



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2015 00924**

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

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **27/11/2020** BOPI nr. **11/2020**

(41) Data publicării cererii:
30/05/2017 BOPI nr. **5/2017**

(73) Titular:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
CHIMIE ȘI PETROCHIMIE - ICECHIM,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.202,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **RĂUT IULIANA,
ALEEA BARAJUL BISTRIȚA NR.12, BL.4,
SC.1, ET.4, AP.54, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **SESAN TATIANA EUGENIA,
BD. IULIU MANIU NR.55, BL.17, SC.E, ET.9,
AP.208, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **OANCEA FLORIN, STR. PAȘCANI NR.5,
BL.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **DONI MIHAELA, BD. CAMIL RESSU
NR. 4, BL. 5, SC. C, AP. 115, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **ARSENE MELANIA LILIANA, STR. COZLA
NR.8, BL.A7, SC.4, AP.49, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **JECU MARIA-LUIZA,
STR.PICTOR OCTAV BĂNCILĂ NR.8,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **CALIN MARIANA,
STR. CETATEA DE BALTĂ NR. 41, BL. 07A,
SC. 2, AP. 91, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
RO 128889 B1; RO 131177 B1

(54) **CONSORȚIU DE TRICHODERMA CU ACȚIUNE
DE BIOSTIMULARE A PLANTELOR DE CULTURĂ**



RO 131827 B1

1 Prezența invenției se referă la un consorțiu de ciuperci microscopice din genul
2 *Trichoderma*, care au o acțiune de biostimulant pentru plantele de cultură, în special pentru
3 plantele nutraceutice.

4 Sunt cunoscute consorții/tulpini de *Trichoderma* care au o acțiune de biostimulant pentru
5 plante. În general tulpinile de *Trichoderma* cu utilizări în cultura plantelor au fost revendicate ca
6 biofungicide, datorită acțiunii lor de antagoniști/hiperparaziți. Biostimulanții pentru plante
7 modulează procesele naturale „pentru a spori absorbția și eficiența utilizării nutrienților, toleranța
8 la stresurile abiotice și calitatea recoltei” (www.biostimulants.eu).

9 Brevetul **US 8877481 B2** descrie utilizarea unor tulpini de *Trichoderma*, *Trichoderma*
10 *atroviride* WW10TC4 (număr de depozit ATCC PTA 9707), *Trichoderma harzianum* RR17Bc
11 (număr de depozit ATCC PTA 9708), *Trichoderma harzianum* F11 Bab (număr de depozit ATCC
12 PTA 9709), aplicate separat sau în combinații ale acestora, pentru: inducerea rezistenței
13 plantelor la stresuri biotice și abiotice; reducerea impactului negativ al azotatului în exces (emisii
14 de protoxid de azot din sol, levigarea ionilor azotați în acvifer și ape de suprafață) datorită
15 creșterii eficienței de utilizare a azotului de către plante; mărirea cantității de carbon sechestrat
16 din atmosferă datorită intensificării proceselor de fotosinteză în plantele a căror rizosferă este
17 colonizată de respectivele tulpini. Cererea de brevet **WO 2011032281 A1** se referă la tulpina
18 de *Trichoderma harzianum* TSTh20-1, depozitată cu numărul PTA-10317 la American Type
19 Culture Collection (ATCC), care are capacitatea de a stimula creșterea plantelor, în condiții de
20 stres abiotic determinate de prezența hidrocarburilor aromatice policiclice, a acizilor naftenici
21 și a pH-ului ridicat, specifice sterilului rămas după extragerea țigăii greu din nisipurile
22 bituminoase.

23 Brevetul **FR 2903419 B1** protejează tulpina depozitată sub numărul MUCL 45632 la
24 Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms (BCCM), care aparține speciei
25 *Trichoderma atroviride*, și care are acțiune de stimulare a germinației și creșterii plantelor.

26 Brevetul **EP 1990404 B1** prezintă tulpina *Trichoderma atroviride* AGR2 depusă la
27 Colecția Națională de Culturi de Microorganisme (CNCM) a Institutului Pasteur sub numărul
28 1-2738 și revendică utilizări ale acesteia ca stimulator radicular, al germinației și creșterii
29 plantelor.

30 Au fost realizate recent treceri în revistă ale tulpinilor/consorțiilor de *Trichoderma* cu
31 acțiune de biostimulare a plantelor de cultură (Lopez-Bucio et al. 2015, *Scientia*
32 *horticulturae*, 196, 109-123; Stewart și Hill în „*Biotechnology and Biology of*
33 *Trichoderma*”, Gupta et al. eds, Elsevier, Amsterdam, 2014, pp. 415-428).

34 Un dezavantaj al tulpinilor/consorțiilor deja descrise este determinat de faptul că ele
35 activează numai una din căile implicate în mecanismele de apărare din plante, de obicei calea
36 acidului salicilic/rezistența dobândită sistemic (Shoresh et al. 2010, *Annual review of*
37 *phytopathology*, 48, pp. 21-43).

