



MD 1651 F2

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) **1651** ⁽¹³⁾ **F2**
(51) Int. Cl.⁷: C 12 N 1/14;
A 01 N 63/04;
C 12 G 1/18 //
C 12 N 1/14;
C 12 R 1:645

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată în termen de 6 luni de la data publicării	
(21) Nr. depozit: 96-0242 (22) Data depozit: 1995.01.27 (31) Nr.: 940463 (32) Data: 1994.01.31 (33) Țara: FI (41) Data publicării cererii: 1999.01.31, BOPI nr. 1/1999	(43) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului pe răspunderea solicitantului: 2001.04.30, BOPI nr. 4/2001 (86) PCT/FI95/00042, 1995.01.27 (87) WO 95/20646; 1995.08.03
(71) Solicitant: KEMIRA AGRO OY, FI (72) Inventatori: TAHVONEN Risto Tapio, FI; KESKINEN Milja Tuulikki, FI; LAHDENPERA Marja-Leena FI; SEISKARI Pekka Tapani, FI; TEPERI Esa Petri, FI; TUOMINEN Ulla Anita, FI (73) Titular: KEMIRA AGRO OY, FI (74) Reprezentant: GLAZUNOV Nicolai, MD	

(54) Tulpini de fungi *Nectria pityrodes* Montagne care manifestă proprietăți fungicide și procedeu de screening al lor, biofungicid, compoziție biofungicidă și metodă de inhibare a infecției fungice

(57) Rezumat:

1 Invenția se referă la protecția plantelor și poate fi utilizată pentru combaterea biologică a bolilor plantelor.

Esența invenției constă în aceea că sunt propuse tulpinile noi ale genului *Nectria pityrodes* Montagne J76, J1431, J1432, MOS1 și ROS2 pentru combaterea infecțiilor fungice la plante. Invenția se referă, de asemenea, la un procedeu de screening a acestor microorganisme pentru com-

2
5 baterea biologică a bolilor plantelor și la o metodă de inhibare a infecțiilor fungice. Sunt prezentate, de asemenea, un biofungicid, o compoziție biofungicidă și un procedeu de obținere a ei.
10 Rezultatul invenției constă în combaterea biologică a infecțiilor fungice la plante.
Revendicări: 11
Figuri: 6

MD 1651 F2

3

Descriere:

Invenția se referă la protecția plantelor și poate fi utilizată pentru combaterea biologică a bolilor plantelor cu ajutorul tulpinii de fungi *Nectria pityrodes* Montagne. De asemenea, invenția cuprinde și un procedeu de screening al tulpinii indicate, biofungicid, compoziție biofungicidă și metodă de inhibare a infecției fungice.

Plantele agricole sunt afectate de diverse boli fungice, bacteriene și virale, precum și de numeroase insecte dăunătoare. În vederea combaterii acestora s-au dezvoltat numeroase metode tehnice de cultivare și de combatere chimică și biologică. Scopul unor astfel de metode este prevenirea pierderilor calitative și cantitative de recoltă produse de bolile plantelor și dăunători.

În general, termenul combatere biologică a bolilor plantelor înseamnă combaterea patogenilor plantelor prin alte organisme care pot fi numite agenți de combatere biologică (ACB). Produsele dezvoltate de la ACB sunt deseori numite biopesticide. Mecanismele combaterii biologice a bolilor plantelor acționează variat și deseori efectul se bazează pe acțiunea comună a numeroase mecanisme diferite. Efectul combaterii poate fi bazat pe metaboliți de inhibare produși de agentul de combatere, iar uneori agentul de combatere poate parazita patogenul sau poate concura cu el pentru spațiu și/sau nutrienții accesibili.

Necesitatea descoperirii de noi agenți de combatere biologică a crescut prin faptul că numeroși agenți tradiționali de combatere chimică s-au eliminat datorită efectelor dăunătoare asupra mediului și ființelor umane. Un dezavantaj al chimicalelor ar fi, de exemplu, faptul că numeroși dăunători au devenit rezistenți la unul sau chiar numeroși agenți de combatere. În schimb, dezvoltarea rezistenței la biopesticide este puțin probabilă, deoarece efectul acestora se bazează pe un număr de mecanisme de tipuri diferite. De obicei, chimicalele acționează mai rapid și mai eficient decât biopesticidele. În schimb, biopesticidele sunt adesea cu acțiune de lungă durată comparativ cu chimicalele și efectul lor se bazează pe un microorganism viabil și reproducibil.

Se cunoaște un grup important de biopesticide, format din produsele bacteriene dirijate împotriva insectelor. Cel mai des folosite sunt bioinsecticidele bazate pe bacteria *Bacillus thuringiensis*. În Finlanda este produs un biofungicid bazat pe actinomicetul *Streptomyces*, care este eficient împotriva numeroaselor boli fungice apărute în sol și semințe. S-a dezvoltat un produs care este capabil să prevină răspândirea Formelor putregaiului rădăcinii (produs de *Heterobasidion annosum*) în pădurile de conifere, de la un fung mai puțin dăunător, *Phlebia gigantea* care condiționează putrezirea lemnului.

S-au studiat bacteriile genului *Pseudomonas*, în special ale speciilor *Pseudomonas fluorescens* și în prezent sunt cunoscute în număr mare tulpini ale *Pseudomonas fluorescens* care au activitate fungicidă [1, 2, 3, 4].

În același timp cu cercetarea microorganismelor adecvate pentru combaterea biologică, un număr mare de tulpini microbiene sunt alese, de obicei, pentru activitatea de combatere sau altă proprietate anumită. În publicațiile de brevet s-au descris multe procedee de screening.

Se cunoaște un procedeu de screening în trei etape unde, inițial, bacteriile se izolează din solul care conține din abundență spori ai fungului dăunător *Pythium*. În cea de-a doua etapă bacteriile izolate sunt cercetate într-o seră prin creșterea semințelor de cereale din sol, care conține o cantitate de spori de *Pythium* cu suspensie din fiecare bacterie de testat (testul de combatere) și fără ea, și din acest test sunt selectate bacterii în prezența cărora la plante se dezvoltă cele mai mari frunze și cresc cele mai înalte plante. În cea de-a treia etapă bacteriile alese sunt selectate în continuare în câmp într-un test similar celui din seră. La această etapă sunt de asemenea selectate bacteriile în prezența cărora plantele cresc cel mai bine [5].

Se cunoaște, de asemenea, un procedeu conform căruia mai întâi se crește miceliul unei tulpini *Pythium* pe un mediu de creștere adecvat, se așază pe miceliu un strat de sol steril la care se adaugă microorganismele de testat și se evaluează efectul asupra creșterii *Pythium*. La al doilea stadiu se inoculează o probă de sol cu o tulpină *Pythium* care produce putrezirea, se însămânțează solul cu sămânța unei plante sensibile la infecția fungică și se determină efectul organismului testat asupra creșterii plantei. Pentru testele următoare sunt selectate acele substanțe care sunt inhibitoare pentru *Pythium* în ambele teste menționate [2].

Însă aceste procedee de screening nu sunt potrivite pentru sortarea microorganismelor noi ce aparțin genului *Nectria*, descrise în invenție.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în depistarea microorganismelor eficiente din genul *Nectria* împotriva fungilor *Fusarium*, în izolarea și sortarea unor microorganisme noi și utilizarea lor pentru combaterea biologică eficientă a infecțiilor plantelor.

Invenția se referă la un microorganism al genului *Nectria*, *Nectria pityrodes* Montagne care s-a dovedit a fi foarte activ, în special, împotriva fungilor *Fusarium*.

MD 1651 F2

4

S-au găsit 5 tulpini care au dat rezultate foarte bune. Tulpinile care s-au numit J76, J1431, J1432, MOS1 și ROS2 s-au caracterizat la Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Olanda. Aceste tulpini s-au depozitat în conformitate cu Tratatul de la Budapesta la depozitul DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH).

5

Microorganism	Număr depozit	Data depozitului
<i>Nectria pityrodes</i> Montagne J76	DSM 7522	15 martie 1993
<i>Nectria pityrodes</i> Montagne J1431	DSM 8805	10 decembrie 1993
<i>Nectria pityrodes</i> Montagne J1432	DSM 8806	10 decembrie 1993
<i>Nectria pityrodes</i> Montagne MOS1	DSM 8807	10 decembrie 1993
<i>Nectria pityrodes</i> Montagne ROS2	DSM 8808	10 decembrie 1993

Caracteristicile morfologice ale microorganismelor sunt cele ce urmează.

