



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2016 00851

(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),
SPLAUL INDEPENDENȚEI NR. 296,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

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

(54) BIOPREPARAT CU ACTIVITATE ANTIMICROBIANĂ ASUPRA
PHYTOPHTHORA INFESTANS AGENT PATOGEN AL MANEI

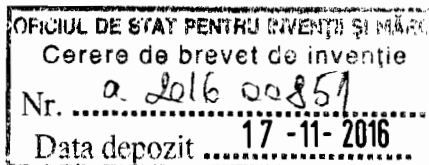
(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui biopreparat cu activitate antimicrobiană asupra *Phytophthora infestans*, agent patogen al manei tomatelor. Procedeu conform invenției constă în aceea că un amestec de plante: *Urtica dioica* (părțile aeriene), *Sambucus ebulus* (fructe), *Xanthium strumarium* (părțile aeriene și fructele nematurate) și *Humulus lupulus* (conurile), uscate și măcinate fin, se supune extracției alcoolice cu etanol 50% în raport 1:10 față de

amestecul vegetal, după care se supune ultrasonificării timp de 30 min, la temperatura de 35°C, putere 34 Watt, extractul rezultat se menține în repaus, la temperatura de 5...10°C, timp de 6 zile, după care se filtrează sub vid, filtratul rezultat având potențial de a inhiba *in vitro* agentul patogen al manei.

Revendicări: 1





DESCRIERE

TITLUL BREVETULUI:

BIOPREPARAT CU ACTIVITATE AMNTIMICROBIANĂ ASUPRA *PHYTOPHTHORA INFESTANS*, AGENT PATOGEN AL MANEI

INTRODUCERE

Mana tomatelor și a cartofului este una dintre cele mai devastatoare boli din agricultură, care a fost responsabilă pentru Marea Foamete din Irlanda de la mijlocul secolului 19. Această boală este cauzată de patogenul *Phytophthora infestans*, clasa Oomycetes, ordinul Peronosporales, familia Phytophthoraceae care poate infecta și distruge frunzele, tulpinile, fructele de tomate și tuberculii de cartofi (Nowicki și colab., 2011).

În ciuda progreselor înregistrate până în prezent în domeniul protecției plantelor, controlul acestei boli este încă departe de a fi realizat. De aceea, cercetările ce au drept scop, pe de o parte, clarificarea particularităților structurale, funcționale și genetice ale patogenului, cât și găsirea unor noi metode de tratament a plantelor care să le asigure protecția față de acest patogen sunt în continuă dezvoltare. O atenție specială a fost acordată extractelor vegetale care și-au dovedit eficiența în cazul altor fitopatogeni. Astfel, extracte obținute din 88 de specii de plante, distribuite în 44 de familii botanice au fost testate pentru capacitatea de inhibare a formării sporilor sau a creșterii în condiții *in vitro* a unor tulpini de *P. infestans* (Wang și colab., 2001). Dintre speciile testate de Wang și colab.(2001) extractele provenite de la 19 specii de plante au avut efecte importante împotriva patogenului: extractul de usturoi, în concentrație de 1 - 2 % a inhibat complet formarea de spori și dezvoltarea miceliului de *P. infestans*. De asemenea, în experimentele efectuate de Cao și colab. (2001) au fost utilizate extracte de usturoi (*Allium sativum*) și de coada calului (*Equisetum hyemale*), comparativ cu două produse comerciale pe bază de produse naturale, Bio-clean și Citronella Oil, fiind examinat efectul lor asupra germinării sporilor și creșterii hifelor de *P. infestans*. Testele au fost realizate pe frunze de cartof, iar controlul utilizat a fost apa distilată și un fungicid protector Chlorothanoil. Cea mai mare rată de inhibare a germinării a fost înregistrată pentru extractele de *A. sativum* și Bio-clean. Extractul de coada calului a demonstrat acțiune antifungică, însă mai slabă decât celelalte extracte. Citronella Oil nu a avut efect de inhibare a germinării sporilor, dar a redus rata de germinare de zoosporilor.

Extractele de usturoi proaspăt au avut efect inhibitor mai puternic decât extractul din bulbi de usturoi uscat asupra germinării sporangiilor și zoosporilor. Cu toate acestea, nu a existat însă nici o diferență semnificativă între extractele realizate din bulbi proaspeți și cele care au fost păstrate timp de o săptămână sub 4 °C. Efectul extractului din coada calului din material vegetal proaspăt nu a fost semnificativ superior față de extractul din material uscat. Testele cu privire la evaluarea efectului inhibitor al extractelor vegetale și al produselor pe bază de compuși naturali au fost efectuate *in vitro*, în laborator. Eficacitatea diferitelor extracte asupra creșterii hifelor patogenului a fost, în ordinea descrescătoare: Bio-clean, usturoi, coada calului și Citronella Oil. Nici unul dintre extractele din plante sau produsele vegetale nu a avut efecte curative asupra dezvoltării *P. infestans* pe frunze de cartof, atunci când au fost utilizate după infectarea plantelor. Bio-clean a avut efecte asemănătoare cu cele ale fungicidului Clorothanoil atunci când a fost aplicat cu trei zile mai devreme decât inocularea cu fungi (0,1 %). Extractul de usturoi (2 %) a avut efect intens de inhibare atunci când a fost utilizat o zi mai devreme sau în același timp cu inocularea patogenului, rata de inhibare ajungând la 89 % și respectiv 100 %. Comparativ cu controlul netratat, extractul de coada calului (4 %) și Citronella Oil (400 mg / kg) au avut unele efecte atunci când au fost utilizate cu 1 - 2 zile mai devreme decât inocularea cu patogen. Cu toate acestea tratamentele nu au fost eficiente pentru prevenirea bolii. Aceste rezultate au arătat că Bio-clean și usturoiul au proprietăți antifungice puternice, existând un mare potențial pentru utilizarea lor în protecția plantelor de cartofi împotriva *P. infestans* (Cao și colab., 2001).

