



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2009 01074**

(22) Data de depozit: **22.12.2009**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **28.12.2012** BOPI nr. **12/2012**

(41) Data publicării cererii:
30.06.2011 BOPI nr. **6/2011**

(73) Titular:
• **INSTITUTUL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
PROTECȚIA PLANTELOR,
BD.ION IONESCU DE LA BRAD NR.8,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **OANCEA FLORIN, STR.PAȘCANI NR.5,
BL.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **ȘTEFAN AURORA LILIANA,
BD.ION IONESCU DE LA BRAD NR.8,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **LUPU CARMEN, INTRAREA BĂRSEI
NR.5, BL.G 3, AP.25, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
MD 3540 F1; TW 541337 (B)

(54) **MEDIU DE CULTURĂ PENTRU DIFERENȚIEREA
CIUPERCILOR FITOPATOGENE TOXIGENE DIN GENUL
FUSARIUM**



Invenția se referă la un mediu de cultură, pentru diferențierea ciupercilor fitopatogene, toxigene, din genul *Fusarium*, destinat estimării riscului de infecție a boabelor de grâu în curs de formare, cu ciuperci toxigene și de contaminare ulterioară cu micotoxine.

Sunt cunoscute o serie de medii și de metode prin care sunt determinate fitopatogenitatea și/sau toxigenitatea unor populații/izolate de ciuperci din genul *Fusarium*.

MD 3540 F1 descrie o metodă de identificare a fitopatogenității unor izolate de ciuperci din genul *Fusarium*. Metoda propusă implică cultivarea izolatelor de ciuperci toxigene pe mediu nutritiv Czapek și determinarea activității β -glucuronidazice în filtratele culturii de 5 zile. Se consideră ca fiind fitopatogene acele izolate la care activitatea β -glucuronidazică este cuprinsă între 0,652 și 1,183 U/ml. Metoda descrisă nu oferă soluții pentru diferențierea și/sau izolarea rapidă a tulpinilor de ciuperci fitopatogene din genul *Fusarium* și, în special, a celor care sunt și toxigene.

TW 541337 B descrie un mediu selectiv pentru detectarea ciupercii patogene *Fusarium oxysporum f. sp. lilii*, care este util pentru obținerea acesteia din sol sau pentru a o diferenția față de alte specii de *Fusarium*. Este constituit din mediul de bază Komada, pentacloronitrobenzen, oxgall, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, sulfat de streptomycină și benomyl.

Schmale și colab. (2006, *Genetic structure of atmospheric populations of Gibberella zeae*, *Phytopathology* 96, 1021-1026), descriu un mediu pentru diferențierea și identificarea rapidă a sporilor atmosferici de *Fusarium graminearum*/*Gibberella zeae*, depuși gravimetric pe suprafața plăcilor Petri deschise și expuse peste noapte. Această soluție tehnică permite izolarea rapidă a ciupercilor din genul *Fusarium*, dar nu permite diferențierea celor fitopatogene și/sau toxigene.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a realiza o compoziție de mediu prin care să se realizeze izolarea și diferențierea rapidă a ciupercilor fitopatogene, toxigene, din genul *Fusarium*.

Mediul de cultură pentru diferențierea ciupercilor fitopatogene, toxigene, din genul *Fusarium*, conform invenției, este alcătuit din: 32...34 părți ulei de măsline extravirgin, 0,095...1,05 părți fosfat monopotasit KH_2PO_4 ; 0,095...1,05 părți azotat de potasiu KNO_3 ; 0,095...1,05 părți sulfat de streptomycină; 0,740...0,760 părți pentacloronitrobenzen; 0,47...0,52 părți $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,47...0,52 părți clorură de potasiu KCl ; 0,340...0,360 părți sulfat de neomicină; 0,240 ...0,270 părți polietilenglicol sorbitan monooleat; 0,019...0,021 părți Rodamină B, 19...21 părți agar și până la 1000 părți apă, părțile fiind exprimate în greutate.

Mediul realizat conform invenției prezintă următoarele avantaje:

- selectivitate ridicată, datorită biocidelor incluse în mediu, streptomycină, neomicină, pentacloronitrobenzen, care limitează dezvoltarea bacteriilor și a ciupercilor microscopice care nu aparțin genului *Fusarium*;

- capacitate ridicată de a diferenția fusariile producătoare de lipaze extracelulare, care sunt fitopatogene și toxigene, pentru că lipazele secretate reprezintă, pentru ciupercile din genul *Fusarium*, atât un factor de virulență, cât și un factor implicat în biosinteza micotoxinelor.

- realizarea testelor de diferențiere ușor, fără a fi necesară aparatură complexă, reactivi costisitori și/sau personal cu înaltă calificare;

- realizarea testelor de identificare a hazardului microbiologic care generează riscul de contaminare a alimentelor cu fusariotoxine.