10 Morfologice: Sporodochii fără hife marginale sterile. Conidiofori ramificați repetat cu câteva ramificații pornite la fiecare nod. Ultimele ramificații poartă spirale de fialide aranjate într-un strat asemănător palisadei. Fialide cilindrice de până la 15 mm lungime cu un por apical. Conidii produse în lanțuri sau globule cenușii, elipsoidale până la forma asemănătoare picăturii, cu un hil scurt, 7-8 x 4 mm, perete neted fără prelungiri.

Habitatul coloniei:

15 Colonia crește pe agar - fulgi de ovăz până la un diametru de 40 mm la 22°C în 7 zile; miceliu hialin, zone sporodochiale care sporulează, veziculare, verzi, aranjate în inele concentrice. Fără miros pronunțat, spatele coloniei lipsit de culoare, exsudat limitat, clar.

Structura conidioforului tulpinii J76 este similară celei de la *Myrothecium verrucaria*, dar diferă prin producerea sporodochiei lipsite de margine, conidii în lanțuri uscate și fără prelungirea tipică asemănătoare evantaiului.

20 Reprezentanții genului *Gliocladium* diferă de noile tulpini prin aceea că pentru *Gliocladium* este tipic să producă conidiofori individuali penicilați.

Astfel, tulpinile J76, J1431, J1432, MOS1 și ROS2 s-au identificat ca specii *Nectria pityrodes* Montagne.

25 De la aceste tulpini se pot prepara formulări neperisabile, care sunt ușor de împrăștiat în plantațiile care necesită combaterea bolii. O formulare se poate produce, de exemplu, ca pulbere. Cultivarea microbului se poate începe de la un inocul, care este un pelet PDA incluzând spori și care s-a menținut la -80°C. Microbul se poate cultiva fie ca o cultură lichidă, fie pe un suport solid. Mediul nutritiv cuprinde zahăr, de exemplu, sucroză și azot, precum și cantități mici de alți nutrienți. În cultivări se pot folosi medii nutritive specifice, de exemplu, CSL (Corn Steep Liquor), sau medii nutritive specifice, de exemplu, GYM (glucoză 4 g/l, extract de drojdie 4 g/l, extract de malț 10 g/l) sau PDC (bulion dextroză-cartof), pH-ul este circa 6.0 și se corectează la început, înainte de sterilizare. Cultivarea se realizează prin agitare de la una până la două săptămâni. Masa celulară se poate separa de bulion fie prin filtrare prin hârtie de filtru, fie prin centrifugare. Dacă se folosește cultivarea lichidă, la masa celulară se amestecă un purtător, de exemplu, silice, lapte praf și/sau CMC (carboximetilceluloză). Masa se usucă la temperatura camerei și se macină până la pudră.

35 Invenția se referă suplimentar la o compoziție biofungicidă, preparată din tulpina microbiană, care cuprinde ca ingredient activ tulpinile fungice menționate mai sus, aparținând genului *Nectria*, și, opțional, aditivi sau purtători convenționali în domeniu ca formulare corespunzătoare. Exemple de astfel de formulări sunt compoziții adecvate pentru acoperirea semințelor, compoziții pudră sau granulare de împrăștiat pe substraturile de creștere sau formulări lichide pentru tratarea solului.

40 Invenția asigură, de asemenea, un procedeu de screening al tulpinilor fungice, în care se folosește o secvență de testare în trei etape cuprinzând: a) izolarea ce se efectuează printr-un test pe nisip, cuprinzând însămânțarea semințelor de cereale pe un strat de nisip, pipetarea miceliului sau sporilor unui patogen și în continuare a sporilor fungului de testat într-o suspensie în apă pe semințe și în substratul de creștere, acoperirea semințelor cu nisip, examinarea intensității simptomelor de boală a lăstarilor după un timp corespunzător și eliminarea fungilor care nu influențează intensitatea bolii sau se dorește a fi ei înșiși patogeni; b) cercetarea ce se efectuează printr-un test pe turbă pentru fungi acceptați, cuprinzând udarea unei semințe de cereale într-o suspensie de spori ai patogenului de testat, uscarea seminței și c) selectarea ce se efectuează prin însămânțarea seminței în turbă tratată cu abur, creșterea pentru un timp corespunzător și observarea sănătății vâstarilor și oprirea pentru testele ulterioare a izolatelor fungice care inhibă în mod clar boala. În fiecare etapă a testării tulpinile fungice care se dovedesc a fi ineficiente se elimină de la

MD 1651 F2

5

testele ulterioare. Tulpinile fungice foarte bune în seră sunt luate apoi pentru teste de sortare în condiții de câmp.

În continuare se descriu pe scurt desenele însoțitoare ale invenției.

Fig. 1. Experimentul doză răspuns cu J76 în vara anului 1992. Procentul vlăstarilor îmbolnăviți folosind sămânța inoculată cu fungul *F. Culmorum*.

K reprezintă netratat, B reprezintă acoperire Baytan,

J76-0 reprezintă suspensie de spori ai tulpinii J76, $1,2 \times 10^7$ cfu/ml.

J76-1 reprezintă suspensie de spori ai tulpinii J76, $1,2 \times 10^6$ cfu/ml.

J76-2 reprezintă suspensie de spori ai tulpinii J76, $1,2 \times 10^5$ cfu/ml.

Fig. 2. Experimentul doză răspuns cu J76 în vara anului 1992.

Procentul vlăstarilor îmbolnăviți când se folosește sămânță sănătoasă. Abrevierile ca în fig. 1.

Fig. 3 până la 6. Histograme reprezentând efectul izolatelor fungice respinse la diferite stadii ale testelor în seră asupra sănătății lăstarilor în condiții de câmp.

K reprezintă netratat, B reprezintă acoperire Baytan I.

În continuare sunt descrise izolarea și caracterizarea tulpinilor fungice conform invenției, precum și testarea eficacității lor în condiții de câmp.

Sunt descrise formularea compozițiilor biofungicide formate din aceste tulpini, caracteristicile compozițiilor și testele de eficacitate cu aceste compoziții.

Izolarea microorganismelor

Probele de sol din care s-au izolat tulpinile fungice conform invenției s-au colectat în anii 1989, 1990 și 1991, toate la un loc în jur de 190. Probele s-au colectat din diferite părți ale Finlandei, în principal, din stațiunile de cercetare ale MTT (Agricultural Research Center), din diferite tipuri de sol și diferite rotații de culturi. Probele s-au luat din stratul rădăcinii (0-15 cm adâncime). S-au luat din fiecare câmp câteva probe și s-au depozitat până la probe de 1 până la 2 litri.

Izolările s-au făcut printr-o metodă de diluție (izolări din sol) sau o metodă de atragere la plantă (izolări de la rădăcină), a cărei realizare este descrisă în detaliu, în continuare, în secțiunea Metode.

Metode

Izolările microbilor:

a) Metoda diluției (izolări din sol)

S-au amestecat 10 g de sol la 100 ml agar-apă 0,5% (Bactoagar). S-au luat 3 subprobe de 10 ml din amestec și din fiecare s-au făcut două diluții (10^{-1} și 10^{-2}) în agar-apă 0,5%. Diluțiile s-au agitat (în baie de apă) într-un agitator de la 20 până la 30 minute. S-a pipetat 1 ml diluție într-un disc Petri gol și s-au turnat 20 ml de Littman Oxgall Agar (LOA). Discurile s-au incubat la temperatura camerei timp de 3-7 zile și apoi s-au izolat fungi individuali în culturi pure pe ADC (agar dextroză-cartof).

b) Metoda de atragere la plantă (izolări de la rădăcină)

S-au umplut cu sol de la o probă 15 vase dintr-o placă de vase seriale (placă de vase seriale Vefi - VP 96 cu vase de 50 ml). S-au însămânțat într-un vas 4 semințe de grâu, 4 de orz sau circa 15 de rapiță și 5 vase s-au folosit pentru fiecare specie de plantă. Semințele s-au acoperit cu nisip și vasele s-au udă și incubat într-o cameră de creștere la $+15^{\circ}\text{C}$ cu 14 ore perioadă de lumină de zi. După două săptămâni de cultivare plantele s-au cules și s-au spălat în apă curgătoare ori s-au curățat fără apă cu o pensulă. S-au tăiat din rădăcini bucăți mici și s-au depus pe plăci. Mediul folosit: LOA (10 g peptonă, 10 g dextroză, 15 g Bacto-Oxgall, 0,01 g cristal violet-B, 0,03 g streptomycină, 20 g agar și apă până la 1000 ml), PCNB (15 g peptonă, 1 g KH_2PO_4 , 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g Avicol, 3 ppm streptomycină, 20 g agar și apă la 1000 ml) și ADC-streptomycină (39 g preparat ADC, 300 ppm streptomycină și apă până la 1000 ml). După câteva zile de incubare s-au izolat fungi singulari și s-au subcultivat pe plăci ADC. Tulpinile s-au spălat în fiole ca pelete ADC (Nalgene 5000-0012, PP steril 1,2 ml) la -80°C .