Tot pentru controlul infecției cu *P. infestans* au fost analizate extracte de piper lung (*Piper longum*) obținute prin tratarea boabelor de piper mărunțite cu metanol. Extractul a fost fracționat în hexan, cloroform, acetat de etil, butanol și apă după care au fost dizolvate și diluate în dimetil sulfoxid (DMSO) și, respectiv, apă (fracțiunile hidrosolubile). Soluția obținută din fracția de hexan, la o concentrație de 1 mg / ml a redus cu 60 % uscarea plantelor inoculate cu fitopatogenul (Lee și colab., 2001).

De asemenea, în experimentele efectuate de Wang și colab. (2007) au fost testate extracte vegetale provenite de la șase specii de plante: *Galla chinensis* - frunze, *Potentilla erecta* - rădăcină, *Rheum rhabarbarum* - frunze și rădăcini, *Salvia officinalis* - frunze, *Sophora flavescens* - tulpină și *Terminalia chebula* - fructe. Testele s-au făcut pe frunze de cartof detașate, plantule și felii de tuberculi care au fost infectate cu *P. infestans*. Pe frunze detașate, extractele de *G. chinensis* (2 %), *R. rhabarbarum* (rizom, 2 %) și *S. flavescens* (2 %) au demonstrat că dețin un efect în controlul infecției, cu o eficiență de 96,67 % în cazul extractului de *G. chinensis*. Extractul de rizom de *R. rhabarbarum* (2 %) a avut cel mai mare

efect de inhibare a patogenului pe plantule, urmat de *S. flavescens* (2 %), *T. chebula* (1 %) și *G. chinensis* (2 %) (Wang și colab., 2007).

Mai recent, (Maharjan și colab., 2010) au utilizat extracte din 5 specii de plante: *Brassica nigra*, *Cinnamomum camphora*, *Eupatorium adenophorum*, *Lantana camara* și *Melia azedarach*, în concentrații diferite pentru efectele anti-*Phytophthora*, evidențiind că cel mai eficient extract a fost cel de *B. nigra*.

Includerea extractelor vegetale în mediul de cultură și apoi evaluarea gradului de inhibare a creșterii miceliului de *P. infestans* a fost utilizată pentru testarea activitatea antifungice a 26 de extracte de plante: extractele de *Xanthium strumarium*, *Lauris nobilis*, *Salvia officinalis* și *Styrax officinalis* au fost cele cu activitatea antifungică cea mai intensă, ele inhibând total creșterea miceliului de *P. infestans*. Celelalte extracte au prezentat o activitate moderată, iar creșterea zilnică a variat între 0,8 și 5,0 mm / zi, valoare semnificativ mai mică decât cea a variantei martor, netratată. Cea mai slabă activitate antifungică s-a înregistrat în cazul extractului obținut din *Cynodon dactylon*. Concentrația inhibitorie minimă (MIC) a extractelor a fost între 2 și 8 % (w/v). Extractul obținut din *X. strumarium* a produs cea mai mică valoare MIC, respectiv 2 %, valoare care se afla sub cea înregistrată pentru fungicidul standard Ridomil Gold mz 68 WP, utilizat pe post de control în experimentele derulate (Yusuf și colab., 2011).

În căutarea unui produs natural și ieftin, care ar putea induce răspunsuri de apărare în plantele cartof utile pentru rezistența la infecția cu *Phytophthora infestans*, agentul cauzator al manei, (Moushib și colab., 2013) a evaluat efectul antimicrobian al unui extract de sfeclă de zahăr („sugar beet extract” = SBE) provenit din produse reziduale rezultate din procesul de fabricare a zahărului. Testele au fost efectuate în condiții de seră, pe trei genotipuri de cartof având niveluri diferite de rezistență la *P. infestans* (două genotipuri sensibile: Desiree și Bintje și unul parțial rezistent: Ovatio). Tratamentul cu SBE a condus la reducerea semnificativă a dimensiunii leziunilor în mod asemănător cu un model similar rezultat prin aplicarea unui compus cunoscut ca fiind inductor al răspunsului de apărare, acidul β-aminobutiric (BABA). SBE aparent nu a avut nici un efect toxic asupra creșterii patogenului sau a germinării sporangiilor, în schimb, prin compușii fenolici pe care îi conține a activat la plantele tratate mecanismul de rezistență indusă.