38 Diferitele tipuri de răspunsuri de apărare sunt reglate de diferiți fitohormoni - acid salicilic
39 (SA), acid jasmonic (JA), etilena (ET) și acid abscisic (ABC) (Pieterse et al. 2012. *Annual*
40 *review of cell and developmental biology*, 28: pp. 489-521). În general, SA este asociat cu
41 rezistență la agenți patogeni biotrofi și la insectele care înțepă și sug, iar JA și ET/ABA sunt
42 asociate cu rezistență la agenți patogeni necrotrofi și, respectiv la insectele care rup și
43 amestecă. Căile SA/JA-ET-ABA sunt antagoniste/în disonanță, generând o balansare între
44 rezistență la biotrofi/insecte care înțepă și sug și necrotrofi/insecte care rup și mestecă.
45 Diferitele forme de stres abiotic (temperaturi extreme, radiație solară, agenți chimici pro-
46 oxidanți) intervin și ele în căile SA/JA-ET-ABA, în special prin modificarea nivelului speciilor
47 reactive de oxigen și azot, inclusiv a celui de oxid nitric (Xia et al 2015, *Journal of*

experimental botany, 66: pp. 2839-2856). Toată această rețea de interacțiuni pozitive și negative determină în anumite situații o creștere a susceptibilității plantelor față de factori de stres biotici controlați de altă cale decât cea care a fost activată (**Caarls et al. 2015, Frontiers in plant science, 6: p. 170**).

Datorită acestui antagonism dintre căile implicate în mecanismele de apărare din plante activarea sistemului defensiv de către tulpinile biostimulante de *Trichoderma* poate determina, concomitent cu creșterea rezistenței față de unii factori de stres biotic și abiotic, creșterea susceptibilității față de alți factori, la care calea de rezistență este în disonanță cu cea activată. (**Saldajeno et al. în „Biotechnology and Biology of Trichoderma”, Gupta et al. eds, Elsevier, Amsterdam, 2014, pp. 477-493**).

Autorii au stabilit că un consorțiu de tulpini de *Trichoderma* cu activitate de biostimulare a plantelor are capacitatea de a induce echilibrat căile de apărare datorită creșterii nivelului de siliciu biodisponibil în soluția solului.

Siliciul nu este încă considerat un element esențial pentru plante, ci doar unul cu efecte benefice (**Richmond și Sussman, 2003, Current Opinion in Plant Biology, 6: pp. 268-272**). Studiile recente au arătat că siliciul are toate caracteristicile unui biostimulant pentru plante (**Sawas și Ntatsi 2015, Scientia Horticulturae, 196: pp. 66-81**). Siliciul solubil este unul dintre pușinii elicitori care amorsează în mod echilibrat diferitele căi metabolice implicate în răspunsul de apărare din plante (**Van Bockhaven et al. 2013. Journal of Experimental Botany, 64: pp. 1281-1293**). Acțiunea siliciului solubil nu se limitează doar la orchestrarea căilor metabolice implicate în apărarea plantelor față de atacul patogenilor și al dăunătorilor, dar are efecte și de creștere a eficienței de utilizare a nutrienților; reducere a toxicității metalelor grele; limitare a efectelor stresului hidric (salin, secetă) și a stresului termic - îngheț, temperatură excesivă (**Liang et al. 2015, Silicon in Agriculture, Springer Netherlands, Dordrecht, p. 235**).

Siliciul este preluat de către rădăcinile plantelor ca acid ortosilicic, H_4SiO_4 , în concentrații cuprinse între 0,2 și 0,6 mM (**Epstein 1999, Annual Review of Plant Biology, 50: pp. 641-664**). Acidul ortosilicic este un acid foarte slab, cu patru funcțiuni acide, la care valoarea pKa cea mai mică este de 9,8 (**Iler, The Chemistry of Silica, John Wiley & Sons, New York, 1979, p. 207**). Aceasta înseamnă că la pH 9,8 acidul ortosilicic este prezent 50% în stare nedisociată și 50% în stare disociată. Între valorile de pH 2 și 8 acidul ortosilicic este o moleculă neutră, complet nedisociată. La concentrații mai mari de 2 mM începe să polimerizeze, prin reacții de policondensare, cu eliberare de apă (**McIntosh, 2012, Physical Chemistry Chemical Physics, 14: pp. 996-1013**).

În plante siliciul îndeplinește două funcții majore, una structurală și cealaltă fiziologică/biochimică (de biostimulant). Funcția structurală este asociată răspunsului inteligent al apoplastului (**Nishitani și Demura 2015, Plant and Cell Physiology, 56: pp. 177-179**) și implică, în cazul plantelor care acumulează siliciu, și formarea de fitolite cu rol analog unui endo-schelet (**Schoelynck et al. 2014, Journal of Vegetation Science, 25: pp. 301-313**). Această funcție structurală are și un rol de apărare împotriva atacului de boli și dăunători, generând diferite bariere care limitează pătrunderea fitopatogenilor și au un efect repelent asupra dăunătorilor. Funcția fiziologică, implicată în reglarea fină/orchestrarea căilor metabolice specifice răspunsului de apărare din plante, necesită transportul acidului ortosilicic (H_4SiO_4) prin simplast/citoplasmă și implică un sistem co-operat, prezent doar în rădăcini, format din acvaporine (proteine membranare care constituie canale pentru transportul facilitat al apei și al moleculelor mici, neutre/neionizate - nedisociate), din subfamilia NIP-26 (nodulin-26-like proteins), denumite și metaloido-porine (**Pommerrenig et al. 2015. Plant science, 238: pp. 212-22**), și proteine de transport activ/„pompe” moleculare de siliciu, care transferă acidul ortosilicic în xilem (**Ma și Yamaji 2015, Trends in Plant Science, 20: pp. 435-442**).

RO 131827 B1

1 Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a descrie un consorțiu *Trichoderma*
care au o acțiune de biostimulant pentru plantele de cultură, cu o amorsare echilibrată a
3 diferitele căi apărare, însoțită de activarea metabolismului secundar și de acumularea de
compuși bioactivi/fitonutrienți în plantele de cultură, în special în cele nutraceutice.