Realizarea în seră a testelor metodei de sortare

Testul de nisip

Semințe ale unei cereale s-au însămânțat pe un strat de nisip. Inițial miceliu și spori ai patogenului și apoi spori ai fungului de testat sunt pipetați dintr-o suspensie în apă pe semințe și substratul de creștere, după care semințele se acoperă cu nisip. După două săptămâni și jumătate s-a examinat intensitatea simptomelor bolii la vlăstari. S-au eliminat de la experimentele ulterioare acei fungi care nu au afectat intensitatea bolii sau care s-au dovedit a fi ei înșiși patogeni.

Testul de turbă

O sămânță a unei cereale se umezește într-o suspensie de spori ai unui patogen și se usucă. După aceasta sămânța se umezește cu suspensia de spori ai fungului de testat, se usucă și se seamănă. Ca substrat de creștere se folosește turbă expusă la abur. Tulpinile fungice care previn în mod clar boala sunt luate pentru testul de sol în câmp.

MD 1651 F2

6

Teste de sol în câmp

Se pune sol din câmp mărunțit și udă în vase de 1,5 l și în fiecare vas se însămânțează 36 semințe de cereale. Tratamentele seminței înainte de însămânțare sunt făcute ca în testul de turbă și pentru fiecare tratare se folosesc câte trei vase replică. Simptomele vâstarilor sunt examinate după patru săptămâni de cultivare.

5 Tulpinile care s-au găsit bune în aceste teste s-au luat pentru testele în câmp, care dau certitudinea finală a efectului biopesticid al izolatelor microbiene selectate.

Patogenicitatea tulpinilor fungice

S-au examinat prin tatonări efectele dăunătoare posibile ale tulpinii fungice J76. Rezultatele, atât cât s-au putut obține, arată că fungul nu este patogen pentru plante. S-au testat 33 de specii de plante.

10

Experimental

Experimentele care urmează ilustrează utilizarea invenției. În subîmpărțirea (A) se descrie utilizarea tulpinilor fungice ca suspensii de spori *Nectria pityrodes*, tulpinile J76, J1431, MOS1 și ROS2 ale invenției, pentru combaterea bolilor plantei produse în principal de *Fusarium spp.* În subîmpărțirea (B) sunt descrise prepararea și utilizarea formulărilor făcute din aceste tulpini, în subîmpărțirea (C) sunt descrise experimentele prin care s-a examinat modul de acțiune al tulpinii J76 și în subîmpărțirea (D) sunt descrise realizarea și evaluarea procedurii de screening conform invenției.

15

(A) Utilizarea tulpinilor fungice ca suspensii de spori

20 Experimente cu suspensia de spori ai tulpinii J76

În vara anului 1992 s-a examinat efectul suspensiei de spori ai tulpinii J76 în trei locuri de testare. În teste s-au folosit două semințe diferite: grâu inoculat artificial cu *Fusarium culmorum* și orz infectat natural prin *F. nivale*.

25

Rezultatele testelor grâului sunt date în tabelul 1.

Rezultatele obținute cu grâu inoculat artificial sunt date în tabelul 2.

Observațiile vâstarilor la orz sunt date în tabelul 3.

Boala nu a avut nici un efect statistic semnificativ asupra orzului obținut.

Tabelul 1

Experimente în trei locuri de testare în vara anului 1992 cu grâu inoculat artificial. Răsărirea și rata îmbolnăvirii vâstarilor			
	Tratare	Vlăstari - număr/rând măsurat	Rata îmbolnăvirii - procentul de vlăstari îmbolnăviți sever
JOKIOINEN:	semințe sănătoase	50	5,2
	netratate	11	48
	acoperire-Baytan	45	10
	J76	47	7,2
MIETOINEN:	semințe sănătoase	45	7,3
	netratate	10	42
	acoperire-Baytan	39	3,8
	J76	33	13
PÄLKÄNE:	semințe sănătoase	50	3,0
	netratate	15	57
	acoperire-Baytan	51	24
	J76	45	11

30

Tabelul 2

Experimente în trei locuri de testare în vara anului 1992 cu grâu inoculat artificial. Rezultatele obținute (kg/ha)

tratare	JOKIOINEN	MIETOINEN	PÄLKÄNE
semințe sănătoase	3650	3190	5290
netratate	1830	1690	4940
acoperire-Baytan	3270	3190	4940
J76	3530	2950	4900

Tabelul 3

35 Experimentul în trei locuri de testare în vara anului 1992 cu orz infectat natural (*F. nivale*). Răsărirea și rata boli-vlăstar

Tratare	Vlăstari-număr/rând	Rata bolii-procentul vâstarilor
---------	---------------------	---------------------------------

MD 1651 F2

7

	măsurat	îmbolnăviți sever
JOKIOINEN:		
netratate	39	7,7
acoperire-Baytan	40	1,2
J76	40	0,9
MIETOINEN:		
netratate	42	7,4
acoperire-Baytan	42	1,4
J76	43	2,8
PÄLKÄNE:		
netratate	42	26
acoperire-Baytan	42	9,4
J76	44	6,3

Testul doză răspuns al tulpinii J76 în vara anului 1992

Cum J76 a dovedit în mod real rezultate bune în observațiile vlăstarilor la începutul verii anului 1992, s-a testat efectul ratei sale de aplicare asupra efectului de combatere într-un experiment, fiind însământat chiar înainte de mijlocul verii. S-a folosit sămânță de grâu sănătoasă și sămânță inoculată artificial cu *Fusarium culmorum*.

În experiment s-au folosit parcele mici de 2 m².

S-au observat răsărirea și simptomele de boală la vlăstari. Probele de vlăstari pentru urmărirea îmbolnăvirii s-au colectat la patru momente diferite. Probele pentru fiecare tratare s-au luat din patru parcele însământate separat pentru fiecare moment de prelevare a probei. Numerele de vlăstari observați sunt date în tabelul 4 și procentele vlăstarilor sunt date în tabelul 5, separat pentru sămânța îmbolnăvită și cea sănătoasă. Datele din tabelul 5 sunt prezentate grafic în figurile 1 și 2.

Tabelul 4

Experimentul doză răspuns pentru J76 în vara anului 1992. Răspândire	
tratare	vlăstari număr/rând măsurat
Semințe infectate cu <i>Fusarium</i>	
Netratate	18
Acoperire-Baytan	57
Suspensie de spori J76 (1,2x10 ⁷ cfu/ml)	74
Suspensie de spori J76 (1,2x10 ⁶ cfu/ml)	58
Suspensie de spori J76 (1,2x10 ⁵ cfu/ml)	51
Suspensie de spori J76 (1,2x10 ⁴ cfu/ml)	20
Semințe sănătoase	
Netratate	71
Acoperire-Baytan	66
Suspensie de spori J76 (1,2x10 ⁷ cfu/ml)	80

Tabelul 5

Experimentul doză răspuns pentru J76 în vara anului 1992. Procentul vlăstarilor îmbolnăviți cu sămânță inoculată cu *F. culmorum* și sămânță sănătoasă. Abrevierile ca în fig. 2

tratare	zile de la răsărire			
	10	17	30	44
Sămânță infectată cu <i>Fusarium</i> :				
K	75,4	82,8	79,5	85,1
B	15,9	60,9	65,3	78,2
J76-0	10,1	50,0	66,6	70,3
J76-1	23,1	51,8	55,5	62,9
J76-2	36,4	64,7	76,0	78,0
J76-3	68,6	72,8	77,1	76,2
Sămânță sănătoasă				
K	54,7	71,8	67,6	85,1
B	8,4	50,4	58,3	73,6
J76-0	14,3	48,0	69,9	73,8

Verificări în câmp cu suspensie de spori J76 în vara anului 1993

MD 1651 F2

8

Probele s-au realizat în Jokioinen, Mietoinen și Pälkäne.