Potențialul unor produse pe bază de extracte din plante pentru biocontrolul manei la plantele de cartof provocată de *Phytophthora infestans* a fost evaluat în teste realizate pe frunze detașate și pe plante sădite în seră (Stephan și colab., 2005). Pe baza unei evaluări a 22 de preparate și extracte din plante cele mai eficiente produse au fost reprezentate preparatele

comerciale ELOT-Vis, Serenade și Trichodex, precum și de extractele din plante de *Rheum rhabarbarum* și *Solidago canadensis*. Cu toate acestea, nici unul din tratamente nu a fost la fel de eficient ca tratamentul cu produse pe bază de cupru. Pentru a se stabili cea mai eficientă metodă de tratament, preparatele utilizate în testare au fost aplicate 24 de ore înainte de inocularea cu patogen sau după 90 de minute de la inocularea cu *P. infestans*. În general, efecte mai bune s-au obținut atunci când aplicarea tratamentelor a fost realizată cu 24 h înainte de inoculare. În aceste teste, produsul Trichodex nu a avut efecte notabile, în timp ce ELOT-Vis a dat cele mai bune rezultate atunci când este aplicat cu 1 zi înainte de inoculare. Serenade și extractele din *R. rhabarbarum* și *S. canadensis* (toate la concentrație 5 %), au fost eficiente atunci când au fost aplicate cu până la 3 zile înainte sau imediat după inocularea cu *P. infestans*. Rezultatele experimentelor pe plante în ghivece au indicat efecte directe asupra patogenului pentru toate tratamentele testate, cu excepția extractului de *S. canadensis*, care nu a avut efect curativ (Stephan și colab., 2005).

MATERIALE ȘI METODE

1. Materiale vegetale

Urtica dioica (urzica) aparține familiei Urticaceae, este o planta erbacee, care crește până la 150 cm înălțime, având în pământ un rizom subțire, cilindric, de culoare albicioasă, lung și ramificat. Tulpinile sunt drepte, cu 4 muchii, acoperite cu frunze opuse, dințate pe margini. Atât tulpina, cât și frunzele sunt prevăzute cu peri urzicători care în contact cu pielea produc urticarie (inflamație specifică, însoțită de usturime și prurit intens). Urzica crește pretutindeni, în locuri cultivate și necultivate, în șanțuri, pe lângă drumuri, pe marginea apelor, în păduri.

Pentru biopreparat se utilizează partea aeriană a plantei, uscată în aer liber, în locuri ferite de lumină puternică sau uscată cu aer cald, la o temperatură de 45 - 60 °C.

Sambucus ebulus (boz) aparține familiei Adoxaceae (Bolli, 1994). Este o plantă erbacee perenă. Crește în sălbăticie, pe pajiști, la marginea pădurilor și drumurilor, atât la munte, cât și la câmpie. Fructele sunt drupe baciforme aproape sferice, cu diametrul de cca. 4 mm, negre lucioase.

Pentru biopreparat se utilizează fructele plantei, uscate în aer liber, în locuri ferite de lumina puternică sau uscate cu aer cald, la o temperatură de 45 - 60 °C.

Xanthium strumarium (corneti) este o specie anuală, cu tulpina lipsită de spini, având frunze de tip palmat, care face parte din familia *Asteraceae*. Se găsește în special în luncile râurilor din sudul României, dar este larg răspândită și pe alte continente: America de Nord.

Brazilia, China, Malaezia și India.

Se utilizează partea aeriana a plantei și fructele nematurate, uscate în aceleași condiții ca și materialele vegetale anterioare.

Humulus lupulus (hamei) face parte din familia Cannabaceae. Plantă erbacee perenă, agățătoare, cu flori galbene-verzui. Hameiul este originar din Europa și a intrat în cultură începând din secolul VII. În flora spontană a României, hameiul crește în zonele umbroase de pe lângă apele curgătoare, la marginea pădurilor, prin crânguri, mai ales la deal și prin depresiuni sau în luncile umbrite de la șes.

Se utilizează conurile (inflorescențele femele) recoltate în timpul înfloririi, în zilele însorite din lunile august și septembrie, când devin verzui sau galbene. Uscarea se face în locuri umbrite și aerisite (încăperi, poduri sau magazii), așezate în straturi foarte subțiri, fără a fi întoarse.

După uscare, toate materialele vegetale se macină fin.

2. 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.

Mediu cu secară (RYE A și RYE B)

Ingredientele și cantitățile corespunzătoare rețetelor celor două tipuri de medii cu secară, RYE A, și respectiv, RYE B, utilizate în experimentele realizate sunt prezentate în tabelul 1.

Tabel 1. Ingredientele necesare pentru mediul de secară

Ingrediente (pentru 1 L)	Rye A (pentru întreținerea culturii)	Rye B (pentru sporulare)
Secară	60 g	60 g
Sucroză	20 g	20 g
β-sitosterol	0	0,05 g
Agar	15 g	15 g

a) Rye A

1. Peste boabele de secară se adaugă 100 ml apă distilată, și se lasă la încolțit pentru 3 de ore (dacă se adaugă mai puțină apă, boabele vor germina mai repede, după aproximativ 24 - 30 ore).
2. Se filtrează și se păstrează lichidul rezultat.
3. Se pasează boabele cu un blender, pentru aproximativ 2 minute, se adaugă suficientă apă distilată și se pun pe baie de apă pentru exact 3 ore, la 50 ° C.
4. Se trece amestecul printr-o sită și se aruncă sedimentul.
5. Se combină supernatantul original cu lichidul rezultat după filtrare. Se adaugă sucroza și agarul, și se completează cu apă distilată până la volumul de 1 litru.
6. Se autoclavează mediul obținut la 121 ° C pentru 15 minute și se toarnă în plăci Petri.

