brad, cu sau fără aplicarea tulpinii Td50b, a fost aplicat ca mulci la suprafața ghivecelor, în strat de circa 2,5 cm, imediat după terminarea înrădăcinării butașilor. Tratamentul cu produs chimic s-a realizat prin stropire, la acoperire, la tăiere și după 7 zile, cu o soluție obținută prin diluarea a 2,5 ml produs condiționat (Bravo 500 SC, Syngenta Crop Protection, Basel, Elveția) în 1 l de apă. Inocularea cu spori de *B. cinerea* s-a realizat în a 2-a zi de la tăiere, după creșterea umidității în seră la 80%. *Botrytis cinerea* DSM 5144 a fost cultivată pe mediu cartof-glucoză-agar în plăci Petri Ø 9 cm. Suspensia de spori a fost realizată prin inundarea gazonului de *Botrytis*, cultivat 10 zile la 25°C, 70% umiditate, și la 60 μmol fotoni/m²/s, cu o fotoperioadă de 12 h, cu 5 ml soluție de tampon fosfat steril, conținând Tween 20 0,04%, și eliberarea sporilor din coloniile cu o ansă Drigalsky. Suspensia de spori a fost normalizată la 10⁶ spori/ml, prin numărare la camera de numărare. Pe fiecare plantă au fost aplicați prin stropire câte 2 ml suspensie spori, folosindu-se un atomizor de sticlă cu dop metalic și pară de cauciuc (model 15-RD, DeVilbiss Healthcare).

La 2 săptămâni de la aplicarea inoculării cu *B. cinerea* s-a determinat frecvența atacului pe frunze, numărul total de frunze per plantă și procentul de frunze ofilite. Toate experimentele au fost realizate în 4 repetiții, iar datele au fost prelucrate statistic prin analiza variantei (Statistica 10, StatSoft).

În tabelul 10 sunt prezentate rezultatele obținute în cadrul acestui experiment. Aceste rezultate demonstrează faptul că în compostul format sub acțiunea ciupercii antagoniste *T. harzianum* Td50b se formează compuși, inclusiv din categoria odoranților volatili, ce reduc atacul de *B. cinerea* pe părțile aeriene ale plantelor de trandafiri, cel mai probabil prin activarea răspunsului de apărare din plante. Compostul din coajă de brad, format sub acțiunea ciupercii antagoniste *T. harzianum* Td50b, eliberează și nutrienți și alți compuși biologic activi, care susțin și stimulează creșterea plantelor de trandafir.

Tabelul 10

Efectul diferitelor tratamente, inclusiv prin aplicarea ca mulci a compostului de coajă de brad obținut cu T. harzianum Td50b, asupra frecvenței atacului de B. cinerea, numărului total de frunze per plantă și a procentului de frunze ofilite

Variantă experimentală	Frecvența atacului (%)	Număr total frunze per plantă	Procent frunze ofilite (%)
Martor netratat, neinoculat	14,8 ± 6,7 ab	11,5 ± 1,5 b	21,53 ± 1,52
<i>B. cinerea</i> 10 ⁶ spori/ml	74,3 ± 9,7 c	8,5 ± 1,5 c	69,04 ± 2,38
Chlorotalonil (0,25% p.c.) <i>B. cinerea</i> 10 ⁶ spori/ml	12,1 ± 4,3 a	13 ± 2 ab	19,09 ± 0,91
Mulci compost coajă de brad, <i>B. cinerea</i> 10 ⁶ spori/ml	59,6 ± 11,3 c	10,5 ± 11,5	49,94 ± 1,52
Mulci compost coajă de brad, format după tratare cu <i>T. harzianum</i> Td50b suspensie 10 ⁶ spori/ml, <i>B. cinerea</i> 10 ⁶ spori/ml	23,4 ± 5,7 b	12,5 ± 2,5	28,33 ± 1,66
Mulci compost coajă de brad, format după tratare cu compoziție cf. ex 4, <i>B. cinerea</i> 10 ⁶ spori/ml	16,5 ± 7,8 ab	14,5 ± 1,5	17,06 ± 1,68

Valorile urmate de aceeași literă nu diferă semnificativ pentru P>0,05.

Revendicări

1

3

5

7

9

11

13

15

17

19

21

23

1. Tulpină de *Trichoderma harzianum* Td50b NCAIM (P) F 001412, **caracterizată prin aceea că** este selectată din izolate naturale prin următoarele etape: distribuirea aseptică a unui mediu agarizat, care conține, ca principală sursă de carbon, un derivat de celuloză, într-o placă cu 24 de godeuri; inocularea mediului agarizat cu 5 izolate de testat, distribuite randomizat, și menținerea unor godeuri martor neinoculate; acoperirea cu o folie de plastic sterilă, care permite schimbul de gaze; incubarea timp de 3 zile la 25°C; depunerea plăcii cu 24 de godeuri, în care s-au dezvoltat izolatele de testat, peste o altă placă cu 24 de godeuri cu mediu agarizat, în care a fost crescută timp de 2 zile o ciupercă microscopică, agent fitopatogen, față de care se testează antagonismul izolatelor; incubarea timp de 5 zile la 25°C a plăcilor reunite, cu placa cu mediu cu izolate de *Trichoderma* deasupra plăcii cu ciuperca fitopatogenă de testat, separate între ele de folia de plastic ce permite schimbul de gaze; determinarea creșterii ciupercii fitopatogene test prin analiza imaginii plăcii de microtitrare preluate de un sistem de fotodocumentare, și calcularea procentului de inhibiție cu ajutorul formulei: $(A_1 - A_n) / A_1 \times 100$, unde A_1 este suprafața acoperită de agentul fitopatogen în varianta martor netratat, iar A_n este suprafața acoperită de agentul fitopatogen în varianta în care a fost confruntat cu compușii volatili produși de unul dintre izolatele de testat; analiza statistică a rezultatelor prin analiza variantei și identificarea eventualelor izolate active, datorită producerii de compuși volatili; inundarea mediului agarizat pe care au crescut izolatele de *Trichoderma* cu o soluție de Roșu de Congo 0,1% și, după 5 min, înlăturarea soluției de roșu de Congo și spălarea cu o soluție NaCl 1 M pentru 20 min; evidențierea zonelor clare de celuloză în jurul coloniilor de *Trichoderma* producătoare de celuloză.

25

27

2. Compoziție cu eliberare controlată, pe baza tulpinii *Trichoderma harzianum* Td50b, **caracterizată prin aceea că** este alcătuită din 76 părți rumeguș de lemn parțial hidrolizat, 10 părți făină, 5,3 părți esteri etilici ai acizilor grași, 4 părți alcool polivinilic, 3,8 părți lecitină, 0,5 părți săpun de potasiu, 0,4 părți glicerol și min 10⁶ ufc/g *Trichoderma harzianum* Td50b.