5 Consorțiul de *Trichoderma* conform invenției este constituit din tulpinile de *Trichoderma*
harzianum Td50b, depozitată cu numărul de depozit NCAIM (P) F 001412 la National Collection
7 of Agricultural and Industrial Microorganisms, Universitatea Corvinus din Budapesta, Ungaria,
și *Trichoderma asperelum* Td36b, depozitată sub numărul NCAIM (P) F 001434 la National
9 Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms, Budapesta, Ungaria care, aplicate
împreună, stimulează creșterea plantelor în faza de plantulă, măresc concentrația de siliciu
11 biodisponibil din soluția solului și favorizează acumularea compușilor biologic activi în culturile
nutraceutice de *Passiflora incarnata* și *Momordica charantia*.

13 Consorțiul este are activitatea optimă la o rată inițială de amestecare a tulpinilor de
Trichoderma de 1:1, raportat la numărul de unități formatoare de colonii per mililitru de
15 suspensie.

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

Exemplul 1

19 Se realizează un amestec de tulpini de *Trichoderma harzianum* Td50b și *Trichoderma*
asperelum Td36b, suspensii conidiale prelevate din gazon crescut 5 zile pe mediu cartof-
21 glucoză agar, normalizate la 10^7 ufc/ml, în raport de 1:1.

23 Tulpina de *Trichoderma harzianum* Rifai, Td50b, depozitată cu numărul de depozit
NCAIM (P) F 001412 la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms,
Universitatea Corvinus din Budapesta, Ungaria, a fost izolată dintr-o probă de compost de coajă
25 de brad provenită de la Ștefănești, Argeș. Izolatele au fost obținute folosind mediul selectiv
propus de William et al., 2003 (Appl. Environ. Microbiol., 69: 4190-4191), care conține 0,2 g
27 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 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 Sigma, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, SUA), 3 g glucoza, 20 g agar în 950 ml apă dis-
29 tilată, la care se adaugă după sterilizare (prin autoclavare la 121°C pentru 20 min) ingrediente
care-i conferă specificitatea. Ingredientele antimicrobiene care-i conferă specificitatea utilizate
31 (exprimate per litru de mediu) au fost: 0,25 g cloramfenicol (C0378 Sigma-Aldrich), 9 ml de
soluție stoc de streptomycină (1% masă/volum, S6501 Sigma-Aldrich), 0,2 g pentacloronitro-
33 benzen (quintozene, P2205 Sigma-Aldrich) și 1,5 ml propamocarb condiționat (Previcur 607 SL,
Bayer Crop Science, Monheim am Rhein, Germania, 607 g ingredient activ per litru). Toate
35 aceste ingrediente s-au adus la 40 ml cu apă distilată sterilă, au fost sterilizate prin filtrare și
apoi s-au adăugat la mediul bazai răcit la limita de solidificare.

37 Încadrare taxonomică a tulpinii de *Trichoderma harzianum* Td50b este: *Filumul*
Ascomycota, Clasa *Sordariomycetes*, Ordinul *Hypocreales*, Familia *Hypocreaceae*, genul
39 *Trichoderma*.

Caracteristicile morfologice ale tulpinii Td50b sunt descrise mai jos.

41 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; reversul
43 coloniei necolorat; Conidiofori: ramificați piramidal, cu ramuri mai scurte spre apex; Fialide: în
grupuri de 2...4, destul de subțiri și adesea curbate, de (6)8-14(-20) X 2,4...3,0 μm;

45 Conidii subgloboase sau elipsoidale, de 3,6...4,5 μm în diametru cu pereții aspri;
Clamidosporii prezenți în miceliul culturilor mai vârstnice, intercalări și uneori terminali, cel mai
47 adesea globoși, hialini, cu pereții netezi.