În verificări s-au folosit 6 probe de semințe:

- grâu "Luja", infectat natural de fungul *F.culmorum*
- grâu "Luja", inoculat artificial cu fungul *F.culmorum*
- grâu "Luja", sănătos
- grâu "Laari", sănătos
- orz "Kustaa", infectat natural prin diverși fungi *Fusarium* și fungul *Bipolaris sorokiniana*
- ovăz "Yty", infectat natural prin fungul *F.avenaceum*

Probele de grâu sănătos de semințe s-au însămânțat numai în Jokioinen, pentru alte patru verificări de semințe, verificările efectuându-se în fiecare din cele trei localități de testare.

Pentru verificări s-au însămânțat parcele de 10 m² cu șase replici la tratament.

Tratările seminței au fost aceleași pentru fiecare probă de sămânță:

K = control netratat

B = control chimic, acoperire Baytan I

J76S = suspensie de spori J76 dintr-o placă de cultură (8,4x10⁶ cfu/kg semințe).

În tabelul 6 este dată intensitatea distrugerilor bolii pentru fiecare tratare și probă de sămânță.

Rezultatele obținute sunt date în tabelul 6.

Tabelul 6

Verificare în câmp cu suspensie de spori J76, 1993						
Procentul vâstarilor îmbolnăviți sever						
	Orz	Ovăz	Grâu infectat natural	Grâu inoculat artificial	"Luja" sănătos	"Laari" sănătos
JOKIOINEN						
K	6,0	10,1	7,4	34,2	20,6	5,7
B	0,9	2,0	2,1	1,0	1,4	0,7
J76S	0,9	1,4	0,7	1,0	3,3	5,7
MIETOINEN						
K	12,8	3,5	20,4	72,0		
B	1,3	0,6	5,7	6,6		
J76S	5,4	0	7,1	7,3		
PÄLKÄNE						
K	9,6	7,4	10,9	26,9		
B	2,5	3,3	2,1	0,6		
J76S	2,4	3,6	2,3	0		

Tabelul 7

Rezultate obținute de la verificările în câmp ale suspensiei de spori J76, 1993 (kg/ha)						
	Orz	Ovăz	Grâu infectat natural	Grâu inoculat artificial	"Luja" sănătos	"Laari" sănătos
JOKIOINEN						
K	7460	6650	6060	2950	6100	6360
B	7500	6790	5870	5690	5940	6060
J76S	7840	6650	6050	6040	6150	6570
MIETOINEN						
K	5900	5780	4920	3890		
B	6070	5200	4910	4990		
J76S	6120	5440	4670	4810		
PÄLKÄNE						
K	4670	5560	3630	2950		
B	4550	5200	4190	4000		
J76S	4710	5430	3710	3650		

Testarea J76 împotriva retezării grâului și piciorului rădăcinii de orz.

În vara anului 1993, s-a inclus J76 într-o verificare în câmp, unde s-au folosit 9 fungicide chimice pentru acoperirea semințelor de cereale testate împotriva retezării grâului (produsă de *Tilletia caries*). J76

MD 1651 F2

9

s-a aplicat ca suspensie de conidii, iar chimicalele conform instrucțiunilor lor de folosire. S-au folosit parcele de 0,1 m² și cinci replicări (tabelul 8).

Tabelul 8

Efectul tratării de acoperire în rețezare în verificarea grâului	
Tratare	Eficacitatea combaterii (%) (= descreșterea cantității de spice infectate)
Täyssato S lichid	78
Baytan Ws	100
Beret 050	100
Fungazil C	100
Panocrine 35	100
Raxil I pudră	100
Taxil I lichid	100
Prelude LS	100
Vitavax 200 FF	100
J76	85

5

În Baytan ingredientul activ este triadimenol. Baytan I este un amestec care include triadimenol și imazalil. Täyssato S cuprinde carboxin și imatalil. Ingredientul activ în Panocrin este guazatin.

Tratarea semințelor cu spori J76 a fost inclusă de asemenea într-o probă în câmp, în care agenții de combatere chimică s-au testat împotriva piciorului rădăcinii (*Bipolaris sorokiniana*) orzului. Nu s-a găsit nici o diferență în răsărire între tratări diferite. J76 a redus clar simptomele (tabelul 9), cu toate că patogenul este foarte diferit comparativ cu fungii *Fusarium* împotriva cărora este selectat.

Tabelul 9

Efectul tratărilor de acoperire împotriva rețezării rădăcinilor orzului	
Tratare	Eficacitatea combaterii (%) (= descreșterea numărului de vlăstari îmbolnăviți)
Prelude LS	85
Dividend 37,5 (400 ml)	84
Dividend 37,5 (200 ml)	81
Baytan I	81
Beret Special (400 ml)	74
Raxil I pudră	70
Täyssato S lichid	66
Panocrine Plus	66
Fungazil C	66
Beret special (200 ml)	65
Raxil I lichid	64
Beret FS 050	49
PNL 210	39
J76	69

15

(B) Formulări preparate din tulpinile fungice și efectele lor în verificările în câmp

Formulările pudră din tulpina fungică J76 s-au preparat după cum urmează:

Formularea 1

Cultivarea s-a realizat într-un balon Erlenmeyer de 1 l având 0,5 l mediu nutritiv, care a inclus sucroză 4 g/l, extract de drojdii 4 g/l și extract de malț 10 g/l. S-a corectat pH-ul la 6,0 înainte de sterilizare în autoclavă. Ca inocul s-a folosit un pelet de agar având incluși spori care fuseseră depozitați la -80°C (mediu agar-dextroză-cartof). Viteza de rotație a agitatorului a fost 150 rpm, temperatura de creștere a fost temperatura camerei (22°C) și durata cultivării 7...12 zile. Celulele s-au reparat prin filtrare pe hârtie de filtru. S-au amestecat la masa celulară silice, lapte praf și CMC (carboximetilceluloză) după cum urmează:

masa celulară	20%
silice	55%
lapte praf	15%
CMC (soluție 7% în apă)	10%

25

Amestecul s-a uscat la temperatura camerei pe discuri Petri deschise, în aer steril timp de 2 zile. Grosimea stratului a fost 1-2 cm. Amestecul uscat s-a măcinat până la pudră. Viabilitatea formulării a fost 10⁷ cfu/g (cfu = unități care formează colonie); cfu este o unitate care se folosește în determinarea

MD 1651 F2

10

viabilității microbilor. Suspensia diluată de microb se diseminează pe plăci de agar și coloniile se numără după câteva zile. Când este cunoscută diluția, pot fi determinate numărul coloniilor sau cantitatea de celule microbiene din proba inițială.

5 Formularea 2

Celulele s-au cultivat similar ca pentru Formularea 1, după care s-au amestecat cu masa celulară silice, lapte praf, CMC și acid ascorbic, după cum urmează:

masa celulară	60%
silice	20%
lapte praf	14%
CMC (7%)	3%
acid ascorbic	3%

Amestecul s-a uscat în același mod ca Formularea 1 și s-a măcinat până la pudră. Viabilitate 10^7 cfu/g.

10 Formularea 3

S-au cultivat celule similar ca pentru Formularea 1, după care s-au amestecat masa celulară cu sucroză și amidon, după cum urmează:

masa celulară	20%
sucroză	25%
amidon	55%

Amestecul s-a uscat în același mod ca Formularea 1 și s-a măcinat până la pudră. Viabilitate 10^7 cfu/g.

15 S-au cultivat tulpina J76 direct pe un mediu solid care include purtătorul silice. Pentru bulionul nutritiv s-au folosit 8% extract de malț (Maltex MP 10, Lahden Polttime). S-au amestecat într-un pahar de laborator 120 g bulion nutritiv cu 50 g silice pudră și s-au autoclavat 20 minute la 120°C . Mediul răcit s-a inoculat cu 10 g suspensie de spori J76, care s-a obținut prin raclarea sporilor de la o placă PDA în apă sterilă. Mediul s-a incubat 20 zile la 16°C , după care s-a uscat la temperatura camerei 2 zile. Viabilitatea preparatului uscat a fost 10^7 cfu/g.

