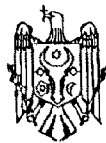




MD 1297 Z 2019.08.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **1297** (13) **Z**
(51) Int.Cl: *A01C 1/06* (2006.01)
A01N 63/00 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12R 1/41 (2006.01)
A01P 5/00 (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE
DE SCURTĂ DURATĂ**

(21) Nr. depozit: s 2017 0141 (22) Data depozit: 2017.12.28	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2019.01.31, BOPI nr. 1/2019
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE ZOOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD (72) Inventatori: TODERAȘ Ion, MD; MELNIC Maria, MD; RUSU Ștefan, MD; ERHAN Dumitru, MD; LUNGU Angela, MD; ONOFRAȘ Leonid, MD; TODIRAȘ Vasile, MD; SLANINA Valerina, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE ZOOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	

(54) **Procedeu de tratare biologică a cartofului semincer contra nematodului
*Ditylenchus destructor***

(57) **Rezumat:**

1
Invenția se referă la parazitologie, în special la un procedeu de combatere biologică a nematodului *Ditylenchus destructor* la cartoful semincer și poate fi utilizată în agricultură.

Procedeul de tratare biologică a cartofului semincer contra nematodului *Ditylenchus destructor* include inmuiera cartofului

2
semincer înainte de sădare într-o soluție ce conține lichid de cultură al tulpinii de bacterii *Rhizobium japonicum* CNMN-RB-06 cu titrul de 10^9 cel./ml și apă, luate în raport de 1:200 respectiv, în decurs de 72 ore.

Revendicări: 1

Figuri: 4

MD 1297 Z 2019.08.31

(54) Method for biological treatment of seed potato against *Ditylenchus destructor* nematode

(57) Abstract:

1
The invention relates to parasitology, in particular to a method for biological control of *Ditylenchus destructor* nematode in seed potato and can be used in agriculture.

The method for biological treatment of seed potato against *Ditylenchus destructor* nematode comprises soaking seed potato

2
before planting in a mixture of culture liquid containing *Rhizobium japonicum* CNMN-RB-06 bacteria strain with a titer of 10^9 cells/ml and water taken in a ratio of 1:200, respectively, for 72 hours.

Claims: 1

Fig.: 4

(54) Способ биологической обработки семенного картофеля против нематоды *Ditylenchus destructor*

(57) Реферат:

1
Изобретение относится к паразитологии, в частности к способу биологической борьбы с нематодой семенного картофеля *Ditylenchus destructor* и может быть использовано в сельском хозяйстве.

Способ биологической обработки семенного картофеля против нематоды *Ditylenchus destructor* включает

2
замачивание семян картофеля перед посадкой в смеси культуральной жидкости, содержащей штамм бактерий *Rhizobium japonicum* CNMN-RB-06 с титром 10^9 клеток/мл и воды, взятых в соотношении 1:200 соответственно, в течение 72 часов.

П. формулы: 1

Фиг.: 4

Descriere:

Invenția se referă la parazitologie, în special la un procedeu de combatere biologică a nematodului *Ditylenchus destructor* la cartoful semincer și poate fi utilizată în agricultură.

Este cunoscut faptul că una dintre bolile cartofilor, mai nocivă și cu un impact economic important, este ditielhoza tuberculilor – boală cauzată de nematodul *Ditylenchus destructor* Thorne, 1945 – parazit exclusiv al tuberculilor, inclus în lista speciilor de carantină (e.g.EPPO). Daunele provocate de nematodul *Ditylenchus destructor* sunt esențiale.

În scopul tratării materialului semincer de cartofi contra nematodului *Ditylenchus destructor*, sunt recomandate mai multe preparate de origine chimică: *Carbofuran* 5%, *Furadan* 5%, *Heterofos* 3%, *Carbation* 3% [1].

Neajunsul acestor preparate este că fiind de origine chimică sunt și foarte toxice, iar aplicarea lor provoacă riscuri majore de poluare a apei, solului și faunei, astfel afectând grav sănătatea omului și animalelor. Prin urmare, autorii recomandă utilizarea acestora la cartoful semincer, doar în focare fitohelmintoze. La moment, folosirea produselor nematocide, de origine chimică, a fost radical redusă în majoritatea țărilor, iar pentru combaterea nematozilor, printre care și *D.destructor*, sunt căutate alternative mai puțin toxice.