b) Rye B

1. Peste boabele se secară se adaugă 100 ml apă distilată și se lasă la încolțit pentru 3 de ore (dacă se adaugă mai puțină apă, boabele vor germina mai repede, după aproximativ 24 -30 ore).
2. Se filtrează și se păstrează lichidul rezultat.
3. Se adaugă suficientă apă distilată pentru a acoperi boabele și se fierb timp de 1 oră.
4. Se filtrează soluția prin tifon și se combină cu filtratul inițial.
5. Se adaugă sucroza, agarul și β -sitosterolul și se completează cu apă distilată până la volumul de 1 litru.
6. Se autoclavează mediul obținut la 121 ° C pentru 15 minute și se toarnă în plăci Petri.

V8 Juice Agar

S-a preparat după următoarea rețetă.

Suc de legume V8 200,0 ml

CaCO₃ 2,0 g

Agar..... 15,0 g

β -sitosterol 0,05 g

Se adaugă apă distilată până la 1,0 L, se ajustează pH-ul la 7,2. Amestecul se omogenizează și se sterilizează în autoclav timp de 15 minute la 121 ° C.

3. Reactivi

În testele de microbiologie au fost folosite mediile de cultura: Potato Dextrose Agar (PDA) - Liofilchem. Antifungicele de sinteză au fost furnizate de SC Aectra Agrochemicals

SA. Toți reactivii și solvenții au avut puritate analitică.

4. Metode de preparare și testare

Extracție hidroalcoolică cu ultrasonicare

Pentru extracția prin ultrasonicare, peste materialul vegetal mărunțit se adăugă solvențul (etanol 50%) în raport 1:10 (w:v), iar amestecul rezultat se omogenizează prin agitare ușoară. Pentru ultrasonicare se utilizează următorii parametri de lucru: timp de sonicare 30 minute, temperatura 35 ° C, putere 34 Watt. Materialul ultrasonicat este supus percolării. Practic, amestecul se lasă la macerat timp de trei ore, la temperatura camerei, într-un recipient de sticlă bine sigilat, după care se introduce treptat în percolator. Robinetul de la baza percolatorului se lasă deschis până când lichidul începe să curgă prin orificiul de la baza percolatorului. Pentru o extracție optimă, viteza de percolare se reglează astfel încât în 24 de ore să se percoleze o cantitate de lichid egală cu 1.5 x cantitatea de material vegetal utilizat. Extractul astfel obținut se lasă în repaus, la temperatura de 5 – 10 ° C, timp de 6 zile, după care se filtrează sub vid, filtratul reprezentând biopreparatul UBCH.

Testarea activității antifungice

Efectul biopreparatului UBCH asupra creșterii miceliene a fitopatogenului de interes a fost testat prin metoda includerii biopreparatului în mediul de cultură (Poison Food Method sau Radial Growth Method). Aceasta metodă presupune încorporarea unei cantități adecvate din biopreparat în mediul de creștere (V8, răcit la 40 – 50 ° C). Controlul negativ a fost reprezentat de plăci Petri conținând mediu netratat. Controlul pozitiv a fost reprezentat de placi 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 16 zile, moment în care colonia din placa de control a atins marginea vasului. Măsurarea diametrului coloniei a fost înregistrată zilnic. Procentul de inhibare a creșterii miceliului, I (%), ca urmare a tratamentului cu biopreparat 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 biopreparat (Ogbebor și colab., 2008).

Testarea efectului biopreparatului pe frunze detașate

Testul pe frunze detașate reprezintă un model experimental general acceptat, fiind o

tehnică utilizată în mod curent pentru a evalua rezistența izolatelor de *P. infestans* și a altor fitopatogeni la diferite produse sau pe diverse soiuri de plante, în condiții de laborator. Testul pe frunze detașate s-a dovedit a fi o soluție practică datorită simplității sale, care poate reduce în mod substanțial atât costurile, cât și durata unui program de screening după cum au raportat anterior alți autori (Irzhansky și colab., 2006, Nelson, 2006, Lebecka, 2008). Evaluarea răspunsului plantelor, în urma tratamentului cu biopreparatul UBCH, la infestarea frunzelor de tomate cu *P. infestans* a fost realizată după o metodă descrisă anterior de (Vleeshouwers și colab., 1999, Cowley și colab., 2012, Foolad și colab., 2014) cu unele modificări.

Frunzele utilizate în experimente au provenit din răsaduri crescute în seră, în condiții controlate, în sol sterilizat. Pentru colectarea frunzelor au fost folosite plante sănătoase, netratate în prealabil cu fungicide sintetice, cu vârsta de 8 - 9 săptămâni. Numărând din vârful plantei, a fost desprinsă de pe tulpina, a treia până la a cincea frunză compusă și au fost întrebuințate în teste în maxim 2 ore de la recoltare. Aceste frunze compuse, prezentând 6 - 8 frunzulițe au fost înfipite în burete de florărie (Oasis®) saturat cu apă, și așezate pe hârtie de filtru umedă, în tăvițe de aluminiu.

