



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2016 00850

(22) Data de depozit: 17/11/2016

(41) Data publicării cererii:
30/05/2018 BOPI nr. 5/2018

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
ȘTIINȚE BIOLOGICE (INCDSB),
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR. 296,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• RODINO STELIANA,
STR. DEALUL TUGULEA NR. 38-40, BL. 14,
SC. 1, AP. 12, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;
• BUTU ALINA, STR. DEALUL TUGULEA
NR. 32-36, BL. 15, SC.A, AP. 12, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;
• BUTU MARIAN, STR. DEALUL TUGULEA
NR. 32-36, BL. 15, SC.A, AP. 12, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO

(54) FORMULĂ CU EFECT ANTIMICROBIAN ASUPRA
UNOR FITOPATOGENI AI CULTURILOR DE TOMATE

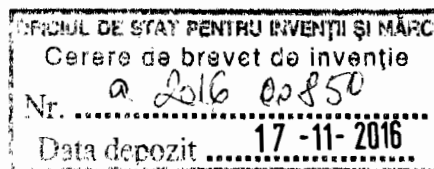
(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de preparare a unui produs cu efect antimicrobian asupra unor fitopatojeni ai culturilor de tomate. Procedeu conform invenției constă în aceea că un amestec de plante de *Artemisia absinthium*, *Salvia officinalis* și *Solanum lycopersicum*, părți aeriene sau lăstari tineri, uscate la o temperatură de 45...60°C, se macerează în solvent etanol 70% în raport 1:10 față de amestecul pulbere, timp de 96 h la temperatura camerei, la întuneric, după care se supune

ultrasonicării timp de 30 min, la temperatura de 35°C, la o putere de 34 Watt, extractul este filtrat, concentrat pentru eliminarea alcoolului, din care rezultă un extract apos având activitate antifungică ridicată împotriva fitopatojenilor *A alternata*, *R. solani*, *P infestans* și *Pythium sp.*, și efect benefic asupra germinăției semințelor și a creșterii plăntuțelor la tomate.

Revendicări: 1





DESCRIERE

TITLUL BREVETULUI:

FORMULA CU EFECT ANTIMICROBIAN ASUPRA UNOR FITOPATOGENI AI CULTURILOR DE TOMATE

ACȚIUNEA ANTIFUNGICĂ A UNOR EXTRACTE VEGETALE ȘI APLICAȚIILE LOR ÎN PROTECȚIA PLANTELOR

Aplicarea unor "produse naturale" în controlul bolilor și dăunătorilor plantelor a devenit o alternativă tot mai viabilă, și pare a fi un domeniu interesant și o metodă acceptabilă. Mulți cultivatori deja folosesc extracte din plante împotriva unor agenți patogeni ai plantelor cu importanță economică pentru culturile în arii protejate (Iacomî și colab., 2006). Produse naturale derivate din plante sunt considerate o soluție pentru a atenua problemele de mediu cauzate de utilizarea intensivă a pesticidelor de sinteză, precum și efectele negative asupra sănătății umane exercitate prin lanțul alimentar.

Prin urmare, cercetările actuale în agricultura ecologică sunt orientate pe dezvoltarea de tratamente alternative la produse chimice sintetice, pentru controlul bolilor plantelor. Speciile de plante cu efect de pesticide sunt foarte diferite: specii acvatice, arbori, plante tropicale, plante suculente, plante comestibile sau otrăvitoare, plante medicinale sau aromatice. Gama de agenți fitopatogeni pentru care a fost examinată acțiunea inhibitoare este foarte diversă, fiind vizați, de regulă, cei mai importanți fitopatogeni fungici din genurile *Fusarium*, *Phytophthora*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Sclerotinia* etc. Pesticidele botanice pot fi extrase practic din toate părțile plantei (tulpini, rădăcini, frunze, flori, semințe).

Una dintre categoriile celor mai păgubitori fungi fitopatogeni, atât prin intensitatea simptomelor de boală pe care le produce, cât și prin numărul mare de specii de plante pe care le poate infecta, este reprezentat de speciile de oomicete din genul *Phytophthora*. De aceea, și interesul specialiștilor români s-a îndreptat spre evaluarea efectelor inhibitoare ale unor extracte vegetale. De exemplu, Cărăbeș și Lauer (2006) au examinat efectele extractelor acetonice din *Paeonia suffruticosa* (bujor arbustiv) și *Hedera helix* (iederă) asupra eliberării și germinării zoosporilor de *Phytophthora infestans* și *Pseudoperonospora cubensis*, agenți patogeni ai manei la tomate, respectiv, castraveți. Experimentele au evidențiat faptul că extractele inhibă eliberarea zoosporilor precum și dezvoltarea filamentelor de germinare ale acestora, concentrațiile stabilite fiind de 0,15 % în cazul extractelor din *Hedera helix* și respectiv de 0,6 % în cazul extractelor din *Paeonia suffruticosa* (Cărăbeș și colab., 2006). De remarcat că experimentele au fost efectuate în condiții de laborator, atât pe mediu de cultură (pentru evaluarea efectelor inhibitoare ale extractelor pe culturi de *Phytophthora*), cât și în sistem gazdă-parazit (în principal pentru *Pseudoperonospora*, dar și pentru *Phytophthora*). Pentru a controla infestarea cu agenți fitopatogeni în culturile de legume, tratamentele cu extracte de *H. helix* și *P. suffruticosa* s-au realizat pe frunze detașate cu 2 și respectiv 7 zile înainte de inocularea artificială cu fungi. Frunzele astfel tratate au fost menținute la 17 °C și o umiditate relativă a aerului de 100 %, iar evaluarea a fost realizată la un interval de 2, 8 și

respectiv 14 zile de la inoculare. Ambele extracte au inhibat dezvoltarea *P. infestans* (Carabet și colab., 2009).

Un alt patogen de interes pentru practica agricolă este reprezentat de speciile genului *Alternaria*. De exemplu, pentru monitorizarea speciilor de plante cu acțiune fungicidă asupra *Alternaria brassicicola* (una dintre cele trei specii de *Alternaria* transmise prin semințele de crucifere) Iacomî și colab. (2006) au utilizat o serie de extracte vegetale comparativ cu fungicide chimice și au demonstrat eficiența și utilitatea produselor de origine naturală în combaterea infecției fungice.

Deseori studiile au vizat în combaterea specifică a unui anumit tip de agent fitopatogen. De exemplu, (Dushyent și colab., 1997) au analizat 11 tipuri de extracte vegetale în privința efectului inhibitor asupra creșterii miceliului de *Alternaria solani*: ei au constatat că extractele de frunze de *Tamarix aphylla* și *Salsola baryosma* au inhibat complet creșterea *in vitro* a agentului patogen. Aspecte similare au fost evidențiate de (Wszelaki și colab., 2005) de data aceasta cu extracte de *Allium sativum*: acestea au redus semnificativ incidența contaminării cu *Alternaria solani* a frunzelor de tomate.

Alternarioza reprezintă o boală comună pentru majoritatea speciilor de plante din familia Solanaceae, ea fiind răspândită în zonele cu ploii frecvente, ceață și umiditate crescută.