Cele mai apropiate, după esența tehnică și rezultatul obținut, precum și de perspectivă în protecția plantelor la general și tratarea cartofului semincer afectat, înainte de plantare, în special, sunt metodele noi de utilizare a biopreparatelor pe bază de microorganisme. Acestea nu exercită simptome de toxicitate asupra dezvoltării plantelor, dimpotrivă stimulează mecanismele de protecție și rezistență către diverși agenți patogeni, iar în final contribuie la sporirea recoltei.

În calitate de cea mai apropiată soluție servește procedeul de tratare a cartofului contra nematodului *Ditylenchus destructor*, care include înmuierea cartofului înainte de sădire într-o soluție ce conține lichid de cultură cu un conținut de tulpină de bacterii *Pseudomonas fluorescens* CNM-PFB-01 cu un titru de 10^9 cel./ml și apă, luate în raport de 1:(100...500) respectiv, în decurs de 20 ore [2].

Dezavantajul acestui procedeu constă în nivelul scăzut de creștere a productivității plantelor. Astfel recolta de cartofi tratați cu amestecul de lichid de cultură ce conține tulpină de bacterii *Pseudomonas fluorescens* este cu 30...35% mai mare, comparativ cu cartofii netratați.

Actualmente, în majoritatea țărilor dezvoltate (Marea Britanie, Germania, Franța, Brazilia, SUA, Federația Rusă etc.), pentru combaterea speciilor parazite de nematozi sunt elaborate și utilizate biopreparate nematocide pe bază de fungi prădători și bacterii parazite din genurile *Arthrobotrys*, *Catenaria*, *Paecilomyces*, *Pasteuria*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* etc. În sursele literare nu este descrisă acțiunea nematocidă a speciei de bacterii *Rhizobium japonicum* asupra nematodului tuberculilor de cartofi *Ditylenchus destructor*. Conform standardelor internaționale, cartoful semincer trebuie să fie liber de speciile parazite de nematozi nocivi pentru această cultură – *Meloidogyne chitwoodi*, *M.fallax* și *Ditylenchus destructor* (standardul pentru cartofii de sămânță EAK OOH S-1).

Problema pe care o soluționează prezenta invenție este combaterea eficientă a nematodului *Ditylenchus destructor* prezent la cartoful semincer cu utilizarea unui biopreparat, care manifestă suplimentar acțiune stimulatorie asupra dezvoltării și productivității.

Esența invenției constă în faptul că se propune un procedeu de tratare biologică a cartofului semincer contra nematodului *Ditylenchus destructor*, care include înmuierea cartofului semincer înainte de sădire într-o soluție ce conține lichid de cultură al tulpinii de bacterii *Rhizobium japonicum* CNMN-RB-06 cu titrul de 10^9 cel./ml și apă, luate în raport de 1:200 respectiv, în decurs de 72 ore.

Rezultatul tehnic al prezentei invenții constă în elaborarea unui procedeu de combatere a nematodului tuberculilor *Ditylenchus destructor* prezent la cartoful semincer, prin utilizarea lichidului de cultură al tulpinii de bacterii *Rhizobium japonicum* care în contact cu speciile parazite de nematozi posedă o toxicitate înaltă față de acest parazit și provoacă mortalitatea acestuia în proporție de 98%, totodată manifestă suplimentar un șir de capacități: stimulează încolțirea cartofului semincer, sporește creșterea, dezvoltarea și productivitatea plantelor. Conform datelor din literatură, tulpinile *Rhizobium* spp. posedă capacitatea de a reduce bolile provocate de diverși agenți patogeni ai plantelor – fungi, bacterii, viruși, provocând, paralel, acțiune stimulatorie asupra dezvoltării plantelor prin capacitatea sa de a produce compuși fenolici, flavonoizi și alte fitoalexine.

Tulpina de bacterii *Rhizobium japonicum* din familia *Rhizobiaceae*, genul *Rhizobium*, a fost izolată din nodozitățile de culoare roză, de pe rădăcinile plantelor de soia, care au fost cultivate pe terenuri cu sol de tip cernoziom, din zona de nord a Republicii Moldova (r-nul Râșcani, comuna Dămășcani), de către cercetători din cadrul Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM în perioada anului 2006. Modul de obținere – prin metoda analitică de selecție. Data depozitării – 18.05.2012. Produsul sintetizat de tulpină: substanțe de stimulare a proceselor de creștere și dezvoltare a plantelor de tipul auxinelor, citochininelor, giberelinelor.