RO 131827 B1

Caracteristicile fiziologice, de utilizare a diferitelor substraturi, sunt descrise în cele ce urmează.	1
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 (sucroză), glicerol;	3 5
Surse de azot: optime: DL-leucină, L-cistină, DL-citrulină, DL-nor-leucină, azotatul de amoniu, tartratul de amoniu; dezvoltare fungală moderată pe: L-arginină, L-leucină, glicocol, asparagină, riboflavină, sulfat de amoniu, carbonat de amoniu, fosfat monobazic; dezvoltare fungală slabă pe: triptofan, tirozină, D-serină, lizină, uree, azotați de sodiu, calciu și potasiu;	7 9
Caracteristici fizice de creștere și sporulare sunt:	11
- temperatura: temperatura optimă: 20...25°C; temperatura minimă: 2°C; temperatura maximă: 37°C;	13
- 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.	15
Identificarea realizată pe criterii morfologice a fost confirmată de analiza moleculară a ITS1 (internai 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 (conform protocol BarCode http://www.isth.info/methods). Secvențierea nucleotidică a fost realizată cu metoda Dye Terminator Cycle Sequencing, folosind un secvențiator automat de 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).	17 19 21
Tulpina Td50b este puternic antagonistă față de ciupercile fitopatogene: <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> (cerere de brevet EP 2735607 A1). Gradul de antagonism al tulpinii de <i>Trichoderma harzianum</i> Td50b față de ciupercile fitopatogene s-a determinat <i>in vitro</i> prin metoda culturilor duble (Coskuntuna și Ozer, 2008, Crop Protection, 27: 330-336).	23 25 27
Tulpina <i>Trichoderma asperelum</i> Td36b, depozitată sub numărul (P) F 001434 la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms (NCAIM) Budapesta, a fost izolată din litiera solului, prelevată din zona Păulești, Prahova, România. Pentru izolare s-a utilizat mediul de cultura apa-agar, iar pentru purificare mediul cartof, glucoza, agar (CGA).	29 31
Raza coloniilor dezvoltate de tulpina <i>T. asperelum</i> Td36b, pe mediu CGA după 72 h, la 30°C este de (7-) 54(-64) mm; la 35°C este de (0-)27(-42) mm, iar la 40°C: 0 mm. Coloniile formate pe mediu CGA la 25°C, după 40 h în întuneric, nu prezintă nici un pigment galben care să difuzeze în mediul agarizat. Coloniile cultivate pentru 72 h pe mediu CGA, la 30°C, în întuneric, formează până la 5 inele concentrice, cu o producție densă de conidii și fără miceliu aerian. Conidiile sunt înspre centru de culoare verde închisă, iar înspre margini sunt doar în curs de formare. Conidiile formate sunt verde închis, globuloase până la sub-globuloase sau ovoidale, cu dimensiuni de 4,0...5,0 (-6,0) x 2,5...3,0 μm. Conidioforii au un aspect simetric care se termină în două sau mai multe fialide, cu ramificări primare apărute lângă apex, frecvent împerechate și proiectate la aproape 90 de grade față de axa principală. Clamidosporii se formează abundent după incubare o săptămână la 20°C în întuneric, terminal și uneori intercalați, pe hifele imersate, fiind subglobuloși până la ovoidali, netezi, verzi pal. Fialidele sunt tipic produse în vârfurile ramificațiilor primare, secundare și terțiare, rareori direct pe lungimea ramificațiilor, tipic în verticiliu de 2 până la 4 fialide.	33 35 37 39 41 43 45

RO 131827 B1

1 Caracteristicile fiziologice, de utilizare a diferitelor substraturi, sunt descrise în cele ce
urmează. Monozaharidele determină o creștere mai bună decât dizaharidele, urmate de poli-
3 zaharide. Glicerina este puțin favorabilă pentru creșterea tulpinii Td36b. Dintre monozaharide,
riboza și fructoza s-au dovedit cele mai bune surse de carbon, observându-se o dezvoltare
5 optimă a tulpinii pe mediile care conțin aceste surse de carbon. Urmează glucoza, manita, D-
manoza, D-galactoza și arabinoza, care permit o dezvoltare moderată. Dintre dizaharide, cele
7 mai bune rezultate a dat maltoza, urmată de lactoză (dezvoltare moderată) și zaharoza (dezvol-
tare mai slabă). Dintre polizaharide, cele mai bune rezultate a dat celuloza, cu dezvoltare
9 optimă, urmată de amidon, pe mediile respective înregistrându-se dezvoltare moderată.
Sporularea a fost foarte bună în majoritatea variantelor (+++), bună în cazul zaharozei (++) și
11 mai slabă în cazul glicerinei (+).

Peptona, aminoacizii L-asparagină, L-valină, L-serină, L-cisteină și L-izoleucină,
13 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ și NaNO_2 s-au dovedit cele mai bune surse de azot, determinând o dezvoltare
optimă. Urmează în ordine descrescând azotații (NH_4NO_3 , NaNO_3), vitamina B12 și aminoacizii
15 L-alanină, L-lizină, L-arginină, L-triptofan care au determinat o dezvoltare moderată. Rezultate
mai slabe au avut ureea, NH_4Cl , KNO_3 , KNO_2 . Sporularea a fost foarte bună (+++) în
17 majoritatea variantelor, exceptând L-lizina, L-triptofanul, L-alanina, L-arginina și azotații, la care
sporularea a fost doar bună (++).

19 Temperaturile de creștere sunt: temperatura optimă: 22...25°C; temperatura minimă:
2°C; temperatură maximă: 37°C. Temperaturile între 10 și 18°C determină o creștere slabă a
21 tulpinii *Trichoderma asperellum* Td36b, fără sporulare la 48 h și cu sporulare slabă la 144 h (+).
Reacția substratului de cultură: pH optim: 4,0...5,5; dezvoltare slabă a ciupercii la valori de pH
23 de la 9,0 la 13,0.

Identificarea realizată pe criterii morfologice a fost confirmată de analiza moleculară a
25 ITS1 (internai 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 (conform pro-
27 tocol BarCode <http://www.isth.info/methods>). Compararea secvențelor s-a realizat cu programul
TrichoBlast (<http://www.isth.info/tools/blast/index.php>).

29 Tulpina *Trichoderma asperellum* Td36b este antagonistă față de *Fusarium graminearum*,
Rhizoctonia solarii, *Pythium ultimum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Verticillium daliae*, *Botrytis allii*,
31 inclusiv datorită producerii unor metaboliți volatili cu activitate anti-fugi fitopatogeni (Răut et al.
2014, Revista de Chimie 65: pp. 1285-1288).

33 A fost realizat un experiment prin care s-a urmărit biotestarea efectului stimulator a
5 tulpini de *Trichoderma*, și a consorțiului *Trichoderma harzianum* Td50b și *Trichoderma*
35 *asperellum* Td36b, asupra creșterii unor plantulelor test de tomate. Fiecare tulpină a reprezentat
o variantă experimentală. S-a realizat pentru comparare și o variantă martor. Fiecare variantă
37 experimentală a fost realizată în 4 repetiții, fiecare repetiție având 5 plante.