20 Restul tulpinilor conform invenției se pot formula în mod similar.

Efectul formulărilor pudră în verificarea în câmp

În cele ce urmează sunt descrise verificările realizate de către Institute of Plant Protection la Agricultural Research Centre, Finlanda, în vara anului 1993 cu formularea pudră a tulpinii J76. Verificările s-au efectuat la MTT (Agricultural Research Centre) la Jokioinen, Mietoinen și Pälkäne. În verificări s-au folosit 6 probe de semințe:

- grâu "Luja", infectat natural de fungul *F.culmorum*
- grâu "Luja", inoculat artificial cu fungul *F.culmorum*
- grâu "Luja", sănătos
- grâu "Laari", sănătos

30 - orz "Kustaa", infectat natural prin diverși funghi *Fusarium* și funghi *Bipolaris sorokiniana*

- ovăz "Yty", infectat natural prin fungul *F.avenaceum*.

Probele de grâu sănătos s-au însămânțat numai la Jokioinen, pentru celelalte probe de semințe verificările efectuându-se în fiecare din cele trei locuri de testare.

Pentru verificări s-au însămânțat parcele de 10 m^2 cu șase replicări la tratare.

35 Tratările semințelor au fost aceleași pentru fiecare probă de semințe:

K = control netratat

B = control chimic, acoperire Baytan I

J76K = pudră J76 ca acoperire uscată ($8,4 \times 10^8$ cfu/kg: cea mai mare cantitate de semințe luată)

J76PN = pudră J76 ca acoperire lichidă ($8,4 \times 10^8$ cfu/kg)

40 În tabelul 10 este dată intensitatea distrugerilor bolii, separat pentru fiecare tratament și probă de sămânță. Rezultatele obținute sunt date în tabelul 10.

Tabelul 10

Verificări în câmp cu pudră J76 în anul 1993. Procentul vâstarilor îmbolnăviți sever

	Orz	Ovăz	Grâu infectat natural	Grâu inoculat artificial	"Luja" sănătos	"Laari" sănătos
JOKIOINEN						
K	6,0	10,1	7,4	34,2	20,6	5,7
B	0,9	2,0	2,1	1,0	1,4	0,7

MD 1651 F2

11

J76PK	2,2	1,5	2,7	7,0	6,2	2,8
J76PN	1,2	1,9	3,9	1,3	5,7	4,6
MIETOINEN						
K	12,8	3,5	20,4	72,0		
B	1,3	0,6	5,7	6,6		
J76PK	10,1	0	17,2	42,5		
J76PN	9,1	0,3	13,7	14,3		
PÄLKÄNE						
K	9,6	7,4	10,9	26,9		
B	2,5	3,3	2,1	0,6		
J76PK	5,3	2,6	4,8	6,1		
J76PN	3,9	3,8	3,9	2,7		

5

10

Tabelul 11

Rezultatele obținute ale verificărilor în câmp ale pudrei J76 în anul 1993

	Orz	Ovăz	Grâu infectat natural	Grâu inoculat artificial	“Luja” sănătos	“Laar” sănătos
JOKIOINEN						
K	7460	6650	6060	2950	6100	6360
B	7500	6790	5870	5690	5940	6060
J76PK	7610	6940	6060	5140	6400	6320
J76PN	7610	6970	6040	6020	6000	6400
MIETOINEN						
K	5900	5780	4920	3890		
B	6070	5200	4910	4990		
J76PK	6000	5670	4770	4620		
J76PN	6110	5760	4790	4950		
PÄLKÄNE						
K	4670	5560	3630	2950		
B	4550	5200	4190	4000		
J76PK	4730	5560	3600	3390		
J76PN	4870	5470	3660	3760		

15

Suplimentar, în anul 1993, s-a testat efectul de combatere al diferitelor formulări preparate din tulpina J76 împotriva a diferiți fungi. Rezultatele acestor experimente sunt date în tabelele 12-18.

Tabelul 12

Efectul de combatere al J76 în sol nisipos inoculat prin fungul *Gaeumannomyces* asupra grâului Polkka. Vasul de testat, adăpostit

20

Tratare	Răsărire, %	Procent sănătate totală	Index boală (0-3)	Greutate proaspătă	
				g/replicat.	g/vlăstar
Combaterea bolii (nu s-a tratat cu J76)	78,7	65,3	0,76	5,8	0,28
Acoperire uscată J76 KF 8 g/kg	81,3	76,0	0,55	10,1	0,46
Acoperire lichidă	90,7	81,3	0,31	10,4	0,43

MD 1651 F2

12

J76 10 ⁶ cfu/ml					
----------------------------	--	--	--	--	--

KF - Preparare fază solidă (Formulara 4).

Index boală

0 - sănătos

1 - îmbolnăvit ușor

2 - îmbolnăvit puternic

3 - nerăsărit

Tabelul 13

Efectul de combatere al tulpinii J76 împotriva fungului *Fusarium culmorum* pe grâu Polkka. În vasul test, ca substrat turbă. KF = crescut la fază solidă (Formulara 4), R = cultivare agitată în lichid (Formulara 1), M = microb ca în cultura din agar

Tratare	Procent răsărire	Procent sănătate totală	Index boală (0-3)	Greutate proaspătă g/replicat.
Sănătos	91	84	0,37	16,2
Combatere boală	30	5	2,37	16,2
Acoperire lichidă J76 KF 40/931 10 ⁶ cfu/ml	72	44	1,17	14,0
Acoperire lichidă J76 R 10/2 C 10 ⁶ cfu /ml	71	49	1,21	13,0
J76 M 10 ⁶ cfu/ml	76	58	0,99	14,8

Index boală

0 - sănătos

1 - îmbolnăvit ușor

2 - îmbolnăvit puternic

3 - nerăsărit

Tabelul 14

Efectul J76 împotriva *Pythium* pe castravete. Rezultate ca valori medii a trei vase test (pH 6,2, pH 6,4 și pH 7,4)

Tratare	Procentul răsădurilor vii	Index boală (0-2)	Greutate proaspătă g/replicare
Sănătos	98	0,04	12,1
Combatere boală	47	0,63	5,4
Acoperire lichidă J76 10 ⁶ cfu/ml	58	0,52	6,9

Index boală

0 - sănătos

1 - mort

2 - nerăsărit

Tabelul 15

Efectul de combatere al tulpinii fungice J76 pe conopidă în sol nisipos contaminat prin fungul

Rhizoctonia solani. Vasul testat în seră

Tratare	Procentul răsăririi	Procent sănătate totală	Greutate proaspătă	
			g/replicare	g/vlăstar
Netratat	92,7	52,0	21,7	0,79
Acoperire lichidă J76 10 ⁷ cfu/ml	94,7	72,0	24,1	0,84

Tabelul 16

Efectul de combatere al tulpinii fungice J76 pe orz "Kustaa" în sol nisipos inoculat cu fungul *Fusarium nivale*. Vasele testate afară, adăpostite

Tratare	Procent răsărire	Procent sănătate totală	Index boală (0-3)	Greutate proaspătă g/replicare
Sănătos	93,3	37,3	0,91	8,9

MD 1651 F2

13

Combatere boală	73,3	29,3	1,43	7,8
Acoperire lichidă J76 KF 10 ⁶ cfu/ml	80,0	52,0	0,91	9,7
Acoperire lichidă J76 10 ⁶ cfu/ml	81,3	52,0	0,93	10,3

Index boală

0 - sănătos

1 - îmbolnăvit ușor

2 - îmbolnăvit puternic

3 - nerăsărit

Tabelul 17

Efectul de combatere al tulpinii fungice J76 împotriva fungului *Alternaria brassicicola* asupra conopidei. Rezultatele sunt valori medii ale experimentelor la trei temperaturi diferite (15°C, 20°C și 25°C)

Tratare	Procentul răsăririi	Index boală (0-3)	Greutate proaspătă g/replicare
Sănătos	96	0,17	33,2
Combatere boală	50	2,01	21,8
Acoperire lichidă J76 10 ⁶ cfu/ml	96	0,22	35,4

Index boală

0 - sănătos

1 - îmbolnăvit ușor

2 - îmbolnăvit puternic

3 - mort sau nerăsărit

Rezultatele experimentelor asupra efectului de combatere a 5 tulpini *Nectria pityrodes* conform invenției (J76, J1431, J1432, MOS1 și ROS2) pe *Fusarium culmorum* la grâu, sunt reprezentate în tabelul

18. Rezultatele sunt date ca media valorilor a două experimente, în unul folosindu-se ca substrat turbă, iar în celălalt sol din câmp.