Phalirsteen și colab. a investigat efectul împotriva alternariozei cartofului atât al unor extracte frunze de plante medicinale indiene, cât și acțiunea combinată a extractelor respective împreună cu fungicide de sinteză (Carbendazim). Experimentele efectuate în condiții *in vitro* au evidențiat că extractele apoase obținute din plantele medicinale *Azadirachata indica* (3 %), *Calotropis procera* (3 %), *Nerium oleander* (3 %), *Ocimum sanctum* (3 %) și fungicidul Carbendazim (1 %) au inhibat creșterea patogenului *Alternaria solani* atunci când agentul inhibitor a fost inclus în mediul de cultură PDA (Potato Dextrose Agar) (Phalirsteen și colab., 2008).

Recent, (Sallam, 2011) au examinat șase specii de plante caracteristice nordului Africii: *Ocimum basilicum* (busuioc), *Azadirachata indica* (neem), *Eucalyptus chamadulonsis* (eucalipt), *Datura stramonium* (ciumăfaie sau laur), *Nerium oleander* (leandru) și *Allium sativum* (usturoi) pentru efectele antifungice atât *in vitro*, cât și în experimente realizate în condiții de seră și de câmp. Tratamentele au fost comparate cu un fungicid utilizat pe scara largă pentru tratarea bolilor fungice, Ridomil Plus. Toate tratamentele aplicate în câmp au îmbunătățit producția de legume, comparativ cu controlul infectat și netratat. Ce mai mare reducere *in vitro* a creșterii miceliului de *A. solani* a fost înregistrată în cazul extractelor de *D. stramonium*, *A. indica* și *A. sativum*, în timp ce în condiții de seră, severitatea bolii a fost redusă cel mai mult de către tratamentul cu Ridomil Plus, urmat de extractul de *A. sativum*, și *D. stramonium*.

Rhizoctonia solani este unul dintre cei mai întâlniți fitopatogeni care afectează culturile de tomate (*Solanum lycopersicum*), cartofi (*Solanum tuberosum*), castraveți (*Cucumis sativus*), mazăre (*Pisum sativum*) și multe altele, cauzând putregaiul rădăcinilor și ofilirea răsadurilor (Agrios, 2005, Ohkura și colab., 2009).

Experimentele realizate de (Sehajpal și colab., 2009) au demonstrat că extractele de *Allium sativum* au manifestat o fungitoxicitate crescută față de *R. Solani*, chiar și în concentrații scăzute.

Un alt agent fitopatogen major al diferitelor culturi, față de care tratamentele actuale sunt destul de puțin eficiente (Al-Sheikh, 2010) este reprezentat de specii de *Pythium*. Acestea pot provoca boli cum ar fi ofilirea răsadurilor, putregaiul semnițelor, putregaiul rădăcinilor, putregaiul moale (Agrios, 2005, Horner și colab., 2012, Le și colab., 2014) la grâu (*Triticum aestivum*), porumb (*Zea mays*), soia (*Glycine max*), ardei (*Capsicum annuum*), fasole (*Pisum sativum*), castraveți (*Cucumis sativus*), tomate (*Solanum lycopersicum*) și multe alte culturi, rezultând pierderi economice imense.

Pentru găsirea unor variante de tratament alternative pesticidelor chimice sau în combinație cu acestea au fost realizate o serie de studii referitoare la potențialul anti-*Pythium* a unor extracte vegetale. Astfel, Muthukumar și colab. (2010) au utilizat un amestec de extracte din frunze de *Allium sativum* și *Allium cepa* pentru inhibarea creșterii miceliului de *P. aphanidermatum*. Analizele complexe efectuate asupra extractelor respective (prin GC-MS) au permis identificarea a 22 de compuși cu efecte antimicrobiene.

MATERIALE ȘI METODE

1. Material vegetal

Artemisia absinthium (pelin) face parte din familia Asteraceae (Compositae). Planta este foarte populară în multe părți ale lumii, crește în sălbăticie în zonele de șes și deluroase, în special pe locurile însorite. Cea mai utilizată parte este reprezentată de frunze, recoltate imediat înainte de înflorirea plantei.

Salvia officinalis (salvia) este o plantă erbacee perenă. Are frunze acoperite cu peri fini de culoare argintie sau verde cenușie. Tulpina crește dreaptă și poate atinge aproximativ un metru înălțime. Preferă expoziție luminoasă și căldură, iar pământul trebuie să fie permeabil, să conțină nisip și calcar.

Solanum lycopersicum sau *Lycopersicum esculentum* (roșia, pătlăgică roșie sau tomata) este o plantă din familia Solanaceae, clasa legumelor solano-fructoase, alături de cartof, vinete, ardei, batate. Este o plantă perenă, atingând frecvent între 1 și 3 m înălțime. Are un trunchi mai mult ierbos care crește de obicei pe araci sau pe tulpinile altor plante. Frunzele plantei sunt lungi de 10 - 25 cm, de forma penat-compusă, având 5 - 9 frunzulițe cu margini serate.

Pentru prepararea formulei, denumită în continuare formula SAT, se utilizează părțile aeriene ale acestor plante uscate în aer liber, în locuri ferite de lumină puternică sau uscate cu aer cald, la o temperatură de 45 - 60 °C. În cazul *Solanum lycopersicum* se recomandă utilizarea lăstarilor tineri (copili).

2. Material microbiologic

În vederea evaluării activității antimicrobiene au fost utilizate tulpini de fungi fitopatogeni, după cum urmează: *Phytophthora infestans*, *Rhizoctonia solani*, *Alteraria*

alternata, și *Pythium sp.* Tulpinile utilizate aparțin colecției Departamentului de Biotehnologii, Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Științe Biologice, București.

Cultura de *P. infestans* a fost menținută pe mediu de secară, iar celelalte tulpini au fost menținute pe mediu de creștere Potato Dextrose Agar (PDA), la 20 °C. Testele au fost realizate utilizând discuri miceliene provenind din culturi fungice proaspete, prezentând o creștere activă.

3. Medii de cultură

Potato Dextrose Agar (PDA)

Pentru obținerea acestui mediu se procedează în felul următor: 200 g de felii de cartof se fierb timp de 30 minute în aproximativ 500 ml de apă; după filtrare prin tifon se adaugă glucoză (dextroză) (20 g/L) și agar – 20g/L) și se completează cu apă până la 1 L. În unele experimente a fost utilizat mediu gata preparat, în formă deshidratată (Liofilchem). În acest caz s-au suspendat 42,00 g de mediu deshidratat în 1000 ml apă bidistilată și s-a amestecat pe plita magnetică până la dizolvare completă. S-a sterilizat în autoclav timp de 15 minute la 121 °C. După ce s-a răcit la 50 °C, mediul a fost turnat în plăci Petri sterile, într-un strat de aproximativ 5 mm. Această cantitate corespunde la 15 - 20 ml de mediu pentru plăci cu diametrul de 90 mm.

4. Reactivi

În testele de microbiologie a fost folosit mediul de cultura Potato Dextrose Agar (PDA) achiziționat de la Liofilchem. Antifungicele de sinteză au fost furnizate de SC Aectra Agrochemicals SA. Toți reactivii și solvenții au avut puritate analitică.