Frunzele detașate, așezate în tăvițe de aluminiu au fost tratate cu biopreparatul din amestecul de plante utilizat anterior în testele antifungice preliminare, efectuate *in vitro*, în plăci Petri, pe mediu de creștere. Tratamentul s-a aplicat pe câte 5 frunzulițe aflate pe aceeași frunză compusă prin pulverizarea soluției pe suprafața superioară a frunzei. Controlul pozitiv a fost reprezentat de o soluție de Mancozeb în concentrație de 0,2 %. Acest fungicid este utilizat în mod curent în practicile horticole de prevenire și tratare a infectării cu *P. infestans* a culturilor de tomate, cartof și vinete. Controlul negativ a fost reprezentat de o soluție de apă distilată sterilă.

În vederea inoculării materialului vegetal cultura de *P. infestans* utilizată în teste a fost mentinută pe mediu de seară, suplimentat cu 2 % (w / v) sucroză (Caten și colab., 1968) și incubată la 20 °C la întuneric, timp de 14 zile. În vederea inoculării, o placă Petri pe care creșterea miceliană a atins marginile plăcii, a fost inundată cu apă distilată sterilă rece (4 °C), iar suspensia de sporagii a fost preluată într-o eprubetă și etanșată. Zoosporii sunt eliberați după incubare pentru o perioadă de 1 - 2 ore, la o temperatură de 4 °C. După incubare, suspensia a fost filtrată, iar concentrația a fost ajustată corespunzător. Frunzele au fost inoculate la 24 de ore de la tratamentul cu biopreparat sau soluții control, cu o cantitate de 0,05 - 0,15 ml de inocul proaspăt preparat.

Evaluarea manifestării infecției cu P. Infestans: leziunile provocate de mană pe

suprafața fiecărei frunze detașate au fost observate și cuantificate la șapte zile după inoculare, pe baza utilizării unei scale de evaluare descrisă anterior în literatură (Khalid și colab., 2012), cu unele modificări (tabelul 2).

Tabelul 2. Scala pentru evaluarea severității simptomelor provocate de infecția cu *P. infestans* pe frunzele detașate.

Scor evaluare	Severitatea simptomelor manifestate pe frunzele detașate	% Indexul manifestării infecției cu mană	Răspunsul infecției cu mană la tratamentul aplicat
0	Nu există simptome vizibile.	0	Foarte susceptibilă
1	Există leziuni de dimensiuni mici, care acoperă maxim 10% din suprafața totală a frunzei	0,01 - 10	Susceptibilă
2	Leziunile prezente acoperă maxim 25% din suprafața totală a frunzei.	10,01 - 25	Tolerantă
3	Leziunile prezente acoperă maxim 50 % din suprafața totală a frunzei.	25. 01 - 50	Rezistentă
4	Leziunile prezente acoperă maxim 75 % din suprafața totală a frunzei.	50,01 - 75	Foarte rezistentă
5	Frunzele sunt necrozate, deshidratate, acoperite în mare parte de leziuni	> 75,01	Imună

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Testarea activității antifungice a biopreparatului UBCH pe placi Petri

A fost evaluat efectul antifungic al biopreparatului UBCH față de tulpina de *Phytophthora infestans*. Testarea efectului antifungic s-a realizat prin încorporarea biopreparatului (4 %) în mediul de cultură, pe parcursul a 16 zile de incubare.

Creșterea miceliului de *P. infestans* pe plăcile martor (fără biopreparat) a devenit clară începând cu a 6-a zi de la inoculare. În schimb, pe mediul de cultură în care s-a introdus biopreparatul UBCH dezvoltarea miceliului nu a fost observată decât după nouă zile de la inoculare, atunci când diametrul miceliului a fost de 11 mm. Evaluarea statistică a dimensiunii diametrului culturii fungice măsurate pentru cele trei repetiții au arătat că nu există o diferență semnificativă între probe ($P < 0,05$).

În varianta martor miceliul fungic a atins marginea plăcilor (diametru de 90 mm) la 10 zile după începutul dezvoltării (16 zile după inoculare). În schimb, în cazul variantei în care s-a introdus în mediu biopreparat UBCH, în același moment al evaluării (16 zile de la inoculare) diametrul culturii fungice a fost de cca 48 mm (figura 1.). Există diferențe

statistice între martori (M - alcool și M – martor netratat) și tratament (P <0,05).