Tabelul 18

Efectul de combatere a 5 tulpini *Nectria pityrodes* (J76, J1431, J1432, MOS1 și ROS2). Împotriva fungului *Fusarium culmorum* pe grâu. Rezultatele sunt date ca media valorilor a două vase testate (turbă și sol din câmp)

Tratare	Procent sănătate totală	Index boală (0-3)	Greutate proaspătă g/replicare
Combatere boală	23	2,06	3,0
Acoperire lichidă J76 10 ⁷ cfu/ml	73	0,66	8,0
Acoperire lichidă J1431 10 ⁷ cfu/ml	80	0,51	8,5
Acoperire lichidă J1432 10 ⁷ cfu/ml	72	0,78	8,0
Acoperire lichidă MOS1 10 ⁷ cfu/ml	76	0,66	8,8
Acoperire lichidă 10 ⁷ ROS2 cfu/ml	76	0,66	8,3

Index boală

0 - sănătos

1 - îmbolnăvit ușor

2 - îmbolnăvit puternic

3 - nerăsărit

(C) Mod de acțiune prin J76

Observațiile preliminare ale modurilor în care J76 acționează ca antagonist al altor fungi s-au făcut prin microscop și în câteva teste de laborator.

Primele reacții distincte s-au dovedit a fi foarte rapide, ele observându-se la microscop ca interacțiuni ale hifei lui J76 și fungului *F.culmorum*. La punctele de contact ale miceliului celulei hifei *Fusarium* încep să se descompună vizibil la circa 1 oră după contact. Inițial pereții celulei își pierd forma, apoi celulele se golesc și în final pereții celulei se descompun în totalitate. De la punctele contactului descompunerea hifei

MD 1651 F2

14

Fusarium avansează și se răspândește ușor. Când J76 și *F.culmorum* s-au crescut împreună timp de câteva zile, hifele fungului *Fusarium* nu s-au mai putut observa, oricât de mult s-au căutat. De asemenea, sporii săi (atât conidii, cât și clamidospori) se descompun prin efectul lui J76, dar mai încet decât hifele. De obicei, hifele J76 se pliază strâns în jurul sporilor *Fusarium* înainte de descompunerea lor. Până în prezent nu există nici o observație conform căreia J76 ar pătrunde în hifele *Fusarium*.

Pe baza observărilor microscopice se poate concluziona că, probabil, J76 secretă substanțe biologice active în mediul său înconjurător. Natura lor poate fi asemănătoare enzimelor sau antibioticelor. Producerea lor poate fi de asemenea principalul mod de acțiune prin J76, deoarece nu s-a observat parazitarea direct pe alți fungi și prin creșterea sa lentă este evident că nu poate concura eficient pentru nutrienți. Date ale producerii metaboliților care afectează creșterea altor fungi s-au obținut, de asemenea, într-un test celofan.

Când J76 și *F.culmorum* cresc față în față pe un substrat de creștere foarte subțire, se formează o zonă de inhibiție în care creșterea *Fusarium* încetează. Pe un substrat de grosime normală nu s-a găsit aceasta. Fenomenul se datorează probabil concentrațiilor mici de substanțe difuzate în substrat. Substanțele volatile secretate de către J76 de asemenea au un efect de combatere asupra *F.culmorum* prin slăbirea creșterii acestuia.

Testul celofan s-a efectuat pe substratul de creștere și s-a fixat un film de celofan și pe acest film s-a cultivat tulpina J76.

După cultivare timp de 10 zile filmul, și împreună cu el J76, s-au îndepărtat. Substanțele secretate de J76 și transportate prin film au rămas în substrat. Drept control s-au folosit plăci care au avut doar filmul de celofan fără J76. Rezultatele testului celofan sunt date în tabelul 19.

Tabelul 19

Efectul metaboliților produși de fungul J76 asupra creșterii <i>F.culmorum</i> în testul celofan; rata de creștere mm/zi	
J76	2,5
Control	6,2

(D) Realizarea procedurii de screening al tulpinii de fungi și evaluarea rezultatelor teste de nisip
Substrat însămânțat

Ca substrat de însămânțare s-a folosit nisip, cu mărimea particulei 0,2-0,7 mm (Kauniston Sura Oy, Loimaa). Nisipul s-a umezit prin amestecarea a 4 părți de nisip și a unei părți apă. Dintr-o placă de vase seriale (Vefi - VP 96) s-a decupat o placă de 5x7 vase (de 50 ml) și s-a pus într-o cutie de plastic. Vasele s-au umplut cu nisip umezit, astfel încât o porțiune de 1-1,5 cm de la marginea lor superioară să rămână neumplută. La fiecare vas s-au însămânțat trei semințe de grâu de primăvară "Luja".

Tratări

Infecția *Fusarium culmorum*: S-a crescut *F.culmorum* pe plăci PDA la temperatura camerei pentru circa 1 lună (până când a sporulat complet). Miceliile cu spori s-au separat de la placă și s-au amestecat cu apă distilată cu un omogenizator Ultra-Turrax. Cantitatea de spori s-a corectat la 10^6 spori/ml. Soluția s-a înghețat ca porțiuni de 30 ml la -20°C în recipiente Minigrip. Pentru test, soluțiile congelate s-au dezghețat și s-au reamestecat. Soluția s-a folosit ca diluție 10^{-2} (soluția de bază). Patogenitatea tulpinilor *Fusarium* s-a menținut prin circulara lor la plante (s-au inoculat semințe de grâu cu suspensie *Fusarium* și s-a reisolat patogenul din vârstarii îmbolnăviți).

Suspensie antagonistă: Un pelet PDA luat din congelator și care include antagonistul s-a împărțit în trei părți și s-a pregătit să crească pe trei plăci PDA. Plăcile s-au incubat la temperatura camerei (la întuneric) timp de circa 3 săptămâni. Soluția de bază a suspensiei antagoniștilor s-a preparat prin raclarea a două plăci de antagonist la 50 ml apă distilată. S-au amestecat cu omogenizator Ultra-Turrax. Din soluția de bază s-au făcut diluții de 10^{-1} și 10^{-3} .

Tratările seminței: Inițial s-a pipetat 1 ml de suspensie *F.culmorum* pe semințele însămânțate pe placa de vase seriale și pe ea 1 ml de suspensie de antagonist. S-au tratat 15 semințe în 5 vase de 50 ml cu toate cele 6 combinații ale densităților de spori ale suspensiilor (2 diluții ale suspensiilor *F.culmorum* x 3 diluții ale suspensiilor antagonistului).

Tratările de control: Fiecare placă de vase folosite pentru testarea unui fung a avut în plus 15 semințe în 5 vase care s-au tratat numai cu soluția de bază a fungului testat.

În testele de nisip s-au testat în același moment 15 până la 30 tulpini fungice. De asemenea, în fiecare zi testele s-au început însămânțând o placă de vase separate cu ajutorul căreia s-a verificat sănătatea semințelor, precum și patogenitatea inoculului *F.culmorum* pentru producerea bolii.

MD 1651 F2

15

Trei tratări de control, pe o placă separată au fost: neinoculat (doar apă), inoculare cu soluție de bază *F.culmorum* și inoculare cu o diluție a soluției de bază *F.culmorum* (10^{-2}). Pentru fiecare dintre aceste trei tratări s-au însămânțat 30 de semințe în 10 vase.

- 5 Condiții de creștere: După pipetarea suspensiilor fungice, semințele s-au acoperit cu nisip umezit. Cutiile cu plăcile de vase s-au învelit în plastic transparent și s-au transferat într-o cameră de creștere (10-15°C, 14 ore lumină de zi).

- 10 După creșterea lăstarilor timp de 16 până la 18 zile, ei s-au spălat sub un robinet cu apă curgătoare și s-au făcut observații asupra simptomelor bolii. Vlăstarii la care rădăcina sau celulele coleoptilului nu s-au înnegrit și semințele nerăsărite au rămas tari s-au considerat sănătoși. Vlăstarii care au avut simptome distincte și semințele nerăsărite care s-au înmuiat s-au considerat îmbolnăviți.