Atingerea rezultatului menționat a fost posibilă datorită utilizării lichidului de cultură al tulpinii de bacterii *Rhizobium japonicum*, care posedă capacitatea de a fixa în simbioză cu plantele leguminoase azotul molecular din atmosferă.

Invenția se explică cu ajutorul desenelor din fig. 1-4, care reprezintă:

- fig. 1, cartof semincer Roko infestat cu *Ditylenchus destructor*: a - faza a 2-a de ditlenhoză, b - distribuirea diferitelor generații de nematozi *D.destructor* de diverse varste în țesutul cartofului infestat,

- fig. 2, mortalitatea (%) nematodelor *Ditylenchus* în contact cu bacteriile *Rhizobium* și *Pc4*,

- fig. 3, cartofi de soi Roko inoculați cu nematozi *Ditylenchus destructor*,

- fig. 4, cartofi Roko, înainte de plantare, inoculați cu nematozi *Ditylenchus destructor* și supuși tratării cu lichidul de cultură *Rh.japonicum*.

Analizele de laborator au fost efectuate la 14 soiuri de tuberculi de cartofi seminceri colectați din depozite în perioada de toamnă-iarnă-primăvară din diverse gospodării ale zonelor de nord, centru și sud ale Republicii. Rezultatul investigațiilor contra fitohelmintozelor la soiurile de cartof semincer a demonstrat că sunt afectate cu *D.destructor* în proporții variate. Prezența parazitului a fost depistată în majoritatea cazurilor la cartoful semincer din gospodăriile individuale (60% din totalul gospodăriilor cercetate).

Pentru aprecierea gradului de atac al nematodului *Ditylenchus destructor* Thorne, 1945 a fost utilizată scara de 5 grade (Ivaniuc, Ilișenco, 2010):

gradul I – soiuri de cartofi rezistente la invazie (0...1,0%); gradul II – soiuri slab afectate (1,0...10,0%); gradul III – moderat afectate (11,0...25,0%); gradul IV – serios afectate (26,0...50,0%); gradul V – puternic afectate, atacate mai mult de 50,0%.

Conform acestei scări, cartofii expuși cercetărilor, cu o infestare de 11...30% în dependență de zonă, corespund soiurilor moderat afectate.

Cercetările au fost axate pe unul dintre soiurile cultivate pe larg în Republica Moldova - Roko. Conform Catalogului soiurilor de cartofi cultivați în Republica Moldova (2013), elaborat de Ministerul Agriculturii și Industriei Alimentare, soiul Roko a fost înregistrat în Republica Moldova în anul 2011, iar ulterior reînregistrat. Cartoful alimentar Roko posedă aspect calitativ ca marfă, indicele calității de 95%, este preferat de cumpărători, datorită gustului plăcut. Cantitatea de amidon constituie 12...16%, iar recolta poate ajunge la 600 q/ha.

Este cunoscut faptul că principala sursă de răspândire a nematodului la cultivarea cartofului sunt tuberculii infestați, care se plantează primăvara ca material semincer. O altă sursă de afectare a cartofului o constituie solul, unde nematozii pot rămâne activi pe o perioadă de aproximativ 3...4 ani.

Conform celor 5 faze de dezvoltare a ditlenhozei, evaluate în cercetările precedente efectuate la soiul Roko, s-a observat că cei mai periculoși sunt cartofii de sămânță afectați în primele faze (1, 2), deoarece simptomele exterioare, care apar pe tuberculi în aceste faze, încă nu sunt vizibile nici la o examinare minuțioasă, de aceea asemenea cartofi, din neatenție, ar putea fi plantați (fig. 1).

În faza a 2-a simptome de deteriorare la suprafața tuberculilor sunt observate doar la înlăturarea cojii (fig. 1-a). Pe această porțiune se observă acumularea indivizilor *D.destructor*. Conform recalculelor efectuate cele mai numeroase (50% din totalul de unități/g) sunt formele juvenile ale *D.destructor* (J₂, J₃, J₄) cu dominanța J₂, ($n = 10,1 \times 10^3$ indivizi/g țesut afectat), urmează ouăle 17,07%, apoi masculii 16,53% și femelele 15,42% (fig. 1-b). La un tubercul de cartof afectat în faza a 2-a pot fi enumerați cca $31,6 \times 10^3$ unități de *D. destructor*. Numărul excesiv de larve, ce se hrănesc intens cu țesutul sănătos al mezocarpului de cartof, în decursul a 18...20 de zile ajunge la stadiul matur. O singură femelă poate depune cca 200...250 ouă. În condițiile Republicii Moldova *D. destructor* formează 4...5 generații, iar reproducerea intensă a parazitului provoacă majorarea densității indivizilor și, în consecință, reducerea recoltei.