5. Metoda de preparare

Formula SAT a fost obținut prin macerare și ultrasonicare. Aceasta este o tehnică de extracție simplă și ieftină, care permite transferul facil al tehnologiei în industrie. Solventul (etanol 70 %) a fost adăugat în raport 1:10 (w:v) peste o cantitate exactă din material vegetal sub formă de pulbere fină, uscată. Amestecul a fost lăsat la macerat în vase de sticlă sigilate timp de 96 h, la temperatura camerei, în întuneric, cu agitare ocazională. A urmat ultrasonicare pentru care au fost utilizați următorii parametri de lucru: timp de sonicare 30 minute, temperatura 35 °C, putere 34 Watt. Extractul obținut a fost filtrat pe pânză Buchner printr-un filtru de hârtie (Whatman nr.1) sub vid. S-a eliminat alcoolul prin concentrare la rotavapor și extractul apos rezultat (formula SAT) a fost păstrat la o temperatură de 4 °C în recipiente sigilate, până la utilizarea ulterioară.

6. Testarea activității antifungice

Efectul formulei SAT asupra creșterii miceliene a fungilor fitopatogeni de interes a fost testat prin metoda includerii acesteia în mediul de cultură (Poison Food Method sau Radial Growth Method). Aceasta metodă presupune încorporarea unei cantități adecvate din formula în mediul de creștere (PDA, răcit la 40 – 50 °C). Controlul negativ a fost reprezentat de plăci Petri conținând mediu netratat. Controlul pozitiv a fost reprezentat de plăci tratate cu fungicid de sinteză, utilizat în mod uzual în cultură. Plăcile au fost lăsate să se solidifice în hota cu

flux laminar și după aceea au fost inoculate cu discuri miceliene cu diametrul de 6 mm, tăiate din marginea unei culturi proaspete, cu creștere activă. Pentru fiecare tratament au fost realizate trei replicări și a fost raportată valoarea medie a citirilor.

Plăcile Petri au fost incubate la întuneric, la 20 ± 2 °C pentru 5 - 16 zile (în funcție de fitopatogenul testat), moment în care colonia din placa de control a atins marginea vasului. Măsurarea diametrului coloniei a fost înregistrată zilnic, începând de la 9 - 12 ore după inoculare. Procentul de inhibare a creșterii miceliului, I (%), ca urmare a tratamentului cu formula SAT a fost calculat folosind următoarea formulă:

$$I (\%) = (1 - d_t/d_c) * 100 (\%), \quad (1)$$

unde, d_c este diametrul mediu al coloniei, măsurat în placa Petri de control, fără tratament, iar d_t este diametrul mediu măsurat în plăcile Petri tratate cu formula SAT (Ogbebor și colab., 2008).

7. Teste de germinare in vitro pentru evaluarea efectului formulei asupra semințelor de tomate

Solul utilizat a fost procurat de la un furnizor local de materiale de gradinarit, sub denumirea de substrat de creștere pentru plante cu cerințe nutriționale ridicate, producător Compo GmbH, Germania. Ingrediente: Turba (grad de descompunere H₂-H₇), Perlite® 3%, var, îngrășământ NPK-, AGROSIL® (fosfat de siliciu). Conținut de sare, KCl, 3,0 g / l, Caracteristicile fizice și chimice ale acestuia au fost: valoare ph 5,0 – 6,5. Conținut de nutrienți: 200 - 450 mg / l N, azot; 200 - 500 mg / l P₂O₅, fosfat (CAL); 300 - 550 mg / l K₂O, oxid de potasiu (CAL). Substanță organică (evaluată ca pierdere prin întărire): 20 %. Pentru folosirea în testele de germinare, solul a fost sterilizat prin autoclavare la 120 °C. timp de 30 minute, în trei zile consecutive.

În vederea utilizării pentru inoculare, cultura de *Rhizoctonia solani* utilizată în teste a fost menținută pe mediu PDA și incubată la 20 °C la întuneric, timp de 5 zile. Pentru prepararea inoculului, din marginea unei culturi active, au fost tăiate 2 discuri miceliene de 5 mm, mărunțite și amestecate cu boabe de ovăz (*Avena sativa*) sterilizate. Inoculul a fost incubat pentru o perioadă de 3 săptămâni la temperatura camerei, cu agitare zilnică, pentru a asigura o colonizare uniformă a semințelor de ovăz. Ulterior, în vederea utilizării pentru inocularea solului, boabele de ovăz au fost lăsate la uscat pentru o perioadă de 24 de ore (Smith și colab., 2003). Pentru inoculare s-au folosit 5 g de boabe de ovăz la 1 kg de sol.

Tratarea semințelor de tomate

Tratamentul semințelor s-a realizat prin imersia acestora în soluția considerată (formula SAT sau după caz, soluția martor), timp de 5 minute. Controlul pozitiv a fost reprezentat de semințe tratate cu un fungicid utilizat în mod uzual în prevenirea rhizoctoniozei, în practicile agricole și anume, Merpan 80 WDG. Controlul negativ a fost reprezentat de semințe imersate în apa distilă sterilă. De asemenea, un set de probe a fost lucrat cu semințe netratate și puse la germinat în sol neinoculat.

Testele de germinare au fost derulate cu utilizarea a 100 de seminte pentru fiecare proba luată în lucru. Semințele de tomate au fost așezate pe hârtie de filtru sterilă, care a fost

umezită cu apa distilată sterilă, și acoperite cu 50 g de sol inoculat în prealabil cu *R. solani*. Hârtia de filtru a fost rulată și introdusă în pungi de plastic bine sigilate, după care au fost lăsate la incubat pentru o perioadă de 5 zile la temperatura camerei.

După incubare, severitatea infecției a fost evaluată utilizând o scală cu 5 nivele, descrisă anterior de Altier (Altier și colab., 1994), (tabelul 1.), cu unele modificări. Rezultatele au fost raportate ca fiind media rezultată din evaluarea tuturor semințelor recuperate.

Tabelul 1. Scala pentru evaluarea severității simptomelor provocate de infecția cu *R. solani* asupra semințelor de tomate.

Scor din evaluare	Caracteristicile semințelor
1	Plantulă sănătoasă
2	Vârf de rădăcină primară necrozată, dar ferm
3	Vârf de rădăcină primară moale și putezit
4	Plantulă uscată, sămânța germinată cu radicul putezit
5	Sămânță uscată, putrezită și negerminată

Determinarea procentului de germinare a fost calculat după formula:

$$\% \text{ germinare} = (n * 100) / N$$

unde n reprezintă numărul de semințe germinate, sănătoase, iar N număr total de semințe testate.

8. Testarea biocontrolului rhizoctoniozei cu formula SAT

Pentru evaluarea posibilității utilizării formulei SAT ca agent pentru biocontrol infecției plantelor cu *R. solani* a fost utilizat același tip de sol ca și în cazul testelor de germinare *in vitro*, descris în secțiunea anterioară. De asemenea, prepararea inoculului fungic, inocularea solului și tratamentul semințelor s-a desfășurat respectând aceiași parametri.

Pentru tratamentul semințelor de tomate s-au realizat patru variante experimentale: (1) controlul pozitiv reprezentat de semănarea unor semințe netratate în sol neinfestat; (2) controlul negativ – semănarea semințelor netratate în sol inoculat; (3) semănarea semințelor tratate cu formula SAT în sol inoculat, pentru evaluarea efectului de biocontrol al acestora asupra rhizoctoniozei (4) semănarea semințelor tratate cu fungicid în sol inoculat.