Mai întâi s-au examinat plantele tratării de control. Dacă din semințele tratate cu apă s-au dezvoltat numai plante sănătoase și din ambele tratări cu patogenul s-au obținut simptome distincte de îmbolnăvire, testul s-a acceptat și s-a decis să se facă observații ale plantelor tratate cu tulpinile fungice de testat.

- 15 În testul de nisip s-a determinat gradul dat, pentru fiecare tulpină fungică izolată, al numărului de plante tratate cu el și considerate a fi îmbolnăvite.

Dacă răsărirea plantelor tratate cu fungul de testat doar s-a redus distinct, comparată la controlul sănătos, sau dacă s-au găsit alte simptome de boală, fungul s-a dovedit a fi nepotrivit pentru testele ulterioare. Dacă nu s-au găsit distrugerii, fiecare din cele 6 combinații ale densităților de spori ai patogenului și densitățile de spori ale fungului de testat s-au gradat separat pe o scară:

- 20 0 = toate cele 15 plante sănătoase
1 = nu mai mult de 2 plante distruse
2 = 3-5 plante distruse
3 = 6-9 plante distruse
4 = 10-13 plante distruse
25 5 = nu mai mult de 1 plantă sănătoasă

Pe baza celor 6 grade individuale menționate mai sus, s-au selectat acele tulpini fungice de testat care s-au luat pentru etapa următoare de testare, adică testele de turbă. Pentru continuare s-au acceptat acele tulpini care au obținut de cel puțin trei ori gradele 0 și 1. Dacă fungul nu obține nici un grad 0, el a fost acceptat pentru continuare dacă a obținut de cel puțin 4 ori gradul 1.

- 30 Teste de turbă
Substrat de creștere

Ca substrat de creștere s-a folosit turbă expusă la abur și fertilizată cu var. Până în toamna anului 1992 s-a folosit turbă brută necernută de la Torronsuo, după care s-a folosit turbă brută, deja cernută de la Eurajoki.

- 35 Fertilizare: 800 g var dolomitic și 100 g de turbă Y-lannos/100 l de turbă (Y-lannos = marcă comercială a unui fertilizator finlandez universal).

Turba umezită s-a împrăștiat în cutii de plastic (28,5x49,5x9,4 cm, Weibulls Robusta "Mammut"-box, Muoviyhtymä Oy) ca strat de 5 cm. Pe fundul cutiei s-a pus o folie de plastic.

- Tratări

- 40 T = sămânță de grâu de primăvară "Luja", sănătoasă, neinoculată.

F = sămânță inoculată *F.culmorum*. Semințele s-au îmbibat în soluție de bază *F.culmorum* (s-a folosit soluție în surplus) incluzând circa 10^6 spori/ml (cultivare *Fusarium* conform testului de nisip). După tratare sămânța s-a lăsat să se usuce peste noapte împrăștiată pe hârtie.

- 45 F0 = inoculare *F.culmorum* ca în tratarea F. După uscare semințele s-au udat cu soluția de bază a antagonistului. Soluția de bază s-a obținut prin raclarea miceliului și sporilor dintr-o placă de antagonist în 25 ml de apă distilată. Tratarea s-a realizat prin agitarea semințelor și soluției antagonistului într-un vas mic de plastic. După tratare semințele s-au uscat pe hârtie.

F2 = inoculare *F.culmorum* ca în tratarea F. Tratare cu antagonist ca în tratarea Fo cu diluție 10^{-2} de soluție de bază a antagonistului.

- 50 S-au însămânțat la turbă 10 rânduri cu 30 semințe/rând. Secvența de însămânțare a fost următoarea: rând de protecție, F, F0, F2, T, F, F0, F2, T rând de protecție. După însămânțare, semințele s-au acoperit cu turbă și cutiile s-au udat.

Condițiile de creștere

- 55 Însămânțările s-au crescut în seră la o temperatură de circa 15°C. La perioada de întuneric s-a dat lumină suplimentară cu lămpi multimetale timp de 12 ore/zi. Când a fost nevoie, însămânțările s-au udat cu apă. Durata cultivării a fost de 18 zile.

Gradarea

MD 1651 F2

16

Lăstarii s-au spălat și s-au făcut observații asupra simptomelor lor de boală, așa cum s-au făcut după testul de nisip. Pe baza observațiilor făcute la tratările T și F s-a decis dacă rezultatul testului a fost acceptat. Controlul sănătos (T) nu s-a permis să aibă împreună mai mult de 12 plante bolnave (peste 60 semințe însămânțate) și controlul patogen (F) a trebuit să aibă cel puțin 52 plante îmbolnăvite (peste 60 semințe). O tulpină fungică testată s-a acceptat pentru faza următoare de testare (verificări în sol de câmp), dacă din semințele tratate cu una din cele două concentrații de soluție (până la 60 semințe) s-au dezvoltat nu mai mult de 19 plante îmbolnăvite.

Teste în sol de câmp

Substrat însămânțat

Solul folosit (pământ nisipos) s-a adus din zona de verificare în câmp la Jokionen. Solul (în iarna 1992-1993) fie s-a mărunțit manual, fie s-a trecut printr-o sită de 1x1 cm din tablă. S-au umplut vase din plastic de 1,5 l (Ø 14 cm) astfel încât de la marginea superioară a rămas o porțiune de 3-4 cm neumplută.

Tratări

1. Sămânță sănătoasă. S-a udat doar cu apă distilată.

2. Control *Fusarium*. Semințele s-au udat cu inoculant *Fusarium* (pentru preparare, vezi testele de nisip) care a avut circa 10^6 spori/ml, soluția folosindu-se în exces.

3. Inoculare ca în controlul *Fusarium*. Când semințele s-au uscat, s-au tratat cu suspensia de antagonist care s-a preparat prin amestecarea miceliului și sporilor de la o placă de 25 ml apă distilată. Tratarea s-a efectuat într-un vas de plastic, în care s-au pus 130 semințe (120-150 semințe) și 1 ml (sau 1,5 ml) de suspensie de antagonist.

4. Controlul fungicid. Inoculare ca în controlul *Fusarium*. Când semințele s-au uscat, s-au tratat cu 2 g de praf de acoperire Baytan I la 1 kg de semințe. Mai devreme s-au folosit, de asemenea, tratări Ceresan și Tăyssato S.

Semințele tratate s-au însămânțat în vase, 36 semințe/vas, trei replicate/tratare. Însămânțările s-au acoperit cu sol din câmp. Condițiile de creștere ca în testul de turbă. Timpul de cultivare, circa 4 săptămâni.

Examinare și gradare

Lăstarii s-au spălat și s-a evaluat rata lor de îmbolnăvire:

0 = sănătos deplin

1 = ușoară distrugere de *Fusarium*

2 = boală cu distrugeri moderat-puternice

3 = vlăstari înnegriți peste tot - moarte

Eficacitatea testelor în seră

În vara anului 1993 s-a testat eficacitatea metodei de selecție într-un experiment extins în câmp. În test s-a examinat dacă s-au luat corect unele din tulpinile fungice izolate pentru testele ulterioare în seriile de teste de selecție între octombrie 1991 și februarie 1993. Pentru tratările seminței s-au ales în mod arbitrar 60 dintre acele tulpini care au fost abandonate în testele de nisip și care s-au dovedit a nu fi patogene pentru grâu. Dintre tulpinile eliminate în testele de turbă, 92 s-au repartizat pentru test. Toți cei 58 fungi selectați la testele de sol s-au luat de asemenea pentru test. Dintre aceștia 43 s-au eliminat în testele de sol și 15 s-au selectat pe baza lor pentru verificările în câmp.

Suplimentar la cele 210 tratări menționate mai sus, testul a inclus, de asemenea, 6 tratări de control (K), acoperire Baytan I (B) și 4 tulpini fungice studiate de cele mai multe ori în testele anterioare pe bază de J76.

În test s-a folosit grâu "Luja" infectat natural prin fungul *F-culmorum*. Ca unitate de observare s-a folosit un rând de lăstari lung de 1,4 m pentru însămânțarea căruia au fost necesare 5,5 g semințe. S-au însămânțat patru replicate pentru toate cele 216 tratări. Randomizarea testului s-a făcut în conformitate cu desemnarea experimentală a rețelei cubice. În acest mod s-a redus eroarea de variație care se poate atribui factorilor de sol. După circa 5 săptămâni de la însămânțare, vlăstarii s-au scos din sol, s-au numărat și s-au studiat simptomele lor de boală.

