



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2016 00851**

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

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **28/01/2022** BOPI nr. 1/2022

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

(73) Titular:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
ȘTIINȚE BIOLOGICE,
SPLAIUL 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 TUGULEA 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**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**CAO KEQIANG, ARIENA H. C. VAN
BRUGGEN, "INHIBITORY EFFICACY OF
SEVERAL PLANT EXTRACTS AND PLANT
PRODUCTS ON PHYTOPHTHORA
INFESTANS", JOURNAL OF
AGRICULTURAL UNIVERSITY OF HABEI,
1000-1573(2), 90-96, 2001; ALIN CARABET,
IOANA GROZEA, RAMONA STEF,
ANA-MARIA BADEA, "THE CONTROL
POTENTIAL OF SOME PLANT EXTRACTS
AGAINST DOWNY MILDEW IN TOMATO",
INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON
AGRICULTURE, PROCEEDINGS OF
CONFERENCE, PP. 45-48, 2009**

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



RO 132519 B1

1 Invenția se referă la un biopreparat cu activitate antimicrobiană asupra *Phytophthora*
2 *infestans*, agent patogen al manei, având aplicații în agricultură

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

8 În ciuda progreselor înregistrate până în prezent în domeniul protecției plantelor,
9 controlul acestei boli este încă departe de a fi realizat. De aceea, cercetările ce au drept
10 scop, pe de o parte, clarificarea particularităților structurale, funcționale și genetice ale pato-
11 genului, cât și găsirea unor noi metode de tratament a plantelor care să le asigure protecția
12 față de acest patogen sunt în continuă dezvoltare. O atenție specială a fost acordată extrac-
13 telor vegetale care și-au dovedit eficiența în cazul altor fitopatogeni.

14 Astfel, extracte obținute din 88 de specii de plante, distribuite în 44 de familii botanice
15 au fost testate pentru capacitatea de inhibare a formării sporilor sau a creșterii în condiții *in*
16 *vitro* a unor tulpini de *P. infestans* (Wang și colab., 2001). Dintre speciile testate de Wang și
17 colab.(2001) extractele provenite de la 19 specii de plante au avut efecte importante
18 împotriva patogenului: extractul de usturoi, în concentrație de 1-2% a inhibat complet forma-
19 rea de spori și dezvoltarea miceliului de *P. infestans*.

20 De asemenea, în experimentele efectuate de Cao și colab. (2001) au fost utilizate
21 extracte de usturoi (*Allium sativum*) și de coada calului (*Equisetum hyemale*), comparativ cu
22 două produse comerciale pe bază de produse naturale, Bio-clean și *Citronella Oil*, fiind
23 examinat efectul lor asupra germinării sporilor și creșterii hifelor de *P. infestans*. Testele au
24 fost realizate pe frunze de cartof, iar controlul utilizat a fost apa distilată și un fungicid
25 protector Chlorothanoil. Cea mai mare rată de inhibare a germinării a fost înregistrată pentru
26 extractele de *A. sativum* și Bio-clean. Extractul de coada calului a demonstrat acțiune
27 antifungică, însă mai slabă decât celelalte extracte. *Citronella Oil* nu a avut efect de inhibare
28 a germinării sporilor, dar a redus rata de germinare de zoosporilor.

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

RO 132519 B1

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 chloroform, 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 activității 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 află 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 niciun 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

RO 132519 B1

1 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
3 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 h
5 înainte de inocularea cu patogen sau după 90 min de la inocularea cu *P. infestans*. În
general, efecte mai bune s-au obținut atunci când aplicarea tratamentelor a fost realizată cu
7 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
9 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
11 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.*
13 *canadensis*, care nu a avut efect curativ (Stephan și colab., 2005).

Materiale și metode

15 1. Materiale vegetale

Urtica dioica (urzica) aparține familiei *Urticaceae*, este o plantă erbacee, care crește
17 până la 150 cm înălțime, având în pământ un rizorn subțire, cilindric, de culoare albicioasă,
lung și ramificat. Tulpinile sunt drepte, cu 4 muchii, acoperite cu frunze opuse, dințate pe
19 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
21 pretutindeni, în locuri cultivate și necultivate, în șanțuri, pe lângă drumuri, pe marginea
apelor, în păduri.