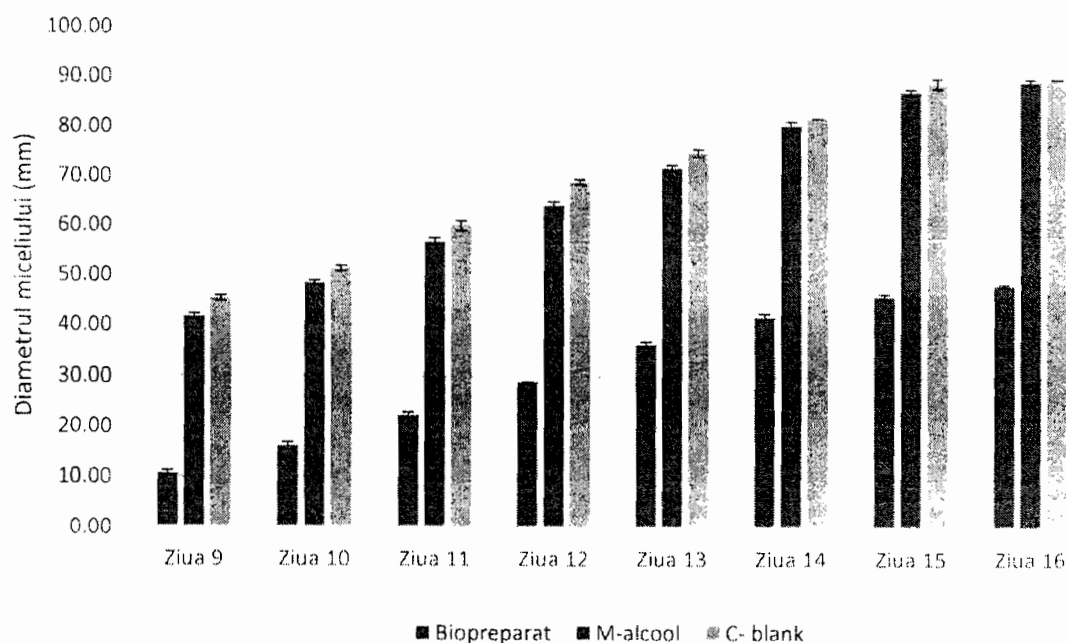


Figura 1. Creșterea diametrului miceliului de *P. infestans* pe mediu conținând biopreparatul UBCH, etanol (M - alcool) sau martor netratat (C - blank).

Prin urmare, atunci când s-a încorporat biopreparatul UBCH în mediul de creștere, creșterea miceliului a fost inhibată de către acesta comparativ cu creșterea pe cele două seturi de placi de control, ceea ce demonstrează activitatea inhibitorie a biopreparatului asupra *P. infestans*.

Rezultatele obținute au evidențiat faptul că biopreparatul UBCH obținut din amestecul de plante posedă un efect inhibitor asupra creșterii miceliului de *P. infestans*.

Evidențierea efectelor antifungice împotriva fitopatogenului *Phytophthora infestans* prin teste pe frunze detașate

Evaluarea dezvoltării manei pe frunze de tomate detașate a fost efectuată pe baza apariției simptomelor bolii și urmărirea ratei de dezvoltare a punctelor de necroză. Scala de evaluare a infectării plantelor propusă pentru analiza experimentului derulat pe frunzele detașate este o scală de tip interval, care ia în considerare procentul de necrozare a suprafeței frunzelor, inclusiv a nervurilor acestora. Îngălbenirea și alte modificări de culoare nu au fost considerate ca fiind indicatori fiabili de boală, deoarece frunzele detașate se pot deshidrata uneori și pot deveni clorotice chiar și în absența agentului patogen. Astfel a fost utilizată o scală de la 0 (frunze care nu prezintă infecție, sau prezintă leziuni de dimensiuni scăzute) la 5 (frunze necrozate în totalitate, uscate).

Inoculările s-au realizat pe suprafața frunzelor detașate, utilizând ca martori frunze infectate cu *P. infestans* tratate cu apă distilată sau cu Mancozeb 2 %, iar examinarea leziunilor s-a făcut pe parcursul a șapte zile de incubare.

Primele semne de infecție au apărut pe frunzele reprezentând martorul negativ (inoculat cu fitopatogenul și tratat cu apă distilată), la 48 ore de la inoculare. După 7 zile de la inoculare, frunzele tratate cu apă distilată sterilă au fost afectate de infecția cu *P. infestans* în proporție de peste 80 %, prezentând pete de culoare brun spre negru cu marginea îngălbenită și un aspect deshidratat, casant, necrotic.

În ceea ce privește martorul tratat cu fungicid Mancozeb în concentrație de 2 %, după 7 zile de la inoculare, doar 50 % din frunzele infectate prezentau leziuni, pe o suprafață ce a acoperit sub 10 % din suprafața totală a frunzei, corespunzător unui scor de 1 pe scala utilizată în evaluare.

În cazul frunzelor tratate cu biopreparatul UBCH simptomele de boală au fost mult mai reduse și au apărut mai târziu, în general în mod asemănător aspectelor evidențiate în cazul variantei martor în care pentru tratament s-a utilizat fungicidul Mancozeb.

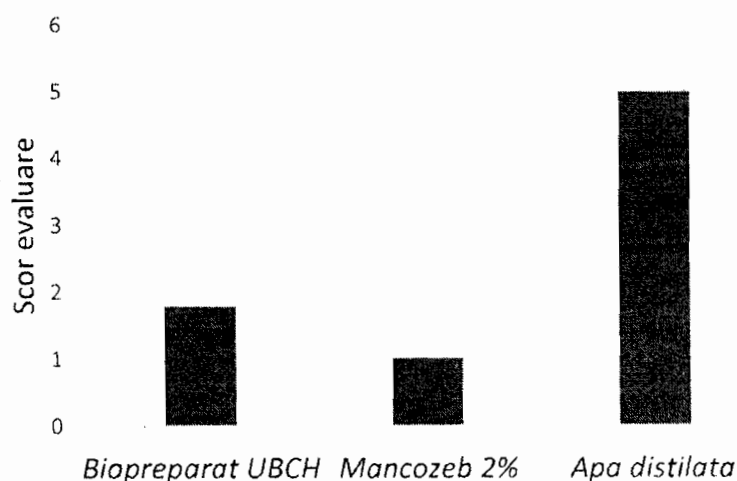


Figura 2. Evaluarea severității bolii pe frunze detașate.

