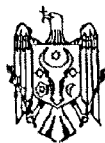




MD 719 Z 2014.08.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **719** (13) **Z**
(51) Int.Cl: *A01N 63/00* (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12R 1/39 (2006.01)

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

(21) Nr. depozit: s 2013 0105 (22) Data depozit: 2013.06.11	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2014.01.31, BOPI nr. 1/2014
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE ZOOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD (72) Inventatori: MELNIC Maria, MD; RUSU Ștefan, MD; ERHAN Dumitru, 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 a cartofului contra nematodului *Ditylencus destructor***

(57) **Rezumat:**

1
Invenția se referă la parazitologie, în special la un procedeu de combatere a nematodului *Ditylencus destructor* la cartof și poate fi utilizată în agricultură.

Procedeul de tratare a cartofului contra nematodului *Ditylencus destructor* include înmuiera cartofului înainte de sădire într-un

2
amestec de lichid cultural ce conține tulpină de bacterii *Pseudomonas fluorescens* CNM–PFB–01 cu un titru de 10⁹ cel./ml și apă, luate în raport de 1:(100...500) respectiv, în decurs de 20 ore.

Revendicări: 1

Figuri: 4

MD 719 Z 2014.08.31

(54) Method for treating potatoes against nematode *Ditylencus destructor*

(57) Abstract:

1
The invention relates to parasitology, in particular to a method for controlling potato nematode *Ditylencus destructor* and can be used in agriculture.

The method for treating potatoes against nematode *Ditylencus destructor* involves soaking of potatoes before planting in a

2
mixture of culture liquid containing bacteria strain *Pseudomonas fluorescens* CNM – PFB – 01 with a titer of 10^9 cells/ml and water, taken in the ratio of 1:(100...500) respectively, for 20 hours.

Claims: 1

Fig.: 4

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

(57) Реферат:

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

Способ обработки картофеля против нематоды *Ditylencus destructor* включает замачивание картофеля перед посадкой в смеси культуральной жидкости, содержащей штамм бактерий *Pseudomonas*

2
fluorescens CNM – PFB – 01 с титром 10^9 клеток/мл и воды, взятых в соотношении 1:(100...500) соответственно, в течение 20 часов.

П. формулы: 1

Фиг.: 4

Descriere:

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

5 În Republica Moldova cartofii sunt una dintre cele mai de perspectivă și mai rentabile culturi agricole. Printre bolile cartofilor mai nocivă și cu un impact economic important este ditilenhoza tuberculilor — boală cauzată de nematodul *Ditylenchus destructor* Thorne, 1945. Cercetările de laborator ale tuberculilor de cartofi, care au fost
10 colectați din depozite, au demonstrat că soiurile examinate sunt variat afectate cu *D. destructor*. Un nivel mai înalt de infestare cu ditilenhoză s-a constatat la cartofii de soiul Irga — 35...50% și Albi — 15...25%, recoltați în raioanele centrale ale republicii — Criuleni și Telenești. Mai puțin afectați s-au dovedit a fi cartofii de soiul Romano (0,5...10,0%), recoltați în raioanele de nord ale republicii — Briceni.

15 Pentru aprecierea gradului de atac al nematodului *Ditylenchus destructor* Thorne, 1945 a fost utilizată scara de 5 grade (Ivaniuc, Iliashenco, 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%.
20 Conform acestei scări soiul Irga, cu o infestare de 35...50% ce variază în dependență de zonă, corespunde soiurilor serios afectate.

De asemenea au fost cercetate stadiile bolii de ditilenhoză la tuberculii de cartofi după metoda Paramonov, Briuscova (1956), conform căreia în primul stadiu are loc
pătrunderea inițială a nematodului — pe tuberculi apar pete de circa 2 mm; în stadiile 2-
3 se mărește suprafața afectată, țesutul atacat devine cenușiu. În stadiile de boală 4-5
25 tuberculii afectați prezintă zone adâncite cu crăpături și zbârcituri tipice ale cojii, care se desprind ușor. Țesutul atacat devine spongios, de culoare închisă. În asemenea porțiuni ale cartofului cu greutatea de 80...100 g pot fi enumerați circa $40...60 \times 10^3$ indivizi de *D. destructor*, dominante fiind formele adulte. În aceste porțiuni putem depista nematozi
30 în toate stadiile de dezvoltare (fig. 1 — tuberculi de cartofi de soiul Irga afectați de *D. destructor*).