Semințele de tomate au fost dezinfectate în două etape. Prima dezinfecție a fost reali-
39 zată în etanol 70%, timp de 30 sec cu agitare la 60 rpm. După înlăturarea etanolului, semințele
au fost clătite de trei ori cu apă distilată sterilă. Cea de-a doua dezinfecție s-a făcut cu soluție
41 de hipoclorit de sodiu 4%, timp de 15 min. Ulterior au fost realizate clătiri cu apă distilată, din
25 în 25 de min, timp de 2 h. Semințele au fost inoculate prin imersie în 3 ml suspensie de pro-
43 pagule fungice, în concentrație de 10^6 ufc/ml în tampon fosfat cu 2% carboxi-metil-celuloză, și
apoi au fost depuse în pungi sterile de creștere Cyg (Mega International, Newport, MN, SUA).
45 Pe toată durata experimentului pungile au fost umectate zilnic cu o soluție nutritivă Hoagland
0,25%. Creșterea rădăcinuțelor plantulelor de tomate a fost analizată la 3 săptămâni.
47 Rezultatele sunt prezentate în tabelul 1, ca medie a trei determinări, analizate privind relevanța
statistică prin ANOVA.

Lungimea totala (mm) a rădăcinuțelor plantulelor de tomate la 3 săptămâni de la semănat 3

Varianta	Lungimea totală a rădăcinii (mm)	
Martor neinoculat	184,29	c
<i>T. atroviride</i> ATCC 74058	219,05	b
<i>T. asperellum</i> T47	187,5	c
<i>T. vinde</i> T49	200,86	bc
<i>T. harzianum</i> Td50b	214,38	b
<i>T. asperellum</i> Td36b	225,79	b
<i>T. harzianum</i> Td50b + <i>T. asperellum</i> Td36b	254,2	a

13

Rezultatele au evidențiat că atât tulpina Td36b, cât și tulpina Td50b, determină creșteri distinct semnificative ale rădăcinuțelor plantulelor test de tomate, comparativ cu martorul neinoculat. Consorțiul format din cele două tulpini are un efect de stimulare și mai pronunțat, cele două tulpini interacționând sinergic în stimularea creșterii plantulelor de tomate. 15

Experimentul a fost repetat pentru plantule de monocotiledonate (grâu, orz) de dicotiledonate (castraveți, varză), cu rezultate similare, cele două tulpini de *Trichoderma* interacționând sinergie. Biostimularea dezvoltării plantelor se datorează capacității celor două tulpini de a produce compuși care stimulează creșterea și dezvoltarea plantelor, deja prezentată pentru fiecare dintre cele două tulpini (*Trichoderma harzianum* Td50b - cerere de brevet **EP 2735607 A1**; *Trichoderma asperellum* Td36b - **Raut et al. 2015. Journal of Biotechnology, 208, S62**), dar nerevendicată ca o caracteristică sinergică a consorțiului format de cele două tulpini. 23

25

Exemplul 2

A fost testată capacitatea consorțiului format din cele două tulpini, ca și separat pentru fiecare dintre ele, de a elibera acid silicic, H_4SiO_4 , în soluția solului utilizând trei tipuri de sol: preluvosol roșcat molic, București Sud; cernoziom cambic, Fundulea-Călărași; regosol calcaric, Păulești-Prahova. Caracteristicile solurilor utilizate, pentru orizontul 0...15 cm, orizont în care sunt înglobate de obicei granulele de ceramici poroase după aplicarea tratamentelor de sol, sunt prezentate în tabelul 2. 27

29

31

33

Caracteristicile solurilor testate, pentru orizontul 0-15 cm

Tabelul 2 35

Caracteristică	UM	Preluvosol roșcat molic București	Cernoziom cambic Fundulea	Regosol calcaric Păulești
Humus (Cx 1,72)	%	2,77	3,3	1,4
Textură	-	Luto-argilos	Agirlo-lutos	Luto-nisipos
pH	Unități pH	6,5	6,3	7,3
Total N	%	0,219	0,179	0,089

37

39

41

Tabelul 2 (continuare)

Caracteristică	UM	Preluvusol roșcat molic București	Cernoziom cambic Fundulea	Regosol calcaric Păulești
Capacitatea de câmp	%	26,7	11,4	11,8
CaCO ₃	%	1,2	0,0	2,9
Capacitatea totală de schimb cationi, CEC	meq/100 g	21,75	21,1	21,3
Fosfor total (AL)	ppm	54	28	77
Potasiu mobil	ppm	87	98	140
Densitate aparentă	g/cm ³	1,12	1,15	1,20

Probele de sol prelevate din zonele menționate au fost uscate, sitate prin sită de 1 mm. Amestecul de sol cu a fost distribuit în coloane lizimetre de PVC, de 30 cm lungime și 7,5 cm diametru, prevăzute cu capace. Amestecul a fost menținut în respectivele coloane lizimetre cu granule poroase de polistiren expandat (2...4 mm, Adeplast, Ploiești, România) plasate la baza coloanelor. S-au distribuit câte 1,350 kg în fiecare coloană lizimetru, care s-au umectat la 40% umiditate cu 750 ml apă ultrapură MilliQ®. S-au aplicat pe fiecare coloană câte 150 ml de suspensie de spori conținând 10⁵ cf/ml, în 0,01% zaharoza, din fiecare tulpină și din consorțiul celor două tulpini. Coloanele au fost incubate la temperatura camerei (aproximativ 21°C) timp de 56 zile, prelevându-se levigate la 7, 14, 28, 42 și 56 zile. Pentru obținerea levigatelor s-a folosit un volum de 500 ml soluție acid citric 0,01% în apă ultrapură. Folosirea acestei soluții diluate de acid citric are un dublu rol: (I) menținerea pH-ului prin reducerea la minimum a volatilizării și (II) furnizarea carbonului accesibil necesar menținerii activității microorganismelor (Medina et al. 2014, Journal of AOAC International, 97: 643-660).