Se dă, în continuare, un exemplu de realizare a invenției.

RO 126409 B1

Exemplu. Într-un flacon Erlenmayer de 500 ml, gradat, se introduc, pe rând, 0,1 g	1
KH_2PO_4 , 0,1 g KNO_3 , 0,05 g MgSO_4 , 0,05 g KCl. Se adaugă 90 ml apă distilată. Se	3
încălzește la fierbere, până la dizolvarea completă a tuturor ingredientelor și apoi se menține	5
pe baie de apă la 50...55°C. Peste soluția menținută la 55°C, se adaugă 0,075 mg	7
pentacloronitrobenzen. Se verifică pH-ul, care trebuie să fie de 7,0±0,1. Se corectează, dacă	9
este nevoie, cu soluții de KOH 1 N sau H_2SO_4 1 N. Se aduce volumul final la 100 ml, se	11
astupă paharul Erlenmayer cu dop de vată, și apoi se autoclavează la 121°C, timp de 20 min.	13
Mediul autoclavat se răcește la 60°C, după care se adaugă 10 ml emulsie lipidică, sterilă, cu	
rodamină B. Se omogenizează în condiții aseptice, pe baie de apă termostată la 60°C și	
se menține apoi aproximativ 10 min, la 60...62°C, pentru eliminarea spumei formate. Mediul	
se răcește apoi la circa 55°C și se adaugă câte 1 ml de soluții de antibiotice sterilizate prin	
filtrare, respectiv, 1 ml soluție de sulfat de streptomicină 0,1 g /ml și 1 ml soluție de sulfat de	
neomicină 0,035 g/ml.	
Prepararea emulsiei lipidice sterile se realizează după cum urmează: într-un	15
Erlenmeyer de 250 ml, se aduc: 250 μl de Tween 80 (polietilenglicol sorbitan monooleat),	17
30 ml de ulei de măsline extravirgin și 50 ml de apă distilată. Se omogenizează emulsia la	19
waring blender, se lasă să se disperseze spuma, se corectează pH -ul la 7,0, se acoperă cu	
dop de vată fixat cu folie și apoi se sterilizează la 121°C, timp de 30 min. Se răcește la circa	
60°C, se trece pe baie de apă termostată la 60...62°C și se adaugă 20 ml soluție de	
rodamină B 1 mg/ml, sterilizată prin ultrafiltrare.	
Selectivitatea mediului realizat conform invenției a fost analizată cu cea a mediilor de	21
mai jos.	
Czapek-Dox-Iprodione-Dicloran Agar (CZID) (Abildgren et al., 1987), obținut din	23
Czapek Dox agar (Merck) 35 g; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,005 g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,001 g cloramfenicol	25
0,05 g; dicloran 0,002 g; apă până la 1000 ml. Mediul s-a autoclavat la 121°C, timp de 30	
min. Când mediul s-a răcit la circa 55°C, s-a adăugat câte 1 ml din soluții sterile care	27
conțineau: penicilină 50 mg/ml; sulfat de streptomicină 50 mg/ml; Rovral (iprodione) 6 mg/ml;	
Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA) (Nirenberg, 1981); KH_2PO_4 1 g; KNO_3 1 g;	29
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g; KCl 0,5 g; glucoză 0,2 g; zaharoză 0,2 g; agar 20 g Malachit Green Agar	
(MGA) (Castello et al., 1997); Peptonă 15 g; KH_2PO_4 1 g ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g; Malachite	31
Green sare oxalat, 10 ml soluție 25 mg%, 2,5 mg; ampicilină 0,5 g. Mediul s-a autoclavat la	
121°C, timp de 30 min. Când mediul s-a răcit la circa 55°C, s-au adăugat 2 ml dintr-o soluție	33
stoc rifampicină, rezultată prin dizolvarea a 0,5 g în 100 ml 95% etanol.	
Mediu <i>Fusarium</i> selectiv (FS) (Nash și Snyder, 1962) cu următoarea compoziție:	35
bactopeptonă 15 g, mediu pulbere cartof glucoză agar (Difco) 39 g; KH_2PO_4 1 g;	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g, pentacloronitrobenzen 0,2 g, agar 15 g. Mediul s-a autoclavat la 121°C,	37
timp de 30 min. Când mediul s-a răcit la circa 55°C, s-a adăugat câte 1 ml din soluții sterile	
care conțineau: sulfat de streptomicină 300 mg/ml, ampicilină 100 mg/ml.	
Mediu <i>Fusarium</i> selectiv modificat (FSM) (Schmale et al. 2006), cu următoarea	39
compoziție: 15 g bactopeptonă, KH_2PO_4 1 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g, pentacloronitrobenzen	41
0,750 g, agar 15 g. S-a răcit la 55°C, după care s-au adăugat câte 10 ml de soluții de	
antibiotice sterilizate prin filtrare, 10 ml soluție de sulfat de streptomicină 0,1 g /ml și 10 ml	43
soluție de sulfat de neomicină 0,035 g/ml.	