23 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.

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

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

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

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

37 *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
39 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
41 deal și prin depresiuni sau în luncile umbrite de la șes.

Se utilizează conurile (inflorescențele femele) recoltate în timpul înfloririi. În zilele
43 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
45 a fi întoarse.

După uscare, toate materialele vegetale se macină fin.

RO 132519 B1

Biopreparatul cu activitate antimicrobiană asupra *Phytophthora infestans*, agent patogen al manei, este obținut prin extracție hidroalcoolică și ultrasonicare. Cota de participare a fiecărei plante pentru formarea extractului vegetal cu rol antimicrobian este: 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. 1
3
5

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 min în aproximativ 500 ml de apă; după filtrare prin tifon se adaugă glucoza (dextroză) (20 g/L) și agar - 20 g/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 min 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. 7
9
11
13
15

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. 17
19

Ingredientele necesare pentru mediul de secară

Tabelul 1

| Ingrediente (pentru 1 L) | RyeA (pentru întreținerea culturii) | RyeB (pentru sporulare) |
|--------------------------|-------------------------------------|-------------------------|
| Secară | 60 g | 60 g |
| Sucroză | 20 g | 20 g |
| B-sitosterol | 0 | 0,05 g |
| Agar | 15 g | 15 g |

 21
23
25
27

a. Rye A

1. Peste boabele de secară se adaugă 100 ml apă distilată, și se lasă la încolțit pentru 3 h (dacă se adaugă mai puțină apă, boabele vor germina mai repede, după aproximativ 24-30 h). 29
31

2. Se filtrează și se păstrează lichidul rezultat. 33

3. Se pasează boabele cu un blender, pentru aproximativ 2 min, se adaugă suficientă apă distilată și se pun pe baia de apă pentru exact 3 h, la 50°C. 35

4. Se trece amestecul printr-o sită și se aruncă sedimentul. 37

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 L. 39

6. Se autoclavează mediul obținut la 121°C pentru 15 min și se toarnă în plăci Petri. 39

b. Rye B

1. Peste boabele de secară se adaugă 100 ml apă distilată și se lasă la încolțit pentru 3 h (dacă se adaugă mai puțină apă, boabele vor germina mai repede, după aproximativ 24-30 h). 41
43

2. Se filtrează și se păstrează lichidul rezultat. 45

3. Se adaugă suficientă apă distilată pentru a acoperi boabele și se fierb timp de 1 h. 45

RO 132519 B1

1 4. Se filtrează soluția prin tifon și se combină cu filtratul inițial.
2 5. Se adaugă sucroza, agarul și β -sitosterolul și se completează cu apă distilată până
3 la volumul de 1 L.

4 6. Se autoclavează mediul obținut la 121°C pentru 15 min și se toarnă în plăci Petri.
5 *V8 Juice Agar*

6 S-a preparat după următoarea rețetă.

7 Suc de legume V8 200,0 ml;

8 CaCO_3 2,0 g;

9 Agar 15,0 g;

10 β -sitosterol 0,05 g.

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

13 3. Reactivi

14 În testele de microbiologie au fost folosite mediile de cultură: Potato Dextrose Agar
15 (PDA) - Liofilchem. Antifungicele de sinteză au fost furnizate de SC Aectra Agrochemicals
16 SA. Toți reactivii și solvenții au avut puritate analitică.

17 4. Metode de preparare și testare

18 *Extracție hidroalcoolică cu ultrasonicare*

19 Pentru extracția prin ultrasonicare, peste materialul vegetal mărunțit se adaugă
20 solvențul (etanol 50%) în raport 1:10 (w:v), iar amestecul rezultat se omogenizează prin
21 agitare ușoară. Pentru ultrasonicare se utilizează următorii parametri de lucru: timp de
22 sonicare 30 min, temperatura 35°C, putere 34 Watt. Materialul ultrasonicat este supus
23 percolării. Practic, amestecul se lasă la macerat timp de 3 h, la temperatura camerei, într-un
24 recipient de sticlă bine sigilat, după care se introduce treptat în percolator. Robinetul de la
25 baza percolatorului se lasă deschis până când lichidul începe să curgă prin orificiul de la
26 baza percolatorului. Pentru o extracție optimă, viteza de percolare se reglează astfel încât
27 în 24 h să se percoleze o cantitate de lichid egală cu 1,5 x cantitatea de material vegetal
28 utilizat. Extractul astfel obținut se lasă în repaus, la temperatura de 5-10°C, timp de 6 zile,
29 după care se filtrează sub vid, filtratul reprezentând biopreparatul UBCH.