Solul inoculat a fost distribuit în tăvi alveolare pentru răsaduri. După aceea, tăvile au fost acoperite cu un film de plastic și lăsate la incubat pentru o săptămână, pentru a promova creșterea patogenului. Semințele de tomate au fost introduse în sol la o adâncime de aproximativ 1 cm.

În primele 10 zile au fost induse condiții de saturare cu apă, pentru a favoriza apariția bolii și germinarea semințelor, urmând 4 - 5 zile de uscăciune, pentru a simula condițiile de secetă. Controlul negativ a fost reprezentat de probele cu semințe netratate, introduse în sol inoculat. Controlul pozitiv a fost o soluție de Merpan 80 WDG. Cultura de tomate a fost menținută la 24 – 26°C, cu fotoperioadă de 16 / 8 ore întuneric. Severitatea bolii a fost evaluată utilizând o scală cu 5 nivele, descrisă în literatură de Altier și Theis (Altier și colab.,

1994), (tabelul 1.).

REZULTATE SI DISCUTII

Eficacitatea *in vitro* a formulei SAT împotriva infecției cu *Rhizoctonia solani*

Rhizoctonia solani este polifagă, atacând și producând pagube însemnate la mai multe specii din familia Solanaceae (cartof, tomate, vinete, ardei), producând căderea și apoi moartea plantelor în faza de răsad. Atât tratamentele chimice cu fungicide tradiționale, utilizate în mod curent, cât și metodele integrate de gestionare a bolilor plantelor, utilizate pentru controlul și tratamentul simptomelor cauzate de *R. solani* nu par a fi complet eficiente, și prin urmare, bolile provocate de aceasta rămân o problemă persistentă pentru fermieri (Huang și colab., 2012).

În momentul de față, sunt utilizate diferite metode pentru a controla *R. solani*, cum ar fi practicile de management integrat, solarizarea și combaterea chimică (Plodpai și colab., 2013). Indiferent de sistemul de cultivare - sera sau câmp deschis - în fiecare sezon sunt raportate focare de boli cauzate de *R. solani*. Acest agent patogen provoacă leziuni severe răsadurilor atât în pepiniere, cât și după transplantare. Managementul acestei boli este dificil datorită viabilității scleroțiilor, uneori de-a lungul a doi - trei ani (Sneh și colab., 1996, Ritchie și colab., 2013).

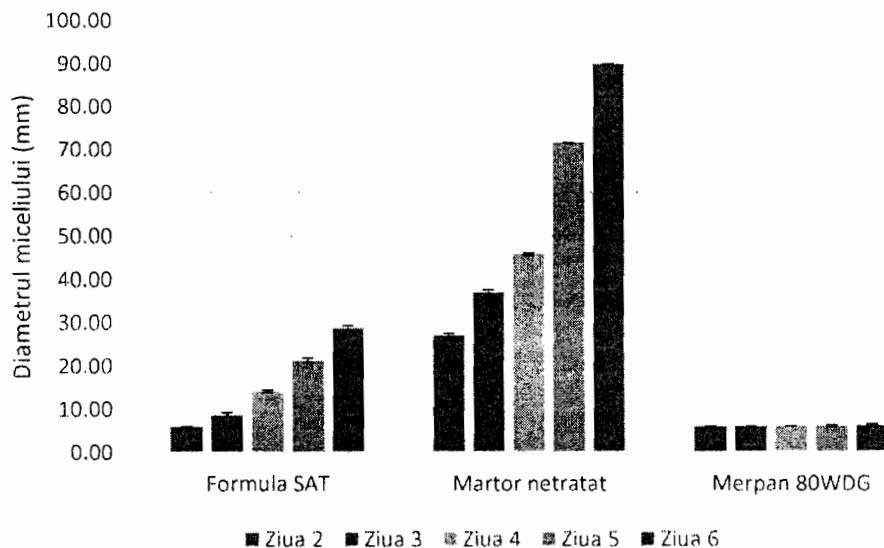


Figura 1. Diametrul coloniei de *R. Solani* după tratamentul cu formula SAT

Efectul formulei SAT asupra creșterii miceliului de *R. solani* a fost testat pe parcursul a 6 zile de incubare, prin metoda încorporării formulei SAT în mediul de creștere. După 6 zile de incubare, pe placa martor - cu mediu netratat, miceliul a atins marginile plăcii Petri (90 mm). Diametrul coloniei fungice pe plăcile cu formulei SAT a fost de cca. 29 mm (Figura 1.).

În vederea fundamentării unor teste complementare, pentru evaluarea capacității de germinare a unor semințe tratate cu formula SAT, a fost calculată eficiența procesului de inhibare a creșterii miceliene (pe baza diametrului coloniei fungice). Astfel, formula SAT a

determinat inhibarea creșterii în procent de 68,15 %.

Rezultatele obținute în experimentele efectuate sunt în concordanță cu rezultatele raportate de alți cercetători și prezentate în literatura științifică de specialitate. Rezultate foarte bune privind activitatea antifungică a unui extracte preparate din *T. patula*, alături de alte extracte, au fost obținute, împotriva agentului cauzator al putregaiului cenușiu (*Botrytis cinerea*) izolat din culturi de coacăz negru, *Ribes nigrum*. Pentru extractul din *T. patula* la o concentrație de 20 % și respectiv 10 %, în mediul de creștere a fost observată o activitate antifungică mare, cu eficiență între 80 % și 100 %, alături de extractele obținute din alte plante medicinale precum *Satureja hortensis* (cimbru), *Allium sativum* (usturoi) și *Mentha sp.* (mentă) (Șesan și colab., 2015). Activitatea antifungică a extractului de crăițe a dat rezultate promițătoare și împotriva altor fungi fitopatogeni: *Botrytis cinerea*, *Fusarium moniliforme* și *Pythium ultimum*. Testarea extractului în metanol a fost realizată atât la întuneric, cât și la lumină, cu ajutorul a două sisteme de iluminat diferite. Datele au arătat că extractul a dovedit a avea o activitate dependentă de doză asupra tuturor fungilor, cu o diferență remarcabilă între tratamentele la lumină și cele la întuneric. Probele tratate cu doza de 50 μg / ml au demonstrat procente ridicate de inhibare (51,4 %) (Mares și colab., 2004).

Activitatea antifungică a unor extracte din plante împotriva *R. solani*, a fost studiată și de alți cercetători. Astfel, Abd-El-Khaira și colab. au raportat activitatea inhibitoare a extractelor apoase de semințe de ceapa, lemon grass și chilli într-un procent cuprins între 42,2 și 71,1 % (Abd-El-Khair și colab., 2011). Alți autori au evaluat utilizarea unor solvenți organici în procesul de extracție (lanolina și untul de cacao) în comparație cu extracția în apă. Rezultatele au demonstrat faptul ca extracția cu solvenți alternativi a condus la un conținut mai mare de taninuri în produsul obținut din plante disponibile în aria lor de lucru: *Larrea tridentate* (creosot), *Flourensia cernua*, *Agave lechuguilla*, *Opuntia sp.* și *Yucca sp.* La o concentrație de 2000 și 1000 ppm taninuri totale, extractele din *Larrea tridentate* și *Flourensia cernua*, au inhibat creșterea *R. solani* cu 100 % (Castillo și colab., 2010).