Biopreparatul UBCH a indus în frunzele detașate reacții similare cu cele ale fungicidului aplicat, rezultând un index al severității bolii de 0,01 – 10 %, corespunzător unui scor de 1 pe scala descrisă anterior (tabelul 2., figura 2.). Biopreparatul UBCH a prezentat activitate ridicată de inhibare cu peste 70% a dezvoltării culturii de *P. infestans* în plăci, prin interacțiune directă pe mediul de cultură, astfel că rezultatele obținute prin testele pe frunze detașate confirmă rezultatele anterioare, tratamentele cu biopreparatul UBCH asigurând un

grad ridicat de protecție la nivelul leziunilor de pe frunze infectate cu *P. infestans*.

De remarcat că rezultatele obținute cu acest sistem experimental corespund în mare măsură cu rezultatele evidențiate la nivel de interacții pe mediul de cultură. Rezultatele obținute în urma măsurării dimensiunilor leziunilor, după 7 zile de la inoculare, au demonstrat faptul că tratamentul preventiv aplicat frunzelor detașate a prezentat un efect benefic în cazul utilizării biopreparatului obținut din amestecul de plante.

Rezultatele obținute în cadrul acestor experimente sunt în concordanță cu alte studii descrise în literatură, dar pentru alte surse vegetale utilizate pentru obținerea de extracte. De exemplu, suprimarea dezvoltării manei pe plantele de tomate a fost realizată cu extracte etanolice obținute din bujor salbatic (*Paeonia suffruticosa*) și iederă (*Hedera helix*). Ambele extracte au inhibat eliberarea de zoosporii și sporularea *P. infestans* (Röhner și colab., 2004). Pentru a controla infestarea cu *P. infestans* în culturile de tomate, eficiența tratamentelor cu extracte din *Hedera helix* și *Paeonia suffruticosa* a fost testată cu ajutorul unui sistem de gazdă - patogen. Astfel, au fost aplicate tratamente pe frunze detașate cu 2 și, respectiv, 7 zile înainte de inoculare artificială. Frunzele astfel tratate au fost menținute la 17 °C și o umiditate relativă a aerului de 100 %. 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). Activitatea antifungică a unor extracte din rubarba (*Rheum rhabarbarum*) și *Solidago canadensis* a fost evaluată utilizând testarea pe frunze detașate de cartof și pe plante crescute în ghiveci. Aceste extracte au redus în mod semnificativ infectarea frunzelor cu *P. infestans*.

Aplicarea preventivă a extractelor a avut efecte în concentrație de 50 %, cu trei zile înainte de inoculare, și imediat după inoculare (Stephan și colab., 2005). Pe frunze detașate, extractele obținute din *G. chinensis* (2 %), *R. rhabarbarum* (rizom, 2 %) și *S. flavescens* (2 %) au demonstrat un efect semnificativ, ajungând la o eficacitate a controlului de 96,67 %, *G. chinensis*. În testele pe răsaduri, extractul din *R. rhabarbarum* (rizom, 2 %) a prezentat cel mai ridicat efect inhibitor, urmat de *S. flavescens* (2 %), *T. chebula* (1 %), și *G. chinensis* (2 %). Cu o eficiență a inhibării de 91,67 %, 75,00 %, 70,24 % și, respectiv, 64,29 %, în a șaptea zi după inoculare (Wang și colab., 2007).

CONCLUZII

Rezultatele testelor de evaluare a activității antifungice au arătat potențialul biopreparatului UBCH de a inhiba în condiții *in vitro* agentul patogen al manei, *Phytophthora infestans*.

Testarea efectelor biopreparatului UBCH pe sistem vegetal a permis evidențierea

faptului că acestea, în general, oferă un grad ridicat de protecție față de infecția fungică, apropiat de efectul unor fungicide consacrate.

Biopreparatul UBCH a indus în frunzele detașate reacții similare cu cele ale fungicidului aplicat, rezultând un index al severității bolii de 0,01 – 10 % ceea ce înseamnă că rezultatele obținute în condiții de laborator au fost confirmate prin testele pe plantă.

Rezultatele obținute permit concluzia că biopreparatul UBCH din amestec de plante ar putea fi utilizat ca agent de biocontrol pentru prevenirea infecțiilor cu *Phytophthora infestans*.