Levigarea coloanelor lizimetru s-a realizat gravitațional, iar excesul de soluție a fost îndepărtat prin vacuum limitat (-0,5 bari), timp de 2 min. Vacuumarea aceasta limitată este suficientă pentru a permite aerare prin capacele ne-etanșe ale coloanelor lizimetru și menținerea coloanei de sol în condiții aerobe.

Levigatele s-a prelevat în vase din HDPE (Nalgene, Thermo Scientific, Waltham, MA, SUA). S-au prelevat probe de câte 1 ml de levigat, care a fost diluat cu 4 ml apă ultrapură în tuburi Eppendorf conice de 15 ml (Eppendorf, Hamburg, Germania). Conținutul de acid ortosilicic liber a fost determinat cu un kit Merck (Merck Silicate Assay, 1.14794, Merck-Millipore). Acest test colorimetric este bazat pe reacția dintre silicat și ionii molibdat, pentru a forma un complex colorat de silicomolibdat albastru, care poate fi detectat spectrofotometric la 810 nm. Concentrația absolută de acid silicic a fost calculată după construcția unei curbe de calibrare folosind un standard de siliciu (Merck 170236, Merck-Millipore). Domeniul de linearitate a fost stabilit pentru intervalul 0...0,25 mM acid silicic.

S-a lucrat comparativ cu coloane lizimetru martor, care au fost umplute numai cu diferitele soluri testate, fără adaos de tulpini *Trichoderma*, tratat inițial cu 150 ml soluție zaharoza 0,01%. În levigate s-a determinat și siliciu total, prin ICP-OES (Georgiadis et al. 2013, Geoderma, 209: 251-261). Toate probele s-au realizat în trei repetiții. Rezultatele, prezentate în tabelul 3, demonstrează efectul sinergic asupra biodisponibilizării siliciului, al tulpinilor de *Trichoderma* Td50b și Td36b, reunite în consorțiu. Pentru nici unul din solurile testate nivelul de acid ortosilicic eliberat nu a depășit valoarea de 0,6 mM, uzual preluată de rădăcinile plantelor.

RO 131827 B1

Eliberarea siliciului din ceramicele poroase în solurile testate, în coloanele lizimetru, în condițiile experimentale descrise mai sus

Tabelul 3

Varianta experimentală	Siliciu în levigate (mM)									
	7		14		28		42		56 zile	
	H ₄ SiO ₄	Si _{tot}	H ₄ SiO ₄	Si _{tot}	H ₄ SiO ₄	Si _{tot}	H ₄ SiO ₄	Si _{tot}	H ₄ SiO ₄	Si _{tot}
Preluvosol roșcat + Td50b	0,20 ± 0,02	0,22± 0,03	0,22± 0,03	0,23± 0,02	0,24± 0,04	0,28± 0,03	0,26± 0,03	0,30± 0,03	0,25± 0,04	0,32± 0,05
Preluvosol roșcat + Td36B	0,21± 0,02	0,23± 0,04	0,23± 0,04	0,24± 0,04	0,26± 0,03	0,25± 0,05	0,33± 0,03	0,26± 0,02	0,33± 0,04	0,26± 0,04
Preluvosol roșcat + Td50b+Td36b	0,25± 0,04	0,27± 0,02	0,28± 0,02	0,31± 0,03	0,32± 0,03	0,34± 0,04	0,33± 0,02	0,38± 0,03	0,36± 0,03	0,40± 0,04
Preluvosol roșcat (martor netratat cu <i>Trichoderma</i>)	0,18 ± 0,02	0,24± 0,02	0,17± 0,04	0,25± 0,02	0,18± 0,02	0,25± 0,04	0,18± 0,03	0,24± 0,02	0,17± 0,03	0,24± 0,03
Cernoziom cambie + Td50b	0,24± 0,05	0,34± 0,04	0,25± 0,03	0,37± 0,03	0,28± 0,05	0,39± 0,04	0,30± 0,05	0,40± 0,04	0,32± 0,03	0,41± 0,05
Cernoziom cambie Fundulea + Td36B	0,23± 0,04	0,35± 0,03	0,24± 0,02	0,38± 0,04	0,28± 0,03	0,35± 0,04	0,32± 0,04	0,39± 0,05	0,35± 0,03	0,40± 0,05
Cernoziom cambie Fundulea + Td50b+Td36b	0,24± 0,03	0,35± 0,04	0,28± 0,03	0,39± 0,04	0,34± 0,04	0,47± 0,02	0,38± 0,05	0,51± 0,06	0,42± 0,02	0,54± 0,03
Cernoziom cambie Fundulea (martor netratat cu <i>Trichoderma</i>)	0,20± 0,03	0,30± 0,02	0,22± 0,04	0,32± 0,04	0,21± 0,05	0,35± 0,05	0,23± 0,03	0,33± 0,02	0,24± 0,03	0,35± 0,02
Regosol caicatic Păulești ++ Td50b	0,23± 0,03	0,30± 0,04	0,24± 0,03	0,41± 0,03	0,25± 0,05	0,33± 0,04	0,27± 0,05	0,37± 0,03	0,29± 0,03	0,35± 0,03
Regosol caicatic Păulești ++ Td36B	0,23± 0,04	0,30± 0,02	0,25± 0,02	0,43± 0,04	0,25± 0,03	0,45± 0,04	0,27± 0,04	0,49± 0,05	0,28± 0,03	0,40± 0,05
Regosol caicatic Păulești ++ Td50b'+Td36b	0,24± 0,03	0,31± 0,02	0,29± 0,03	0,44± 0,04	0,36± 0,04	0,47± 0,02	0,38± 0,05	0,53± 0,06	0,39± 0,02	0,51± 0,03
Regosol caicatic Păulești (martor netratat cu <i>Trichoderma</i>)	0,23± 0,03	0,30± 0,02	0,22± 0,04	0,32± 0,04	0,21± 0,05	0,35± 0,05	0,21± 0,03	0,33± 0,02	0,22± 0,03	0,35± 0,02