Eficacitatea *in vitro* a formulei SAT împotriva *Phytophthora infestans*

Mana cauzată de *Phytophthora infestans* este considerată în toată lumea ca fiind una dintre cele mai devastatoare boli ale culturilor horticole încă din anul 1840 („Marea Foamete Irlandeză”) (Fry și colab., 1997, Ristaino și colab., 2001). De atunci, pentru combaterea manei au fost dezvoltate diferite fungicide sintetice, precum și varietăți rezistente. Cu toate acestea, în ciuda cunoștințelor aprofundate în domeniu, această boală continuă să fie o problemă majoră în zonele cultivate cu tomate (*Lycopersicum esculentum* L.)

Phytophthora infestans este un fung ce face parte din grupul Peronosporaceae (încrângătura Oomycota) împreună cu multe alte specii care produc boli, cunoscute sub numele de mană, multor plante cultivate din familia Solanaceae, provocând pierderi însemnate mai ales în culturile de cartof și tomate. Combaterea se realizează cu fungicide, dar eficiența acestora este deseori depășită de instalarea la fungii țintă a fenomenului de rezistență.

Încorporarea formulei SAT în mediul de creștere pentru *P. infestans* a condus la

inhibarea dezvoltării miceliene a fitopatogenului. Astfel, în timp ce pe placa Petri conținând doar mediu de creștere dezvoltarea miceliului a debutat în ziua a șasea după inoculare, pe plăcile suplimentate cu formula SAT creșterea coloniei a fost observată abia începând cu ziua a nouă. Rezultatele înregistrate la sfârșitul perioadei de incubare (16 zile) au evidențiat faptul că formula SAT a redus creșterea radială a coloniei de *P. infestans* la 57 mm, față de controlul netratat 90 mm, după cum se poate observa în figura 2.

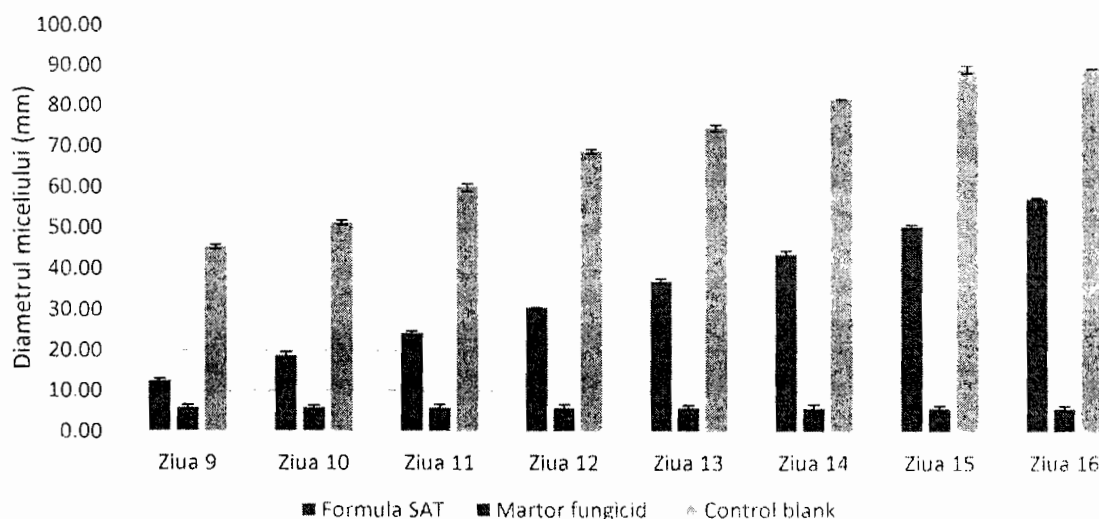


Figura 2. Diametrul coloniei de *P. infestans* în urma incorporării formulei SAT în mediul de creștere

Eficacitatea *in vitro* a formulei SAT împotriva infecției cu *PYTHIUM SP.*

Modul de viață al fungilor din genul *Pythium* este saprofit sau parazit, în ultimul caz infectând o gamă largă de specii vegetale prin rănilor ce se produc la nivelul rădăcinilor plantelor tinere și producând căderea acestora. Speciile de *Pythium* pot provoca diverse boli de la înființarea culturilor, cum ar fi: ofilirea răsadului, putregaiul semințelor, putrezirea rădăcinilor, putregaiul moale (Agrios, 2005, Horner și colab., 2012, Le și colab., 2014). Acest fitopatogen poate ataca diferite specii, de la cereale până la legume, precum specii de grâu (*Triticum aestivum*), porumb (*Zea mays*), soia (*Glycine max*), ardei (*Capsicum annuum*), fasole (*Pisum sativum*), castraveți (*Cucumis sativus*), tomate (*Solanum lycopersicum*), ș a.. *Pythium* este recunoscut ca un agent patogen major al multor culturi, mai ales în sere (Al-Sheikh, 2010).

În cadrul experimentelor efectuate a fost evaluată acțiunea formulei SAT în privința efectelor inhibitoare pentru dezvoltarea unor tulpini de *Pythium sp.* Astfel, odată cu utilizarea extractului SAT miceliul fungic s-a dezvoltat mult mai lent decât martorul netratat, ceea ce sugerează efecte fungistatice puternice.

În privința dinamicii inhibării creșterii fungului, prin utilizarea formulei SAT încorporată în mediul de cultură s-a observat o dezvoltare întârziată a miceliului de *Pythium sp.* comparativ cu martorul netratat. Miceliul a început să se dezvolte pe plăcile control netratat după 15 ore de la inoculare, atingând marginile plăcii Petri (diametru de 90 mm) după 5 zile de inoculare. Pe plăcile conținând formula SAT creșterea miceliului a fost

observată abia după mai mult de 36 de ore de la inoculare (Figura 3).

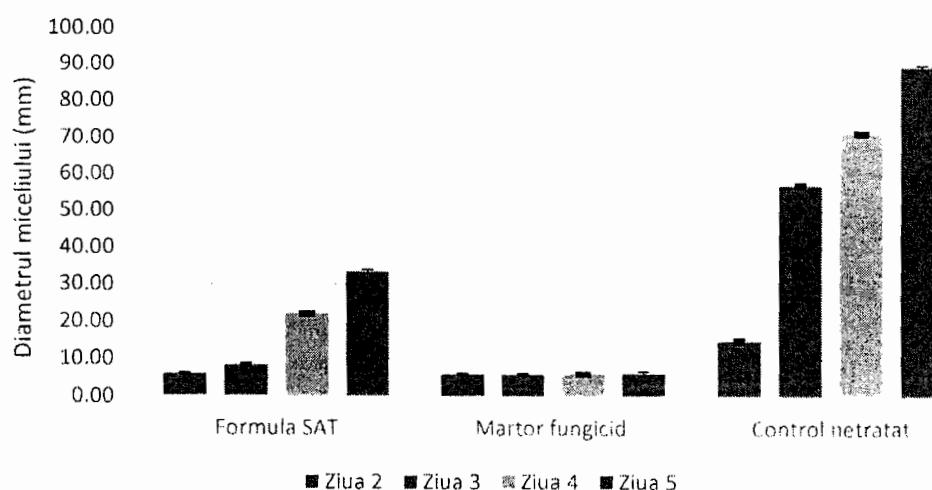


Figura 3. Diametrul coloniei de *Pythium sp.* după tratamentul cu formula SAT după patru zile de incubare

Gradul de inhibare a creșterii miceliene produs de formula SAT a fost de cca 62 % (figura 4.).