BIBLIOGRAFIE

- Bolli, R., 1994. *Revision of the Genus Sambucus*, J. Cramer.
- Cao, K.-Q. and A. H. C. van Bruggen, 2001. "Inhibitory efficacy of several plant extracts and plant products on *Phytophthora infestans*." *Journal of Agricultural University of Hebei* 1000-1573(2): 90-96.
- Carabet, A., I. Grozea, R. Stef and A.-M. Badea, 2009. "The control potential of some Plant Extracts against Downy Mildew in Tomato." *International Symposium on Agriculture, Proceedings of Conference*: 45-48.
- Caten, C. E. and J. L. Jinks, 1968. "Spontaneous variability of single isolates of *Phytophthora infestans* I. Cultural variation." *Canadian Journal of Botany* 46: 329-347.
- Cowley, R. B., D. J. Lockett, J. D. I. Harper and G. J. Ash, 2012. "Development of a reliable and rapid detached leaf assay to detect resistance to the fungal disease phomopsis leaf blight, caused by *Diaporthe toxica*, in *Lupinus albus*." *Canadian Journal of Plant Pathology* 34(3): 401-409.
- Foolad, M. R., M. T. Sullenberger and H. Ashrafi, 2014. "Detached-Leaflet Evaluation of Tomato Germplasm for Late Blight Resistance and Its Correspondence to Field and Greenhouse Screenings." *Plant Disease* 99(5): 718-722.
- Irzhansky, I. and Y. Cohen, 2006. "Inheritance of resistance against *Phytophthora infestans* in *Lycopersicon pimpinellifolium* L3707." *Euphytica* 149(3): 309-316.
- Khalid, P. A., Y. S. Muhammad, A. Muhammad, A. Shaukat, S. Nighat and T. E. Muhammad, 2012. "Resistance Of *Solanum* Species To *Phytophthora Infestans* Evaluated In The Detached-Leaf And Whole-Plant Assays." *Pakistan Journal of Botany* 44(3): 1141-1146.
- Lebecka, R., 2008. "Host-pathogen interaction between *Phytophthora infestans* and *Solanum nigrum*, *S. villosum*, and *S. scabrum*." *European Journal of Plant Pathology* 120(3): 233-240.
- Lee, S.-E., B.-S. Park, M.-K. Kim, W.-S. Choi, H.-T. Kim, K.-Y. Cho, S.-G. Lee and H.-S. Lee, 2001. "Fungicidal activity of piperonaline, a piperidine alkaloid derived from long pepper, *Piper longum* L., against phytopathogenic fungi." *Crop Protection* 20(6): 523-528.
- Maharjan, B. L., K. Shrestha and S. Basnyat, 2010. "Botanical Control of Late Blight of

- Potato*." Nepal Journal of Science and Technology 11: 37-40.
- Moushib, L., J. Witzell, M. Lenman, E. Liljeroth and E. Andreasson, 2013. "Sugar beet extract induces defence against *Phytophthora infestans* in potato plants." European Journal of Plant Pathology 136(2): 261-271.
- Nelson, H. E., 2006. "Bioassay to detect small differences in resistance of tomato to late blight according to leaf age, leaf and leaflet position, and plant age." Australasian Plant Pathology 35(3): 297-301.
- Nowicki, M., M. R. Foolad, M. Nowakowska and E. U. Kozik, 2011. "Potato and Tomato Late Blight Caused by *Phytophthora infestans*: An Overview of Pathology and Resistance Breeding." Plant Disease 96(1): 4-17.
- Ogbebor, O. N. and A. T. Adekunle, 2008. "Inhibition of *Drechslera heveae* (Petch) M. B. Ellis, causal organism of Bird's eye spot disease of rubber (*Hevea brasiliensis* Muell Arg.) using plant extracts." African Journal of General Agriculture 4(1): 19-26.
- Röhner, E., A. Carabet and H. Buchenauer, 2004. "Effectiveness of plant extracts of *Paeonia suffruticosa* and *Hedera helix* against diseases caused by *Phytophthora infestans* in tomato and *Pseudoperonospora cubensis* in cucumber." Journal of Plant Diseases and Protection 111(1): 83-95.
- Stephan, D., A. Schmitt, S. M. Carvalho, B. Seddon and E. Koch, 2005. "Evaluation of biocontrol preparations and plant extracts for the control of *Phytophthora infestans* on potato leaves." European Journal of Plant Pathology 112(3): 235-246.
- Vleeshouwers, V. A. A., W. van Dooijeweert, L. C. Paul Keizer, L. Sijpkens, F. Govers and L. Colon, 1999. "A Laboratory Assay for *Phytophthora infestans* Resistance in Various *Solanum* Species Reflects the Field Situation." European Journal of Plant Pathology 105(3): 241-250.
- Wang, S., T. Hu, F. Zhang, H. R. Forrer and K. Cao, 2007. "Screening for plant extracts to control potato late blight." Frontiers of Agriculture in China 1(1): 43-46.
- Wang, S., X. Wang, J. Lu and K. Cao, 2001. "Screening of Chinese herbs for the fungitoxicity against *Phytophthora infestans*." Journal of Agricultural University of Hebi 24: 101-107.
- Yusuf, Y., I. Kadioğlu, A. Gökçe, İ. Demirtaş, N. Gören, H. Çam and M. Whalon, 2011. "In vitro antifungal activities of 26 plant extracts on mycelial growth of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary." African Journal of Biotechnology 10(14): 2625-2629.

REVENDICARE

Invenția se referă la biopreparatul UBCH cu activitate antimicrobiană asupra agentului patogen al manei *Phytophthora infestans*, obținut prin extracție hidroalcoolică și ultrasonicare, dintr-un amestec de plante (5...25% părți *Urtica dioica*, 20...55% părți *Sambucus ebulus*, 10...30% părți *Xanthium strumarium* și 5...30% părți *Humulus lupulus* - părțile fiind exprimate în greutate).