30 *Testarea activității antifungice*

31 Efectul biopreparatului UBCH asupra creșterii miceliene a fitopatogenului de interes
32 a fost testat prin metoda includerii biopreparatului în mediul de cultură (Poison Food Method
33 sau Radial Growth Method). Această metodă presupune încorporarea unei cantități adecvate
34 din biopreparat în mediul de creștere (V8, răcit la 40-50°C). Controlul negativ a fost
35 reprezentat de plăci Petri conținând mediu netratat. Controlul pozitiv a fost reprezentat de
36 plăci tratate cu fungicid de sinteză, utilizat în mod uzual în cultură. Plăcile au fost lăsate să
37 se solidifice în hota cu flux laminar și după aceea au fost inoculate cu discuri miceliene cu
38 diametrul de 6 mm, tăiate din marginea unei culturi proaspete, cu creștere activă. Pentru
39 fiecare tratament au fost realizate trei replicări și a fost raportată valoarea medie a citirilor.

40 Plăcile Petri au fost incubate la întuneric, la $20 \pm 2^\circ\text{C}$ pentru 16 zile, moment în care
41 colonia din placa de control a atins marginea vasului. Măsurarea diametrului coloniei a fost
42 înregistrată zilnic. Procentul de inhibare a creșterii miceliului, I (%), ca urmare a tratamentului
43 cu biopreparat a fost calculat folosind următoarea formulă:

$$44 I(\%) = (1 - d_t/d_c) \cdot 100(\%), \quad (1)$$

45 unde, d_c este diametrul mediu al coloniei, măsurat în placa Petri de control, fără tratament,
46 iar d_t este diametrul mediu măsurat în plăcile Petri tratate cu biopreparat (Ogbebor și colab.,
47 2008).

48 *Testarea efectului biopreparatului pe frunze detașate*

49 Testul pe frunze detașate reprezintă un model experimental general acceptat, fiind
50 o tehnică utilizată în mod curent pentru a evalua rezistența izolatelor de *P. infestans* și a altor
51 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 întrebuițate în teste în maximum 2 h 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 menținută pe mediu de secară, 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 h, la o temperatură de 4°C. După incubare, suspensia a fost filtrată, iar concentrația a fost ajustată corespunzător. Frunzele au fost inoculate la 24 h 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).

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

Tabelul 2

| Scor evaluare | Severitatea simptomelor manifestate pe frunzele detașate | % Indexul manifestării infecției cu mană | Răspunsul infecției cu mană la tratamentul aplicat |
|---------------|--|--|--|
| 1 | Nu există simptome vizibile | 0 | Foarte susceptibilă |
| 2 | Există leziuni de dimensiuni mici, care acoperă maximum 10% din suprafața totală a frunzei | 0,01-10 | Susceptibilă |
| 3 | Leziunile prezente acoperă maximum 25% din suprafața totală a frunzei. | 10,01-25 | Tolerantă |

Tabelul 2 (continuare)

| Scor evaluare | Severitatea simptomelor manifestate pe frunzele detașate | % Indexul manifestării infecției cu mană | Răspunsul infecției cu mană la tratamentul aplicat |
|---------------|---|--|--|
| 4 | Leziunile prezente acoperă maximum 50% din suprafața totală a frunzei. | 25,01-50 | Rezistentă |
| 5 | Leziunile prezente acoperă maximum 75% din suprafața totală a frunzei. | 50,01-75 | Foarte rezistentă |
| 6 | 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 cea 48 mm (fig. 1). Există diferențe statistice între martori (M - alcool și M - martor netratat) și tratament ($P < 0,05$).