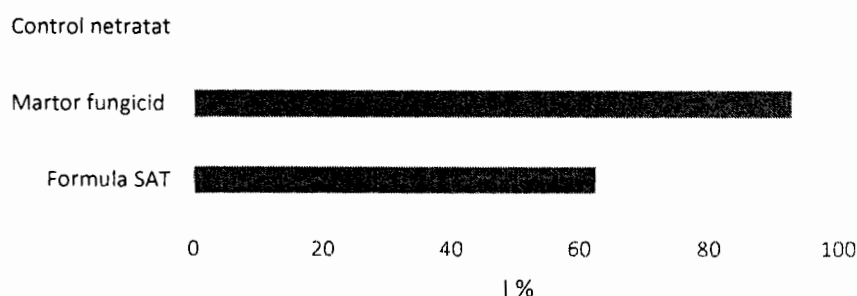


Figura 4. Procentul inhibării creșterii miceliene după 5 zile de incubare

Aspecte asemănătoare referitoare la acțiunea anti-*Pythium* a unor extracte vegetale au fost raportate și de alți autori, datele obținute în cazul experimentelor efectuate de noi fiind în concordanță cu acestea. Astfel, (Muthukumar și colab., 2010) examinând efectele fungitoxice de 66 de plante medicinale împotriva speciei *Pythium aphanidermatum*, agentul cauzal al ofilirii la ardeiul iute au evidențiat faptul că cel mai eficient extract antifungic a provenit din frunze de Zimmu (*Allium sativum L. & Allium cepa L.*) (Muthukumar și colab., 2010). De asemenea, Ambikapathy și colab. (2011) au raportat o activitate antifungică ridicată pentru extractele n-butanolice și metanoliche din *Lawsonia inermis*, *Phyllanthus niruri*, *Purpurea tephrosia* împotriva *Pythium debaryanum*, în timp ce extractele metanoliche de *Mimosa pudica* și *Vinca rosea* au prezentat o activitate antifungică mai scăzută.

Rezultate similare au fost obținute de Bahraminejad și colab. (2012). Aceștia au evaluat activitatea antifungică a unor extracte apoase și metanoliche brute obținute din 97 de specii de plante, colectate din zona de vest a Iranului. Testele efectuate pe tulpini de *Pythium*

aphanidermatum au evidențiat faptul că 17 dintre cele 97 specii de plante au prezentat activitate inhibitorie. Dintre acestea, extractele de *Glycyrrhiza glabra*, *Xanthium strumarium* și *Portulaca oleracea* au fost cele mai active extracte. Testarea extractelor vegetale selectate direct pe plante crescute în condiții de seră a demonstrat că toate extractele vegetale utilizate au determinat reducerea severității simptomelor determinate de infecția plantulelor cu *P. aphanidermatum*: de exemplu, extractele din *G. glabra* și *P. oleracea* utilizate în tratamentul semințelor, au redus severitatea bolii de la 70 % pentru martorul infectat, netratat, la un procent de 43 % în cazul plantelor tratate cu extracte vegetale (Bahraminejad, 2012).

Eficacitatea *in vitro* a formulei SAT împotriva *Alternaria alternata*

Alternaria prezintă un gen de fungi cu numeroase specii, capabile de un mod de viață saprofit sau parazit. Speciile acestui gen pot afecta un număr mare de specii de plante de interes economic (tomate, grâu, sorg, orz, floarea-soarelui, rapiță, bumbac ș.a.), producând în acest fel pierderi importante de recoltă. Infectarea plantelor se poate produce atât în câmp, cât și în condiții de solar, în toate etapele de dezvoltare ale plantelor, astfel că pentru combatere sunt necesare tratamente specifice, costisitoare și potențial toxice pentru mediu.

Alternaria alternata provoacă pătarea frunzelor și mană pe o mare varietate de culturi agricole și horticole, cum ar fi: tomate (*Lycopersicon esculentum*), cartofi (*Solanum tuberosum*), morcovi (*Daucus carota*), conopidă (*Brassica oleracea* var. *botrytis*), brocoli (*Brassica oleracea* - *Botrytis* Group), varză (*Brassica oleracea* var. *capitata*), ardei (*Capsicum annuum*), fasole (*Pisum sativum*), măr (*Malus domestica*), piersic (*Prunus persica*) și specii de citrice. Mai mult decât atât, *A. alternata* poate ataca specii de buruieni și plante ornamentale. De asemenea, *Alternaria* sp., reprezintă un microorganism cu importanță medicală, existând fără îndoială ipoteza conform căreia sensibilitatea la *Alternaria* reprezintă un factor declanșator în inducerea rinitei alergice și a astmului la pacienții imunodeprimați, în special la copii (Kuna și colab., 2011).

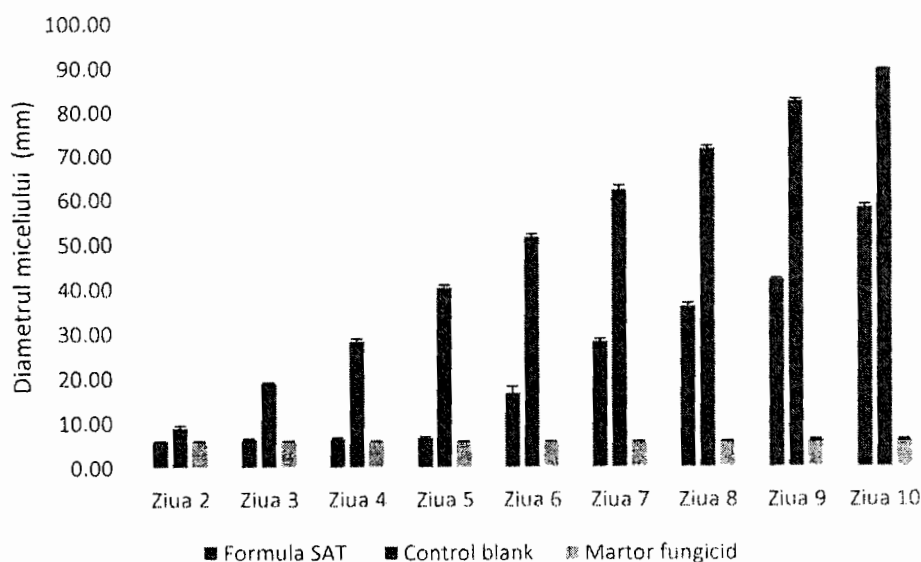


Figura 5. Creșterea radială a miceliului de *A. alternata*

Pentru testarea efectelor inhibitoare ale formulei SAT asupra dezvoltării miceliului de *Alternaria alternata* s-a utilizat metoda încorporării formulei în mediul de cultură, iar incubarea și urmărirea efectelor tratamentelor s-au derulat pe parcursul a zece zile.

Formula SAT a prezentat potențial antifungic împotriva fungului testat, demonstrat prin inhibarea creșterii miceliului.

Utilizarea formulei SAT încorporată în mediul PDA a condus la inhibarea 35 % a dezvoltării miceliului de *A.alternata*. În ceea ce privește dinamica de inhibare a dezvoltării miceliene s-a observat o dezvoltare lentă a miceliului, comparativ cu martorul netratat (figura 5.). Astfel, începerea dezvoltării miceliului a întârziat cu patru zile față de martor atunci când s-a utilizat formula SAT. Rezultatele înregistrate la sfârșitul perioadei de incubare (9 zile) au evidențiat faptul că formula SAT a redus creșterea radială a *A. alternata* la 58 mm, față de controlul netratat 90 mm, după cum se poate observa în figura 4.