Siliciul biodisponibil crescut în soluția solului acționează ca un biostimulant pentru plante, fiind recunoscut rolul acestui element benefic ca biostimulant pentru plante (**Sawas și Ntatsi 2015, *Scientia horticulturae*, 196: pp. 66-81**). Consorțiul de *Trichoderma*, Td50b și Td36b își exercită astfel acțiunea biostimulantă și mediat, prin intermediul creșterii biodisponibilității siliciului. Siliciul biodisponibil eliberat din coloana de sol este rezultatul și al procesului de disociere a acidului silicic absorbit pe coloizii solului, rezultat printr-un efect de feed back pozitiv al acidului ortosilicic eliberat în soluția solului (**Ronchi et al. 2015, *Catena*, 133: pp. 85-96**).

Exemplul 3

A fost testat efectul tratamentelor consorțiului celor două tulpini de *Trichoderma*, Td50b și Td36b, aplicate ca tratament la sol, în doză de 2000 ml suspensie 10⁹ ufc per ml (din fiecare tulpină) per m² (două aplicări a câte 1000 ml, la interval de 3 săptămâni) asupra acumulării compușilor biologic activi în plantele nutraceutice *Passiflora incarnata* L. și *Momordica charantia* L.

Plantele nutraceutice au fost cultivate pe preluvosol roșcat molic, fertilizat echilibrat conform recomandărilor agrochimice. Tratamentele la sol s-au aplicat în a doua decadă a lunii mai 2015 și la începutul lunii iulie 2015, când plantele erau la începutul înfloritului, și, respectiv, la sfârșitul perioadei de înflorit. Aplicarea suspensiilor din consorțiul celor două tulpini de *Trichoderma*, Td50b și Td36b, s-a realizat cu ajutorul unei pompe de spate SG20 (Stihl AG,

1 Waiblingen, Germania), prin stropire de la 40 cm, cu o presiune de stropire stabilită la 275 kPa,
 folosind o duză cu jet plat și derivă limitată (TeeJett® flat-fan TT11002 model, Spraying Systems
 3 Co., Wheaton, IL, SUA). Tratamentele s-au realizat într-un experiment care a inclus și un martor
 netratat cu suspensii de *Trichoderma*, amplasat randomizat în 4 repetiții.

5 La 1 săptămână după fiecare tratament s-au recoltat plantele pentru a fi analizate din
 punct de vedere al conținutului de compuși activi. Materialul vegetal (frunze *P. incarnata*, fructe
 7 *M. charantia*) a fost uscat la 50°C și apoi a fost extras în etanol 70% (v/v), într-un raport de
 1,5:10 (m/v), la temperatura camerei, timp de 10 zile. Extractele au fost filtrate, iar filtratele au
 9 fost stocate la 4°C până la utilizare. Greutatea în stare uscată a fost determinată folosind un
 analizator de umiditate (Radwag, Radom, Polonia). În extractul din materialul vegetal de *P.*
 11 *incarnata* s-a determinat activitatea antioxidantă, prin măsurarea capacității respectivelor
 extracte de stinge: cationii radicalici produși de acidul 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazoline-6-
 13 sulphonic (ABTS) și radicalii stabili generați de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Rezultatele
 au fost exprimate ca echivalent Trolox (TEAC)/g s.u. și, respectiv, ca % inhibarea DDPH
 15 (**Gaspar et al. 2014, Romanian Biotechnological Letters, 19: pp. 9353-9365**).

17 *Activitatea antioxidantă în extractul de material vegetal provenit din plante de Passiflora*
 19 *incarnata*

Tabelul 4

Varianta experimentală	TEAC/g s.u.		%DDPH	
	Primul tratament	Al doilea tratament	Primul tratament	Al doilea tratament
Martor, crescut pe sol netratat cu <i>Trichoderma</i>	78,55 ± 3,05b	78,69 ± 5,88b	28,83 ± 1,22a	28,33 ± 1,56b
Sol tratat cu consorțiului tulpini <i>Trichoderma</i> , Td50b și Td36b, ca tratament la sol, în doză de 2000 ml suspensie 10 ⁹ ufc per ml (din fiecare tulpină) per m ² , două aplicări a câte 1000 ml la interval de 3 săptămâni	87,05 ± 1,53a	92,27 ± 6,28a	32,26 ± 3,13a	35,60 ± 1,96a

31 Rezultatele prezentate în tabelul 4, demonstrează că aplicarea la sol a consorțiului celor
 două tulpini de *Trichoderma*, Td50b și Td36b, în doză în doză de 2000 ml suspensie 10⁹ ufc per
 33 ml (din fiecare tulpină) per m² (două aplicări a câte 1000 ml, la interval de 3 săptămâni),
 determină o creștere asigurată statistic a activității antioxidante, de peste 10% în frunzele de
 35 *P. incarnata*. Activitatea antioxidantă este în directă legătură cu utilizările fitoterapeutice ale
 plantelor de *Passiflora* (**Sarris et al. 2013, CNS Drugs, 27: pp. 301-319**).