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 plăci 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).

RO 132519 B1

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. 1
3

Primele semne de infecție au apărut pe frunzele reprezentând martorul negativ (inoculat cu fitopatogenul și tratat cu apă distilată), la 48 h de la inoculare. După 7 zile de la inoculare, frunzele tratate cu apa 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. 5
7

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. 9
11

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. 13
15

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, fig. 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*. 17
19
21

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. 23
25
27

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 sălbatic (*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 rubarbă (*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*. 29
31
33
35
37
39
41

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%). 43
45
47

RO 132519 B1

1 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).

3 *Concluzii*

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

7 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,
9 apropiat de efectul unor fungicide consacrate.

11 Biopreparatul UBCH a indus în frunzele detașate reacții similare cu cele ale fungi-
cidului 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.

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

17

Bibliografie

19

Bolli R., 1994. Revision of the Genus Sambucus, J. Cramer.

21 Cao K.-Q. and A. H. C. van Bmggen, 2001. "Inhibitory efficacy of several plant
extracts and plant products on *Phytophthora infestam*", Journal of Agricultural University of
23 Hebei 1000-1573, (2): 90-96.

25 Carabet A., I. Grozea R. Stef and A.-M. Badea, 2009. "The control potențial of some
Plant Extracts against Downy Mildew in Tomato", International Symposium on Agriculture,
Proceedings of Conference: 45-48.

27 Caten C. E. and J. L. Jinks, 1968. "Spontaneous variability of single isolates of
Phytophthora infestam I. Cultural variation", Canadian Journal of Botany 46: 329-347.

29 Cowley R. B., D. J. Luckett J. D. I. Harper and G. J. Ash, 2012. "Development of a
reliable and rapid detached leaf assay to de teci resistance to the fungal disease phomopsis
31 leaf blight, caused by *Diaporthe toxica*, in *Lupinus albus*", Canadian Journal of Plant
Pathology, 34(3): 401-409.

33 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
35 Greenhouse Screenings", Plant Disease 99(5): 718-722.

37 Irzhansky I. and Y. Cohen, 2006. "Inheritance of resistance against *Phytophthora*
infestam in *Lycopersicon pimpnellifolium* L3707", Euphytica, 149(5): 309-316.

39 Khalid, P. A., Y. S. Muhammad, A. Muhammad, A. Shaukat, S. Nighat and T. E.
Muhammad, 2012. "Resistance Of *Solanum* Species To *Phytophthora Infestam* Evaluated
In The Detached-Leaf And Whole-Plant Assays", Pakistan Journal of Botany 44(3): 1141-
41 1146.

43 Lebecka, R., 2008. "Host-pathogen interaction between *Phytophthora infestam* and
Solanum nigrum, *S. villosum*, and *S. scabrum*", European Journal of Plant Pathology, 120(3):
233-240.

45 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
47 pepper, *Piper longum* L. against phytopathogenic fungi", Crop Protection, 20(6): 523-528.

RO 132519 B1

- 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. 1
- Moushib L., J. Witzell, M. Lenman, E. Liljeroth and E. Andreasson, 2013. "*Sugar beet extract induces defence against Phytophthora infestam in potato plants*", European Journal of Plant Pathology, 136(2): 261-271. 3
5
- Nelson, H. E., 2006. "*Bioassay to detect small differences in resistance of tomato to late blight according to leafage, leaf and leaflet position, and plant age*", Australasian Plant Pathology, 35(3): 297-301. 7
- Nowicki, M., M. R. Foolad, M. Nowakowska and E. U. Kozik, 2011. "*Potato and Tomato Late Blight Caused by Phytophthora infestam: An Overview of Pathology and Resistance Breeding*", Plant Disease 96(1): 4-17. 9
11
- 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. 13
- Rohner, E., A. Carabet and H. Buchenauer, 2004. "*Effectiveness of plant extracts of Paeonia suffruticosa and Hedera helix against diseases caused by Phytophthora infestam in tomato and Pseudoperonospora cubensis in cucumber*", Journal of Plant Diseases and Protection 111(1): 83-95. 15
17
- 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 infestam on potato leaves*", European Journal of Plant Pathology, 112(3): 235-246. 19
21
- Vleeshouwers, V. A. A., W. van Dooijeweert, L. C. Paul Keizer, L. Sijpkens, F. Govers and L. Colon, 1999. "*A Laboratory Assay for Phytophthora infestam Resistance in Various Solanum Species Reflects the Field Situation*", European Journal of Plant Pathology, 105(3): 241-250. 23
25
- 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. 27
- Wang, S., X. Wang, .1. Lu and K. Cao, 2001, "*Screening of Chinese herbs for the fungitoxicity against Phytophthora Infestas*", Journal of Agricultura] Unversity of Hebi 24: 101-107. 29
- Yusuf, Y., I. Kadioglu, A. Gokce, î. Demirtaş, N. Goren, H. Cam 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. 31
33