În ultimul deceniu, cercetările asupra proiectării și dezvoltării unor produse botanice pentru a controla patogenii fungici au crescut simțitor. Diferite extracte din plante în special extracte alcoolice și apoase, au fost evaluate *in vitro* împotriva fungilor din genul *Alternaria*, precum *Alternaria alternata* (Carvalho și colab., 2011), *Alternaria solani* (Yusuf și colab., 2011) și *Alternaria sesami* (Zaker, 2013). Rezultate promițătoare au fost obținute pe specii de: *Artemisia annua*, *Cariniana estrelensis*, *Ficus carica* și *Ruta graveolens* (Carvalho și colab., 2011), *Crotalaria trichotoma* (36,6 %), *Citrus aurantifolia* (27,3 %), *Azadirachta indica* (23,7 %), *Polyalthia longifolia* (23,3 %), *Datura metel* (21,3 %), *Muntingia calabura* (20,09 %) și *Oxalis latifolia* (20,09 %) (Ravikumar și colab., 2013), *Mentha piperita*, *Eucalyptus camaldulensis*, *Lavandula officinalis* (Zaker, 2013).

Extracte și uleiuri esențiale din *Rosmarinus officinalis* și *Artemisia absinthium* sunt folosite în scopuri medicinale pentru tratarea infecțiilor bacteriene și fungice (Bozin și colab., 2007, Ahameethunisa și colab., 2010). Pelinul este folosit în mod tradițional ca antihelmintic, antiseptic, antispastic și pentru dizenterie bacilară, tipuri de cancer și boli neurodegenerative (Joshi, 2013). Efectele antimicrobiene ale extractelor din diferitele specii de pelin au fost evidențiate față de o gamă diversă de agenți fitopatogeni, autorii prezentând și compoziția chimică a acestor extracte și metodele de studiu folosite (Felicio și colab., 2012). Există mai multe studii asupra activității antifungice a speciilor de *Artemisia* împotriva *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, *Penicillium spp.*, *Rhizoctonia solani* Kühn, *Sclerotinia sclerotiorum* (Kordali și colab., 2005) (Meepagala și colab., 2003) (Tang și colab., 2000) (Wang și colab., 2006), (Badea și colab., 2014).

Rezultatele obținute de (Zaker, 2013) au evidențiat acțiunea antifungică asupra *Alternaria sesami* a unor extracte din ciumafaie și menta. La concentrație de 5 % în mediu, diametrul miceliului a atins 65,6 mm pentru *D. stramonium*, comparativ cu menta 15 mm și Mancozeb 0 cm, în timp ce la 15 % concentrație, diametrul miceliului de pe placa tratată cu extract din datura a ajuns la 2,16 cm, iar pentru cel din mentă a avut activitate fungitoxică similară fungicidului utilizat.

Stabilirea impactului formulei SAT asupra procesului de germinație

În vederea testării capacității de germinație a semințelor de tomate (*Solanum lycopersicum*) în sol infectat cu *R. solani* a fost luată în considerare un eșantion de 100 de seminte. Drept probe martor pentru compararea rezultatelor au fost folosite 3 variante: martor de semințe tratate doar cu apă distilată, neinfectate; martor de semințe tratate cu apă distilată dar infectate cu *R. solani* și martor de semințe tratate cu fungicidul Merpan 80 WDG, infectate cu fitopatogenul de interes. La 5 zile după inoculare și incubare în condiții optime de temperatură și umiditate, semințele de tomate au fost evaluate din punct de vedere al capacității de germinare (tabelul 2.).

Tabel 2. Evaluarea capacității de germinare a semințelor tratate cu formula SAT.

Proba	Scor din evaluare	Procent germinare (%)
Formula SAT	1.61	92
Control netratat	4.71	20
Control neinfecat	1.23	95
Merpan 80 WDG	1.45	93

Germinarea semințelor netratate și semănate în sol infectat cu *R. solani* a fost puternic inhibată, doar 20 % dintre semințe germinând, dar ele au prezentat în plus și semne de infecție, cu radicele putrezite.

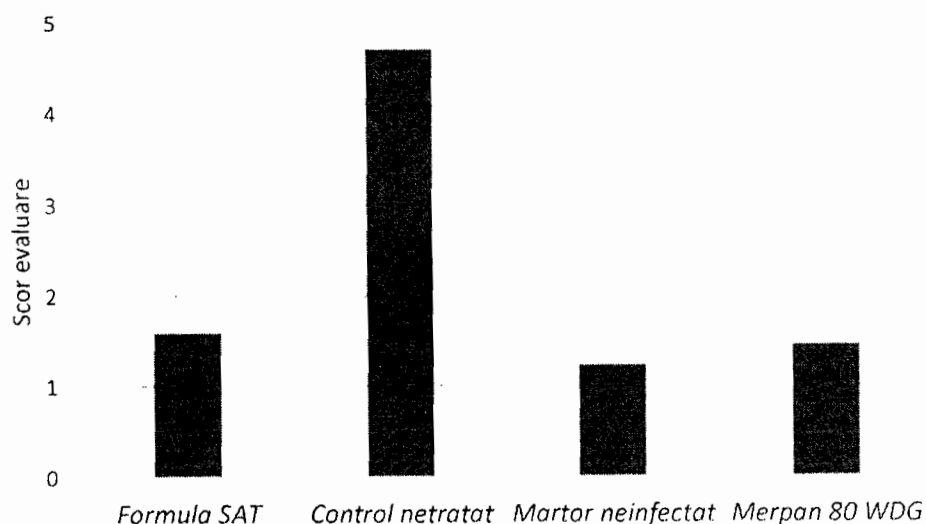


Figura 6. Evaluarea capacității de germinare a semințelor de tomate, în urma tratamentului formula SAT.

Rezultatele obținute în cazul tratamentului cu formula SAT a confirmat eficiența de inhibare a creșterii miceliului, obținută anterior *in vitro*, pe mediu de creștere PDA. Semințele tratate cu formula SAT au prezentat o capacitate de germinare bună, superioară controlului netratat. Scorul obținut în urma evaluării a fost de 1,53 (Figura 6). Capacitatea de germinare a semințelor a fost de 92 % foarte apropiată de valoarea înregistrată în cazul martorului neinfecat.

Efectului protector al tratamentului la sămânță cu formula SAT a fost examinat și prin

urmărirea dimensiunii și aspectul plantulelor rezultate din semințe tratate pe sol infectat cu *R. solani*. În urma evaluării s-a constatat faptul că în general tratamentul cu formula SAT a avut un efect benefic asupra germinației semințelor și a creșterii plăntuțelor de tomate.

Semințele de tomate au fost tratate cu formula SAT, prin imersare timp de 5 minute sau 10 minute. Deși au fost observate rezultate mai bune în cazul tratamentului timp de 10 minute, nu există diferențe majore între cele două variante.