Tabelul 1

Selectivitatea mediilor de cultură testate pentru fusariile toxigene

Mediu	Aprecierea selectivității				
	<i>Fusarium/Asperg.</i>	<i>Fusarium/Drechslera</i>	<i>Fusarium/Mucor</i>	<i>Fusarium/Penicillium</i>	<i>Fusarium/Rhizopus</i>
CZID	5	5	3	5	4
SNA	4	4	5	3	5
FS	3	3	4	4	3
FSM	1	2	2	1	2
cf. ex.	2	1	1	2	2

^a - Note pe o scară de la 1 la 5, prin compararea creșterii între diferitele specii de ciuperci microscopice pe fiecare dintre medii.

Selectivitatea mediilor a fost testată prin inocularea plăcilor Petri 67x15 mm cu amestecuri de suspensii de spori de *Fusarium graminearum*, în combinație cu *Aspergillus flavus*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Drechslera turcica*, *Botrytis cinerea*, *Mucor mucedo*, *Penicillium expansum*. Mediul s-a incubat timp de 7 zile și a fost comparată creșterea diferitelor specii de ciuperci microscopice pe fiecare dintre medii. Notele acordate diferitelor medii testate, în cadrul acestei etape, în privința selectivității pentru ciupercile fitopatogene din grupul *Fusarium graminearum*, sunt prezentate în tabelul 1. Se remarcă faptul că selectivitatea mediilor FS, FSM, conform exemplului este apropiată. În toate cazurile, factorul major de selectivitate este pentacloronitrobenzen, un fungicid care este inactiv față de ciupercile microscopice din genul *Fusarium*. Mediul conform invenției mai este selectiv și prin compoziția sa minimală.

Capacitatea mediilor de a permite diferențierea rapidă a sporilor atmosferici de fusarii toxigene a fost testată prin expunerea în aer liber a mediilor comparate, fiecare dispus într-o serie de 5 plăci Petri deschise (90 mm în diametru; suprafața = 283 mm²). Plăcile au fost amplasate pe un suport în formă de T, la nivelul inflorescențelor de grâu și porumb (fig. 1, a, b), și lăsate peste noapte. Apoi s-au închis, s-au preluat din câmp în laborator și s-au incubat timp de 24 h, la 25°C și la întuneric. Numărul de colonii puse în evidență rapid, pentru diferitelor medii, sunt prezentate în tabelul 2.

Tabelul 2

Capacitatea mediilor de cultură testate pentru diferențierea rapidă a sporilor atmosferici, prelevați după expunere în aer liber

Mediu	Număr total de colonii	Colonii identificate ca <i>Fusarium</i>
CZID	128±20	44±4
SNA	108±24	42±8
FS	84±16	36±8
FSM	64±20	48±4
MSF	56±12	48±8

RO 126409 B1

Datele prezentate în tabelele 1 și 2 demonstrează o selectivitate ridicată a mediului MSF, realizat în cadrul acestei etape, în a izola specific din aer sporii de <i>F. graminearum/Gibberella zae</i> .	1
În plus, acest mediu are caracteristica de a izola exclusiv ciuperci microscopice din genul <i>Fusarium</i> care produc o lipază extracelulară, deci care au un potențial toxigenic ridicat. Ciupercile care produc lipază se evidențiază printr-un halou produs pe mediul (care este opalescent și ușor rozaliu, datorită complexului ulei de măsline - rodamină B). Acest halou este fluorescent la iluminare cu lumina ultravioletă.	3
	5
	7

- 3 Mediu de cultură pentru diferențierea ciupercilor fitopatogene, toxigene, din genul
5 *Fusarium*, **caracterizat prin aceea că** este alcătuit din: 32...34 părți ulei de măsline
5 extravirgin, 0,095...1,05 părți fosfat monopotasie KH_2PO_4 ; 0,095...1,05 părți azotat de potasiu
7 KNO_3 ; 0,095...1,05 părți sulfat de streptomicină; 0,740...0,760 părți pentacloronitrobenzen;
7 0,47...0,52 părți $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,47...0,52 părți clorură de potasiu KCl ; 0,340...0,360 părți
9 sulfat de neomicină; 0,240 ...0,270 părți polietilen glicol sorbitan monooleat; 0,019... 0,021
9 părți Rodamină B, 19...21 părți agar și până la 1000 de părți apă, părțile fiind exprimate în
greutate.