Exemple de realizare a invenției

Exemplul nr. 1

Testarea a avut loc în condiții de laborator, la temperatura cuprinsă între 25...27°C, prin metoda de contact (Kurt, 1973) la diverse intervale de timp: 1, 2, 4, 8, 21, 24, 48, 72 ore. La finalul experiențelor a fost verificată eficacitatea produsului testat. Populațiile nematodului *D.destructor* au fost extrase din cartofi de soiul Roko, bolnavi de ditilenhoză, colectați din depozite. Contactul indivizilor *D.destructor* cu lichidul de cultură al tulpinilor din genul *Rhizobium* a avut loc în cutiile Petri cu diametrul de 5 cm (fiecare variantă fiind efectuată în 3 reprize). Investigațiile au fost efectuate în șase variante. În fiecare cutie s-au adăugat, cu acul entomologic steril, câte 50 de indivizi de *D.destructor*. Apoi în cutiile Petri, peste nematozii selectați, s-a adăugat lichid de cultură al speciilor de bacterii din genul *Rhizobium*: lotul I - *Rh.japonicum*; II - *Rh.japonicum 646 a*; III - *Rh. phaseoli*; IV - *Rh.meliloti*; V - *tulpina Pc4*; lotul VI- martor s-a adăugat doar apă distilată.

Rezultatele experiențelor efectuate au demonstrat că printre speciile de bacterii cercetate din gen. *Rhizobium*, cu eficacitate sporită sau deosebită au fost speciile *Rhizobium japonicum* și *Rh.japonicum 646a*, care au exercitat acțiune letală asupra speciei *Ditylenchus destructor* în proporție de 70...80% la o expunere de 24 ore (fig. 2).

Conform rezultatelor obținute, lichidul de cultură al tulpinii *Rh. japonicum* în raport de 1:200 respectiv, în contact direct în cutiile Petri cu speciile parazite de nematozi *Ditylenchus destructor*, la un interval de 72 ore, posedă toxicitate înaltă față de acest parazit și provoacă mortalitatea în proporție de 98%.

Exemplul nr. 2

Experiențe vegetative efectuate în perioada anilor 2014...2016 cu testarea capacității nematocide a lichidului de cultură al bacteriilor *Rhizobium japonicum* în contact cu cartofii seminceri de soiul Roko, inoculați cu nematodul tuberculilor *Ditylenchus destructor* Thorne, 1945, faza a 2-a de ditilenhoză. Tuberculii de cartofi seminceri de soiul Roko, din experiment în condiții de laborator au fost preventiv inoculați cu un anumit număr de indivizi *D.destructor* (femele și masculi), fiind ulterior expuși incubării pe o perioadă de 2...2,5 luni (fig. 3) și (fig. 4). În acest timp nematozii *D.destructor* au pătruns în țesutul mezocarpului și s-au reproduș. După verificarea tuberculilor inoculați la prezența nematozilor *D.destructor*, o parte dintre ei au fost supuși tratamentului prin înmuiere în lichidul de cultură *Rh. japonicum*, iar o altă parte de cartofi afectați nu au fost tratați, formând astfel lotul martor.

Schema testării contactului cartofilor seminceri de soiul Roko înmuiați în lichidul de cultură al bacteriilor *Rhizobium japonicum* în raportul următor:

- 1 – 1:50;
- 2 – 1:100;
- 3 – 1:200;
- 4 – martor, cartofi afectați fără tratament.

Titul preparatului inițial al culturii *Rh. japonicum* fiind de 6×10^9 cel./ml apă, luat în raport de: cutia nr.1 – 1:50, 2 – 1:100, 3 – 1:200, 4 – martor, numai apă distilată.

Testările s-au efectuat la temperatura de 25°C, prin metoda de înmuiere, la o expunere de 16 ore (tab. 1).

Cartofii din lotul experimental, afectați artificial cu nematozi *D.destructor*, au fost plantați în ghiveciuri cu sol liber de nematozi. Pe toată perioada de vegetație s-au efectuat cercetări privind dezvoltarea plantelor. Scopul final fiind evaluarea eficacității diverselor raporturi de diluții ale lichidului de cultură *Rh.japonicum* asupra nematozilor *D.destructor*.