Conform standardelor internaționale cartofii de sămânță trebuie să fie liberi de nematozi fitoparaziți nocivi pentru această cultură — *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax* și *Ditylenchus destructor* (standard pentru cartofii de sămânță EAK OOH S-1).

35 Ținând cont de aspectele legate de instalarea fenomenelor de chimiorezistență la substanțele nematocide de sinteză și de existența reziduurilor chimice în produsele de origine vegetală, se pune accent din ce în ce mai frecvent pe stabilirea unor metode alternative de combatere a nematozilor fitoparaziți, responsabili de declanșarea bolilor de fitohelmintoze la culturile agricole, prin utilizarea unor produse biologice.

40 Actualmente, în Registrul de Stat al produselor de uz fitosanitar și al fertilizanților, elaborat în Republica Moldova în anul 2003 de către Centrul de Stat pentru Atestarea și Omologarea Produselor de Uz Fitosanitar și al Fertilizanților (Danilov, Gomoja, Ciobanu, Furnic, Lazari, 2003), nu este indicat nici un preparat nematocid, care ar putea fi utilizat în combaterea nematozilor fitoparaziți, destul de reprezentativi și permanenți la culturile legumicole — cartofi, tomate, castraveți, ceapă etc., atât în câmp, cât și în
45 spații protejate.

Reieșind din această situație, în cadrul a două Instituții de cercetări științifice ale AȘM - Institutul de Zoologie și Institutul de Microbiologie și Biotehnologie, au fost inițiate vaste cercetări în scopul evidențierii unor tulpini de microorganisme (bacterii, micromicete, actinomicete), cu proprietăți benefice pentru plante, inclusiv capacitatea
50 de distrugere a nematozilor. În rizosfera plantelor agricole microorganismele sunt permanent în contact cu nematozii, formând anumite biocenoze și diferite legături trofice. Este cunoscut faptul că nematozii fitoparaziți la plante sunt atacați de fungi și bacterii, ceea ce permite de a utiliza microorganismele din genul *Pseudomonas* în controlul biologic.

55 Dintre remediile de origine chimică pentru tratarea materialului de cartof semincer contra nematodului *D. destructor*, sunt recomandate următoarele preparate: Carbofuran 5%, Furadan 5%, Heterofos 5%, Carbation 1% [1].

Deoarece aceste preparate sunt de origine chimică, fiind și extrem de toxice, autorii recomandă prelucrarea cartofului cu ele doar în cazul infestărilor puternice. După utilizarea lor sunt impuse anumite restricții la consumul produselor, existând, de asemenea, mari riscuri de poluare a apei, solului și faunei. Tocmai de aceea, utilizarea produselor nematocide de origine chimică a fost drastic redusă în majoritatea țărilor. La moment, se caută alternative mai puțin poluante pentru combaterea nematozilor, printre care și *D. destructor*.

Utilizarea biopreparatelor în scopul combaterii nematozilor paraziți este una dintre cele mai de perspectivă metode de protecție a plantelor, utilizată în tratarea materialului semincer, stimulând totodată mecanismele de protecție — rezistența plantelor, fără simptome de toxicitate asupra dezvoltării acestora, reflectându-se astfel pozitiv asupra recoltei.

Actualmente, în majoritatea țărilor (Marea Britanie, Germania, Franța, Brazilia, Peru, 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*, *Fusarium*, *Verticillium*, *Paecilomyces*, *Pasteuria*, *Pseudomonas* etc. Unele specii din genul *Pseudomonas* — *Ps. micofaga*, *Ps. putida*, *Ps. fluorescens* (tulpina AP-33) etc. exercită înalte acțiuni fungicide, bactericide, nematocide asupra nematozilor ectoparaziți din familia *Trichodoridae*, care sunt purtători de tabrovirusi, accentuându-se acțiunea tulpinii, în primul rând asupra virusilor și apoi asupra nematozilor ectoparaziți, însă nu este descrisă în sursă acțiunea nematocidă a speciei de bacterii din genul *Pseudomonas* asupra nematodului tuberculilor de cartof — *Ditylenchus destructor* [2].

Problema pe care o soluționează invenția este combaterea eficientă a nematodului cartofului cu utilizarea unui biopreparat.

Ținând cont de nivelul înalt de infestare a cartofului cu *D. destructor* și de pierderile colosale provocate acestei culturi în R. Moldova a fost inițiată elaborarea unor metode biologice de combatere a nematodului *D. destructor* la cartof. În condiții de laborator a fost studiată și stabilită inofensivitatea tulpinilor din genul *Pseudomonas* asupra proceselor de germinare și acumulare de masă brută și uscată la plantele de soia, castraveți, porumb, cartofi etc. Rezultatele testării au demonstrat că acestea nu exercită efecte toxice asupra plantelor.