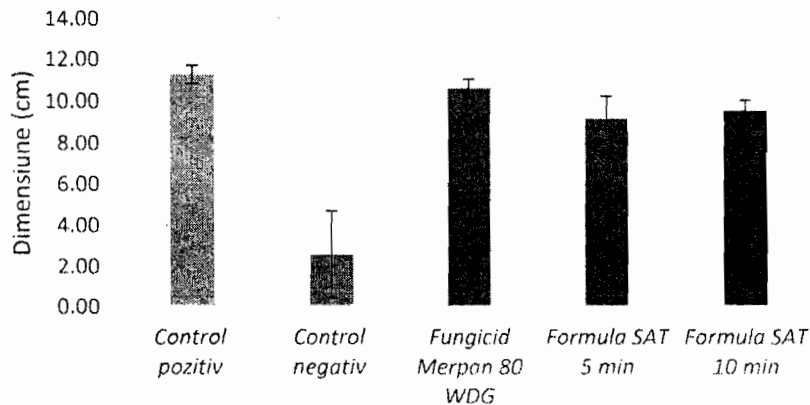


Figura 7. Dimensiunea tulpinii plăntuțelor de tomate tratate cu formula SAT.

După măsurarea tulpinii plăntuțelor, s-a constatat o dimensiune maximă a acestora în cazul tratamentului cu formula SAT, prin imersie pentru 10 minute, și anume, $9,61 \pm 0,47$ cm iar pentru tratamentul, timp de 5 minute, și anume, $9,22 \pm 1,05$ cm. Dimensiunile tulpinilor în cazul tratamentului cu fungicide au fost superioare tratamentului cu formula SAT, și anume, $10,63 \pm 0,44$ cm, nedepășind însă rezultatele pentru controlul neinfestat (figura 7.).

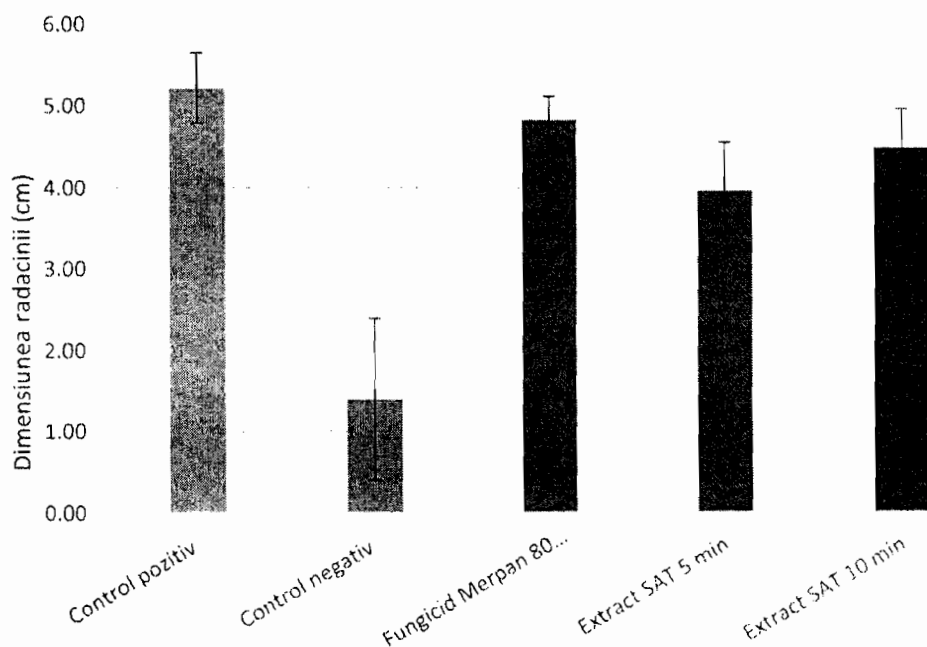


Figura 8. Dimensiunea rădăcinii plăntuțelor de tomate

După examinarea dimensiunii rădăcinilor, și a numărului și aspectului acestora, se confirmă efectul benefic al tratamentului cu formula SAT al semințelor de tomate, însă rezultatele obținute nu depășesc efectul fungicidului utilizat (figura 8.).

Exista în literatura de specialitate teste similare cu privire la evaluarea efectului benefic al unor extracte din plante asupra capacității de germinare a semințelor unor plante, în prezența inoculului de *R. solani*. Al-Rubaiee a realizat o serie de experimente pentru a determina efectul *R. solani* asupra germinării semințelor de bumbac și controlul infectării acestora prin folosirea unor extracte vegetale (Al-Rubaiee, 2008). Rezultatele au arătat ca șase din zece izolate ale ciupercii *R. solani* au suprimat complet germinarea semințelor, iar pentru celelalte izolate, procentul de germinare a semințelor a variat între 16 - 95 %. Controlul *R. solani* a fost testat prin utilizarea unei pulberi de conopidă (*Brassica oleracea botrytis*) în concentrație de 2 %. Acesta a inhibat cu 50 % creșterea *in vitro* a miceliului de *R. solani*. Alte extracte cu rezultate notabile au fost extractul din coaja de rodie (*Punica granatum*) și fructe de castravete amar (*Citrullus colocynthis*), cu o inhibare a creșterii miceliene de 75 și 50 %. Trecând la testarea capacității de germinare a semințelor de bumbac, rezultatele au demonstrat ca tratamentul cu extracte în alcool obținute din conopidă a avut efecte benefice asupra germinării semințelor, obținând un procent de germinare cu 50 % mai mare decât celelalte tratamente (Al-Rubaiee, 2008).

CONCLUZII

Datorită problemelor de natura economică, tehnică și de mediu, cât și reglementărilor legale în vigoare, combaterea și controlul fitopatogenilor este o sarcină dificil de realizat, și, prin urmare, formulările naturale complementare reprezintă o soluție.

Formula SAT a evidențiat o activitate antifungică ridicată împotriva fitopatogenilor *A. alternata*, *R. solani*, *P. infestans* și *Pythium* sp..

Testarea efectelor formulei SAT pe sistem vegetal a permis evidențierea faptului că, în general, acesta oferă un grad ridicat de protecție față de infecția fungică, apropiat de efectul unor fungicide consacrate.

În urma desfășurării testelor de germinație au fost evaluate mai multe variante experimentale: trei variante martor (controlul pozitiv reprezentat de semințe netratate menținute în sol neinfestat; controlul negativ reprezentat de semințelor netratate în sol infectat; semințelor tratate cu fungicid semănate în sol infectat) și varianta tratata corespunzător cu formula SAT.

Formula SAT a prezentat efecte benefice asupra semințelor tratate și semănate în sol inoculat cu *R. solani*. Scorul de evaluare de 1,53 și comparativ cu fungicidul utilizat cu un scor de 1,45, înseamnă că formula SAT nu numai că a asigurat un procent ridicat de germinare a semințelor tratate ci, în plus, a determinat un grad ridicat de protecție față de infecția cu *R. solani*. Rezultatele obținute permit concluzia că formula SAT ar putea fi utilizata ca tratament preventiv de biocontrol pentru prevenirea infecțiilor cu *R. solani*, la nivel de sol.

REVENDICARE

Formula SAT cu efect antimicrobian asupra patogenilor care produc boli la tomate, constituită din extract vegetal obținut prin macerare și ultrasonicare din amestec de 30-50% părți *Artemisia absinthium* (pelin), 25 – 40% părți *Salvia officinalis* (salvie) și 15 - 25% părți *Solanum lycopersicum* (tomate), părțile fiind exprimate în greutate.