Din datele expuse în tabelul 1 rezultă că diverse concentrații ale preparatului *Rh. japonicum* au exercitat acțiuni diverse asupra creșterii și dezvoltării plantelor de cartofi. În concentrații mai mari (1:50; 1:100) preparatul este toxic, iar plantele se dezvoltă mai slab, având un număr de lăstari (plantule, *h*-medie), precum și un diametru al acestora (*d*- medie, mm), mai mic comparativ cu loturile unde cartofii au fost tratați cu lichidul de cultură *Rh.japonicum*, în concentrație mai mică (1:200). De asemenea, lichidul de cultură *Rh.japonicum* diluat în proporții de 1:200 expus în lotul 3, a manifestat o înaltă eficacitate nematocidă. În acest lot s-a evidențiat o sporire a dezvoltării plantelor, comparativ cu cele din alte loturi experimentale și cu cel martor. Plantele aveau o înălțime medie cu 13,1 cm mai mare și un număr de lăstari/plantă de 2 ori mai mare, diametrul tulpinii acestora fiind de 2,3 ori mai mare comparativ cu cele din lotul martor netratat (tab. 1) și (fig. 4).

Tabelul 1

Evaluarea eficacității preparatului *Rhizobium* asupra dezvoltării plantelor de cartof

Nr. lotului	Diluția/ timpul expunerii	Numărul lăstari/plantă	Înălțimea medie(cm)	Diametrul/mediu/ plantulă(mm)
1	1:50/16 ore	3	45,0	3,5
2	1:100/16 ore	4	50,3	3,8
3	1:200/16 ore	6	73,6	9,7
4	Martor	3	60,5	4,2

5

La recoltare numărul tuberculilor/plantă a fost în medie de 4 ori mai mare, iar greutatea acestora de 6,6 ori mai mare în lotul experimental comparativ cu lotul martor (tab. 2). Extensivitatea invaziei cu *D. destructor* la cartofii recoltați de pe lotul experimental tratați cu lichidul de cultură *Rh. japonicum* era de 1...5 %, pe cand la lotul martor, aceasta era cu mult mai înaltă atingând cota de 25...30%.

10

Tabelul 2

Rezultatele acțiunii preparatului *Rhizobium japonicum*, în diluție de 1:200, asupra productivității de cartof

Lotul	Numărul mediu de tuberculi/ plantă	E: M	Masa tuberculi/ plantă (g)	E: M	Greutatea medie a unui tubercul (g)	E: M	Extensivitatea invaziei (%)
Experiența (E)	8	4	380,4	6,6	40,8	1,8	1-5
Martor (M)	2	-	50,8	-	20,6	-	25-30

15

Luând în calcul atât datele obținute de noi, cât și rezultatele cercetărilor efectuate, observăm că toate speciile de *Rhizobium*, printre care și specia *Rh.japonicum*, posedă capacitatea de a fixa, în simbioză cu plantele leguminoase, azotul molecular din atmosferă, totodată manifestă suplimentar un șir de capacități: stimulează încolțirea cartofului semincer, sporește creșterea, dezvoltarea și productivitatea plantelor. Conform datelor din literatură, tulpinile *Rhizobium* spp. posedă

20

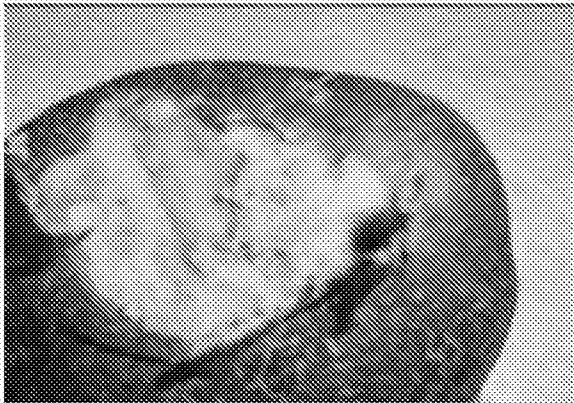
capacitatea de a reduce bolile provocate de diverși agenți patogeni ai plantelor – fungi, bacterii, viruși, având paralel acțiune stimulatorie asupra dezvoltării plantelor prin capacitatea sa de a produce compuși fenolici, flavonoizi și alte fitoalexine.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