Invenția soluționează problema prin aceea că procedeul propus include înmuierea cartofului înainte de sădire într-o soluție ce conține lichid cultural cu un conținut de tulpină de bacterii *Pseudomonas fluorescens* CNM-PFB-01 de 10^9 cel./ml și apă, luate în raport de 1:(100...500) respectiv, în decurs de 20 ore.

Rezultatul invenției constă în combaterea eficientă a nematodului cartofului utilizând un biopreparat.

A fost studiată acțiunea nematocidă a tulpinii menționate asupra nematodului tuberculilor de cartofi de soiul Irga. Tulpina a fost izolată din rizoplanul soiei ce a fost crescută în cadrul AȘM.

Exemplul 1

Acțiunea toxică a lichidului cultural obținut din tulpina de bacterii genul *Pseudomonas fluorescens* CNM-PFB-01, cu titrul de cca 10^9 cel./ml, asupra nematodului fitoparazit al tuberculilor de cartofi *Ditylenchus destructor* a fost inițial studiată prin metoda de contact (Kurt, 1973). Nematozii paraziți *Ditylenchus destructor* s-au extras din tuberculii de cartofi de soiul Irga bolnavi de ditilenhoză, colectați din depozite, cu aplicarea metodei modificate a palniilor Baermann. S-au luat 6 cutii Petri cu diametrul de 5 cm, în toate s-a introdus prealabil câte o picătură de apă distilată. În primele 5 cutii s-au adăugat câte 50...100 indivizi *D. destructor*, cu dominanța formelor mature, care au fost selectați cu acul entomologic. A 6-a cutie a servit în calitate de martor. După care, în cutiile 1-5 — variante experimentale — s-a adăugat lichid cultural cu un conținut de tulpină de bacterii *Pseudomonas fluorescens* CNM-PFB-01 de 10^9 cel./ml și apă, luate în raport de: cutia nr.1 — 1:100, 2 — 1:200, 3 — 1:300, 4 — 1:400, 5 — 1:500, iar în cutia nr.6 — martor, numai apă distilată. Experiențele au avut loc în condiții de laborator la temperatura de 18...24°C. Reacția nematozilor, din variantele

experimentale, față de lichidul cultural al tulpinii menționate a fost urmărită la microscopul binocular în diferite intervale de timp: 2, 4, 10, 18, 20 ore. În procesul cercetărilor s-a observat o sensibilitate înaltă a *D. destructor* față de lichidul cultural *Pseudomonas fluorescens* CNM—PFB—01 cu titrul de cca 10^9 cel./ml în diluțiile menționate (vezi tabelul).

Cercetările efectuate au pus în evidență că raportul lichid cultural:apă de 1:100, 1:200 și 1:300 într-o expunere de 2...20 ore au practic aceeași eficacitate nematocidă asupra nematodului *D. destructor*. Eficacitatea terapeutică scade odată cu mărirea diluției lichidului cultural, fiind mai scăzută la diluția 1:400 și 1:500. Prin urmare, în continuare pentru cercetare s-a luat diluția optimă 1:300. Chiar în primele 2 ore de expunere a nematozilor în diluția 1:300 unele dintre ele se transformă în spirale, rămânând nemișcate. La un interval de 18...20 ore după expunere, la microscop se observă o distrugere totală a organelor interne ale nematodului *D. destructor* — intestinul median, intestinul posterior, ovarul, oviductul, uterul, sacul posterior, anusul, situate în cavitatea generală a corpului nematodului, se transformă într-o masă neomogenă (fig. 2 — nematodul *D. destructor* în contact cu *Pseudomonas fluorescens* CNM — PFB—01, a — înainte de contact; b — după 20 ore de contact; c — partea posterioară a corpului).

Efectul are loc ca rezultat al pătrunderii bacteriilor *Ps. fluorescens* în cavitatea corpului nematozilor distrugându-le. Se observă mai clar în partea posterioară — vulvă-anus. Rezultatele testării au demonstrat că lichidul cultural al tulpinii *Pseudomonas fluorescens* CNM — PFB—01 cu titrul de cca 10^9 cel./ml, în diluție de 1:300, nu exercită efecte toxice asupra plantelor.