RO 132519 B1

1

Revendicare

3

Biopreparat cu activitate antimicrobiană asupra *Phytophthora infestans*, agent patogen al manei **caracterizat prin aceea că**, este alcătuit dintr-un extract vegetal obținut

5

din următoarele 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.

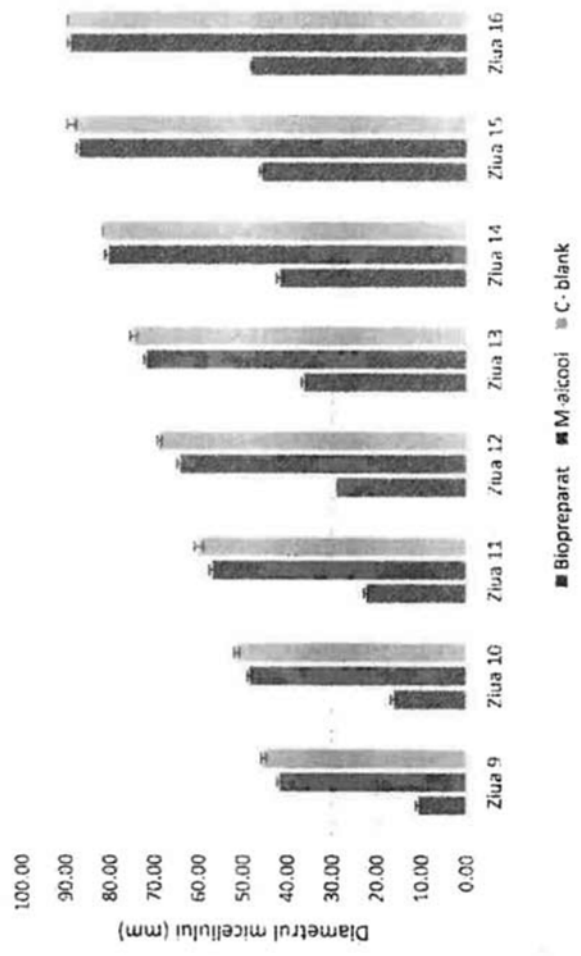


Fig. 1

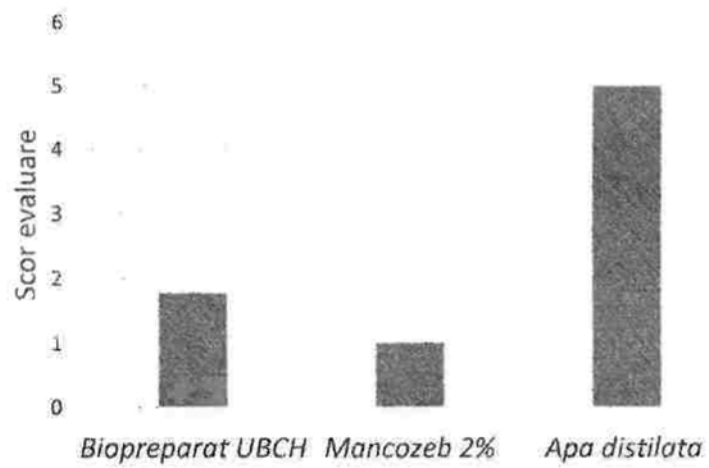


Fig. 2