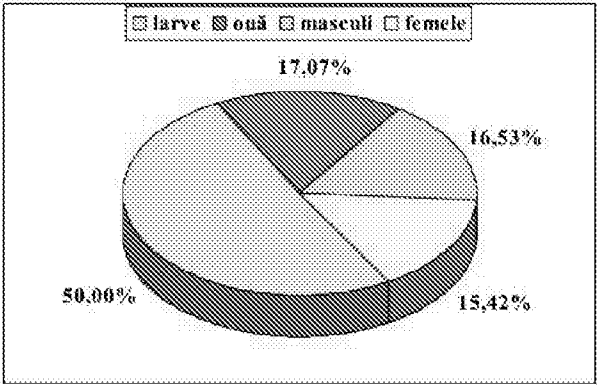
1. Onofraș L., Todiraș V., Mohova T., Prisacari S., Lungu A., Melnic M., Rusu Ș. Perspectiva utilizării bacteriilor de nodozități din genul *Rhizobium* în scopul stimulării creșterii și dezvoltării plantelor cerealiere. Buletin Științific. Revista de Etnografie, Științele Naturii și Muzeologie, fascicola Științele Naturii, Chișinău, 2013, v.16 (29), p. 97-103
2. MD 719 Y 2014.01.31

(57) Revendicări:

Procedeu de tratare biologică a cartofului semincer contra nematodului *Ditylenchus destructor*, care include înmuierea cartofului semincer înainte de sădire într-o soluție ce conține lichid de cultură al tulpinii de bacterii *Rhizobium japonicum* CNMN-RB-06 cu titrul de 10^9 cel./ml și apă, luate în raport de 1:200 respectiv, în decurs de 72 ore.



a



b

Fig. 1

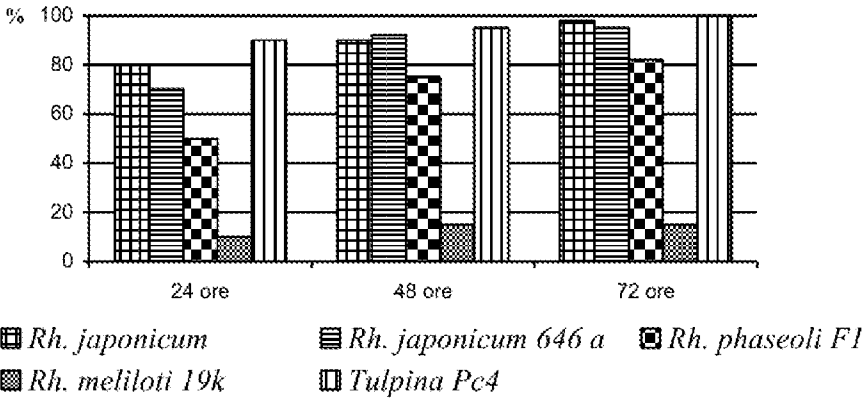


Fig. 2

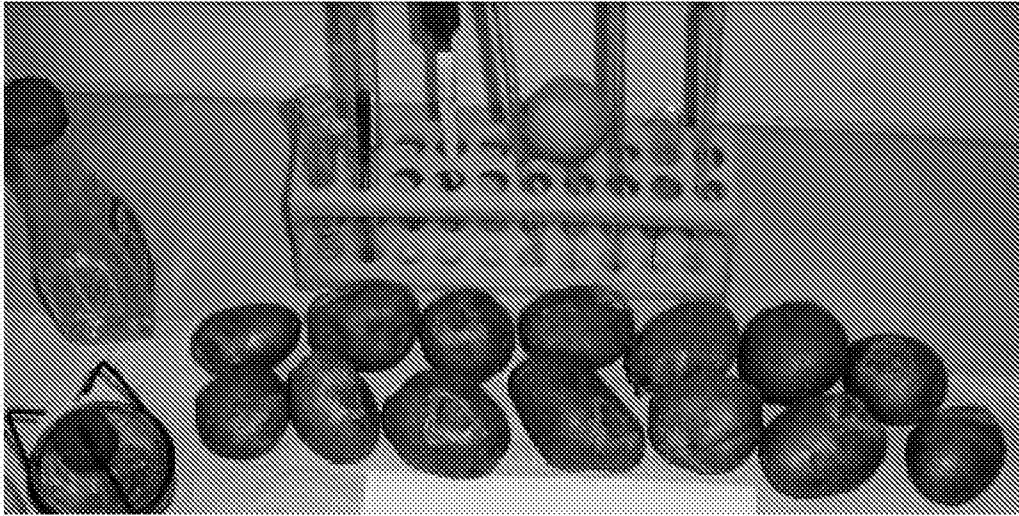


Fig. 3



Fig. 4