Tabel

25

Nr. lotului	Diluția	Eficacitatea preparatului după administrare (%)				
		2 ore	4 ore	10 ore	18 ore	20 ore
I	1:100	20	35	50	90	100
II	1:200	10	30	40	90	100
III	1:300	10	30	40	90	100
IV	1:400	10	20	30	70	90
V	1:500	10	20	30	60	80
VI	martor	-	-	-	-	-

Conform rezultatelor experiențelor efectuate lichidul cultural al tulpinii *Pseudomonas fluorescens* CNM — PFB—01 cu titrul de cca 10^9 cel./ml, în diluție de 1:300 în contact timp de 20 ore cu nematodul fitoparazit *D. destructor* posedă toxicitate înaltă față de acest parazit și provoacă mortalitate de 100%.

Exemplul 2

După ce preventiv au fost selectați tuberculii de cartof de soiul Irga afectați cu nematodul *D. destructor*, o parte dintre ei au fost prelucrați prin înmuiere timp de 20 ore în lichidul cultural al tulpinii de bacterii *Ps. fluorescens* CNM—PFB—01 cu titrul de 10^9 cel./ml în diluție de 1:300 (1kg de cartofi se înmoaie în 2 litri de apă ce conține 6,6 ml de lichid cultural), iar cealaltă parte de cartofi nu a fost prelucrată cu nimic. Toți tuberculii de cartof au fost sădiți în sol neafectat de *D. destructor* (verificat preventiv la acest nematod).

În urma cercetărilor efectuate s-a constatat că pentru însămânțarea unui teren cu suprafața de un hectar cu tuberculi de cartof este necesară în medie o cantitate de 1650 kg de cartofi de sămânță și 3300 litri de soluție de 0,0033% pentru a prelucra această cantitate de cartofi. Pentru diluția de 1:300 respectiv la un hectar sunt necesari 11 litri de lichid cultural.

În imagine (fig. 3—cultura de cartof în vegetație: a) cultură de cartof al cărui tubercul nu a fost prelucrat înainte de sădire; b) cultură de cartof al cărui tubercul a fost prelucrat înainte de sădire), este arătat nivelul de dezvoltare a plantelor peste 40 de zile, la temperatura de 14...15°C, fiind evident efectul prelucrării cartofului cu biopreparatul revendicat.

Recolta de cartofi obținută este cu 30...35% mai mare în lotul unde cartofii au fost tratați înainte de sădire (fig. 4 —recoltă de cartof: a) recolta de cartof a cărui sămânță a fost prelucrată înainte de sădire, b) recolta de cartof a cărui sămânță nu a fost prelucrată înainte de sădire).

- 5 De asemenea, la recoltare, în lotul prelucrat cartofi afectați nu s-au depistat, iar în lotul netratat s-a evidențiat o infestare a acestora cu nematodul *D. destructor* de 90...95%.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Чуканцева Н. К. Рекомендации по защите картофеля от стеблевой нематоды в ЦЧР. ВНИИЗР, 1980, p.13
2. Козырева Н. И. Нематоды семейства *Trichodoridae* и их роль в распространении вирусных болезней на картофеле в московской области. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук, Москва, 2008

(57) Revendicări:

Procedeu de tratare a cartofului contra nematodului *Ditylencus destructor*, care include înmuierea cartofului înainte de sădire într-o soluție ce conține lichid cultural cu un conținut de tulpină de bacterii *Pseudomonas fluorescens* CNM-PFB-01 de 10^9 cel./ml și apă, luate în raport de 1:(100...500) respectiv, în decurs de 20 ore.

Director Departament:

GUȘAN Ala

Examinator:

COLESNIC Inesa

Redactor:

LOZOVANU Maria

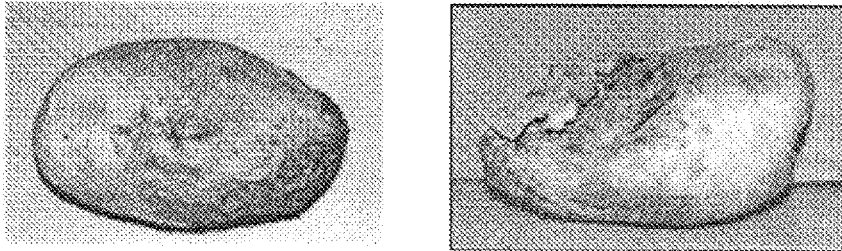


Fig. 1

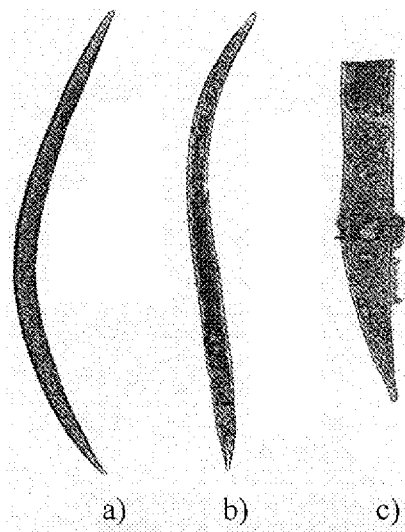


Fig. 2



Fig. 3

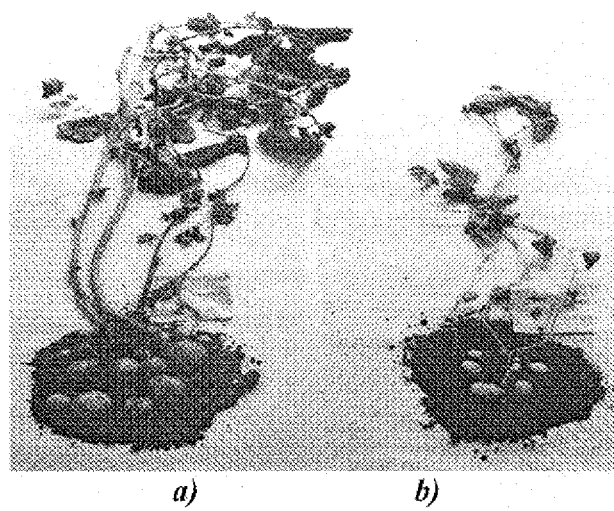


Fig. 4

RAPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii		
(21) Nr. depozit: s 2013 0105 (32) Data de prioritate recunoscută: (22) Data depozit: 2013.06.11 Raport de documentare internațională: ☐ da (67)* Nr. și data transformării cererii: , (71) Solicitant: ACADEMIA DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI INSTITUTUL DE ZOOLOGIE, MD (54) Titlul: Procedeu de tratare a cartofului contra nematodei <i>Ditylenchus destructor</i>		
II. Clasificarea obiectului invenției:		
(51) Int.Cl: <i>A01N 63/00</i> (2006.01) <i>C12N 1/20</i> (2006.01) <i>C12R 1/39</i> (2006.01)		
III. Colecții și Baze de date de brevete cercetate (denumirea, termeni caracteristici, ecuații de căutare reprezentative)		
MD - Intern « Documentare Invenții » (inclusiv cereri nepublicate; trunchiere automată stanga/dreapta): Int.Cl: <i>A01N 63/00</i> <i>C12N 1/20</i> <i>C12R 1/39</i> cartof, nematode EA Int.Cl: <i>A01N 63/00</i> <i>C12N 1/20</i> <i>C12R 1/39</i> картофель, нематоды		
IV. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate		
V. Documente considerate a fi relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este	Numărul revendicării

	cazul, indicarea pasajelor pertinente	vizate
A, C	Козырева Н. И. Нематоды семейства <i>Trichodoridae</i> и их роль в распространении вирусных болезней на картофеле в московской области, Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук, Москва, 2008	1
A, D	Чуканцева Н. К. Рекомендации по защите картофеля от стеблевой нематоды в ЦЧР. ВНИИЗР, 1980, с.13	1
A	MD 1146 G2 1999.07.31	1
A	MD 1400 C2 2000.01.31	1
A	MD 578 G2 1996.07.31	1
A	MD 737 G2 1997.06.30	1
A	EA 017284 B1 2012.11.30	1
A	EA 013402 B1 2010.04.30	1
A	EA 014045 B1 2010.08.30	1
A	EA 005168 B1 2004.12.30	1
* categoriile speciale ale documentelor citate:		
A – document care definește stadiul anterior general		T – document publicat după data depozitului sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidență principiul sau teoria pe care se bazează invenția
X – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă când documentul este luat în considerație de unul singur		E – document anterior dar publicat la data depozit național reglementar sau după aceasta dată
Y – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe documente de aceeași categorie		D – document menționat în descrierea cererii de brevet
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expoziție sau la orice alte mijloace de divulgare		C – document considerat ca cea mai apropiată soluție
		& – document, care face parte din aceeași familie de brevete
P - document publicat înainte de data de depozit, dar după data priorității invocate		L – document citat cu alte scopuri
Data finalizării documentării 2013.09.19		
Examinator COLESNIC Inesa		