37 În extractul de material vegetal de *M. charantia* s-a determinat activitatea de inhibare
 a protein-tirozinfosfatazei 1B, o proteină transmembranară majoră, cu rol în diabetul de tip II,
 39 non-insulino-dependent, care este inhibată de sapogenine triptenice de tip cucurbitan din *M.*
charantia. (**Zeng et al. 2014. European Journal of Medicinal Chemistry, 81: pp. 176-180**).
 41 S-a folosit metoda descrisă de **Lund et al. 2004. Journal of Biological Chemistry, 279: pp.**
24226-24235, folosind ca substrat pNPP (para-nitro-fenil fosfat). Tamponul de testare (pH 7,4)
 43 a fost constituit din 50 mM 3,3-dimetilglutarat, 1 mM EDTA, 1 mM ditiotreititol și a fost ajustat la
 o tărie ionică de 0,15 M , prin adăugarea de NaCl. S-a lucrat în placă de microtitrare cu
 45 96 godeuri, din polipropilenă volum de lucru 250 μl (Nune™ 96-Well Polypropylene MicroWell™
 Plates, Thermo Scientific, Waltham, MA, SUA). Concentrațiile corespunzătoare de extracte

RO 131827 B1

(0 și 30 μl) au fost adăugate la tamponul de testare conținând 0 sau 2,5 mM pNPP (concentrație finală) în volum total de 200 μl. Reacția a fost inițiată de adăugarea de 20 μl, conținând 10 unități protein-tirozinfosfatază (PTP1B, Prospec, Rehovot, Israel). S-a incubat timp de 30 min la temperatura de 37°C. Reacția a fost stopată prin adăugarea a 30 μl de soluție 0,5 M NaOH. S-a măsurat absorbanta în placa de microtitrare la 405 nm folosind un cititor de plăci (FluoroStar Omega, BMG LabTech, Offenburg, Germania) cu posibilitatea corecției absorbantei cauzate de substrat în absența enzimei și compuși. Ca martor pozitiv, activitatea de PTP1B a fost determinată în prezența vanadatului de sodiu, Na₃VO₄, un inhibitor cunoscut al activității protein-tirozinfosfatazei 1B. Rezultatele s-au exprimat ca % de inhibare și sunt prezentate în tabelul 5.

Activitatea de inhibare a protein-tirozinfosfatazei 1B, PTP1B, în extractele din materialul vegetal provenit din plante de Momordica charantia

Tabelul 5

Varianta experimentală	% inhibare PTP1B	
	Primul tratament	Al doilea tratament
Martor, crescut pe sol netratat cu <i>Trichoderma</i>	27,25 ± 7,08b	28,92 ± 8,74b
Sol tratat cu consorțiului tulpini <i>Trichoderma</i> , Td50b și Td36b, ca tratament la sol, în doză de 2000 ml suspensie 10 ⁹ ufc per ml (din fiecare tulpină) per m ² , două aplicări a câte 1000 ml la interval de 3 săptămâni	37,47 ± 2,63a	42,24 ± 5,84a

Rezultatele demonstrează că aplicarea la sol la sol a consorțiului celor două tulpini de *Trichoderma*, Td50b și Td36b, în doză în doză de 2000 ml suspensie 10⁹ ufc per ml (din fiecare tulpină) per m² (două aplicări a câte 1000 ml, la interval de 3 săptămâni), determină o creștere a activității de inhibare a enzimei implicate în diabetul de tip II, protein-tirozinfosfatazei 1B, cu peste 30% în fructele de *Momordica charantia*. Consorțiului celor două tulpini de *Trichoderma*, Td50b și Td36b, biostimulează plantele, inclusiv prin eliberarea constantă în soluția solului concentrații foarte reduse de siliciu, sub formă de acid ortosilicic, H₄SiO₄. La plantele de *Passiflora incarnata* și *Momordica charantia* cultivate pe soluri tratate cu acest consorțiu activarea metabolismului secundar determină o creștere semnificativă statistic a nivelului de compuși biologic activi din țesuturile vegetale.

Revendicări

1

3

5

7

9

11

1. Consorțiu de *Trichoderma* cu acțiune de biostimulare a plantelor de cultură, **caracterizat prin aceea că**, este constituit din tulpinile de *Trichoderma harzianum* Td50b, depozitată cu numărul de depozit NCAIM (P) F 001412 la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms, Budapesta, Ungaria, și *Trichoderma asperelum* Td36b, depozitată sub numărul NCAIMP (P) F 001434 la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms, Budapesta, care, aplicate împreună, stimulează creșterea plantelor în faza de plantulă, măresc concentrația de siliciu biodisponibil din soluția solului și favorizează acumularea compușilor biologic activi în culturile nutraceutice de *Passiflora incarnata* și *Momordica charantia*.

13

15

2. Consorțiu de *Trichoderma* cu acțiune de biostimulare a plantelor de cultură, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, are activitatea optimă la o rată inițială de amestecare a tulpinilor de *Trichoderma* de 1:1, raportat la numărul de unități formatoare de colonii per mililitru de suspensie.