Rezultatele testului sunt ilustrate prin 4 histograme în fig. 3-6. Între izolatele eliminate în testul de turbă și izolatele nepatogene eliminate în testul de nisip nu s-a observat nici o diferență. Testul de turbă s-a lucrat evident bine. Prin urmare, tulpinile luate pentru testele ulterioare au fost în medie, în mod clar, mai bune decât cele eliminate.

În testele de nisip și turbă luate împreună, s-au abandonat câțiva fungi, care oricum s-ar fi eliminat. Pe de altă parte, pe baza testului de sol s-a abandonat o cantitate substanțială de izolate foarte bune, dar dintre cele luate în verificările în câmp numai 2 din 15 au avut efect eficient în condiții naturale.

Din rezultate se poate trage concluzia că pe baza testelor de nisip și turbă se pot selecta cei mai buni antagoniști pentru studii ulterioare, dar la testele în sol de câmp se pot elimina chiar candidați de antagoniști buni.

MD 1651 F2

17

- Testarea tulpinii fungice J1431 în teste de selecție
Dintre tulpinile fungice conform invenției, J1431 s-a testat în toate cele trei experimente făcute în seră.
În testul de nisip J1431 au obținut gradele 0, 0, 1, 1, 1 și 2 și s-au luat pentru teste ulterioare.
În testul de turbă J1431 a obținut următoarele rezultate:
- 5 T: 3 îmbolnăviri
F: 36 îmbolnăviri
F0: 3 îmbolnăviri
F2: 7 îmbolnăviri
În testul de sol de câmp, unde s-a inclus J1431, procentul vlăstarilor îmbolnăviți, în tratări a fost:
- | | |
|---------------------------|-----|
| sănătos | 66% |
| controlul <i>Fusarium</i> | 87% |
| acoperire Baytan I | 31% |
| J1431 | 19% |
- 10 Pe baza testelor de selecție J1431 s-a luat pentru un experiment în câmp cu alte 61 tulpini fungice în vara anului 1993. În test s-a folosit grâu "Luja" de primăvară, inoculat artificial cu suspensie de spori ai fungului *F.culmorum*. Semințele s-au însămânțat în parcele de un singur rând (1,4 m) și testul a avut 6 replicări. După 34 zile de la însămânțare, vlăstarii s-au scos din sol, s-au spălat și s-au făcut observații ale simptomelor lor de boală. S-au obținut ca vlăstari sănătoși/rând măsurat, în diferite tratări:
- | | |
|---------------------------|-------|
| controlul <i>Fusarium</i> | 5,9 |
| acoperire Baytan I | 56 |
| J76 | 61 |
| J1431 | 65 |
| alte tulpini testate | 30-68 |
- 15 Testarea tulpinii fungice J1432 în teste de selecție
J1432 a fost testat în toate cele trei teste de selecție făcute în seră.
În testul de nisip J1432 a obținut următoarele rezultate: 0, 0, 0, 1, 1 și 2 și a fost luat pentru următoarele teste.
- 20 În testul de turbă J1432 a obținut următoarele rezultate:
- T: 10 îmbolnăviri
F: 60 îmbolnăviri
F0: 10 îmbolnăviri
F2: 37 îmbolnăviri
- 25 În testele în sol de câmp, în care s-a inclus J1432, procentele vlăstarilor îmbolnăviți în diferite tratări au fost:
- | | |
|-------------------------|-----|
| sănătos | 56% |
| control <i>Fusarium</i> | 98% |
| acoperire Baytan I | 18% |
| J1432 | 38% |

Pe baza rezultatelor testului în sol de câmp J1432 s-a îndepărtat de la verificările în câmp.

MD 1651 F2

18

(57) Revendicări:

1. Tulpină de fungi *Nectria pityrodes* Montagne J76 cu numărul de depozit DSM 7522 care manifestă proprietăți fungicide.
- 5 2. Tulpină de fungi *Nectria pityrodes* Montagne J1431 cu numărul de depozit DSM 8805 care manifestă proprietăți fungicide.
3. Tulpină de fungi *Nectria pityrodes* Montagne J1432 cu numărul de depozit DSM 8806 care manifestă proprietăți fungicide.
4. Tulpină de fungi *Nectria pityrodes* Montagne MOS1 cu numărul de depozit DSM 8807 care manifestă proprietăți fungicide.
- 10 5. Tulpină de fungi *Nectria pityrodes* Montagne ROS2 cu numărul de depozit DSM 8808 care manifestă proprietăți fungicide.
6. Procedeu de screening al tulpinii de fungi care include izolarea, cercetarea și sortarea microorganismului, **caracterizat prin aceea că** tulpina de fungi reprezintă tulpini de *Nectria pityrodes* Montagne conform revendicărilor 1-5, izolarea se efectuează printr-un test de nisip, cuprinzând însămânțarea semințelor de cereale pe un strat de nisip, pipetarea pe semințe și în substratul de creștere a miceliului și sporilor de patogen și ulterior a sporilor de fungi testați sub formă de suspensie apoasă, după care semințele se acoperă cu nisip, se examinează intensitatea simptomelor de afecțiune a germenilor și se elimină fungii care nu influențează asupra intensității afecțiunii sau care se manifestă ei înșiși ca patogeni; cercetarea se efectuează printr-un test de turbă pentru fungii acceptați, cuprinzând umectarea semințelor de cereale într-o suspensie de spori ai patogenului și uscarea semințelor; umectarea semințelor într-o suspensie de spori ai fungului de testat, uscarea semințelor și însămânțarea lor în turbă tratată cu abur, creșterea semințelor și aprecierea stării germenilor; sortarea microorganismului se efectuează pentru testele ulterioare ale microorganismelor care inhibă în mod clar afecțiunea patogenă.
- 20 7. Biofungicid care conține ingredient activ, **caracterizat prin aceea că** în calitate de ingredient activ el conține cel puțin o tulpină de genul *Nectria pityrodes* Montagne J76, J1431, J1432, MOS1 și ROS2 cu numărul de depozit respectiv DSM 7522, DSM 8805, DSM 8806, DSM 8807, DSM 8808 care manifestă proprietăți fungicide.
- 25 8. Compoziție biofungicidă care conține ingredient microbian activ, purtători și/sau aditivi uzuali, **caracterizată prin aceea că** în calitate de ingredient microbian activ compoziția conține cel puțin o tulpină de genul *Nectria pityrodes* Montagne J76, J1431, J1432, MOS1 și ROS2 cu numărul de depozit respectiv DSM 7522, DSM 8805, DSM 8806, DSM 8807, DSM 8808 care manifestă proprietăți fungicide.
- 30 9. Compoziție biofungicidă conform revendicării 8, **caracterizată prin aceea că** purtătorii și/sau aditivii sunt selectați din grupul substanțelor care constau din silice, lapte praf, carboximetilceluloză, sucroză, acid ascorbic și amidon.
- 35 10. Procedeu de obținere a compoziției biofungicide care include cultivarea unei tulpini de fungi conform revendicărilor 1-5, cu proprietăți fungicide, separarea masei celulare și adăugarea la aceasta a purtătorilor și/sau aditivilor, uscarea și transformarea în pudră a masei obținute, **caracterizat prin aceea că** se efectuează: a) cultivarea tulpinii de fungi cu proprietăți fungicide conform uneia din revendicările 1-5 într-un mediu de creștere corespunzător, sau b) cultivarea tulpinii de fungi cu proprietăți fungicide conform uneia din revendicările 1-5 într-un mediu de creștere corespunzător cu silice și opțional se adaugă la masa celulară purtători și/sau aditivi.
- 40 11. Metodă de inhibare a infecției fungice la o plantă, care constă în aplicarea la o plantă sau pe semințele acesteia a inhibitorului acestei infecții, **caracterizată prin aceea că** în calitate de inhibitor se utilizează biofungicid conform revendicării 7, sau o compoziție biofungicidă conform revendicărilor 8 și 9, iar aplicarea lor se efectuează în substratul de creștere înainte, sau după însămânțarea semințelor.
- 45

(56) Referințe bibliografice:

1. WO 92/18613 A
2. FI 921722 A
3. WO 90/01327 A
4. EP 228457 A
5. US 4647 539 A

Seef Secție:

CRASNOVA Nadejda

Examinator:

BAZARENCO Tatiana

Redactor:

CANȚER Svetlana

MD 1651 F2

19

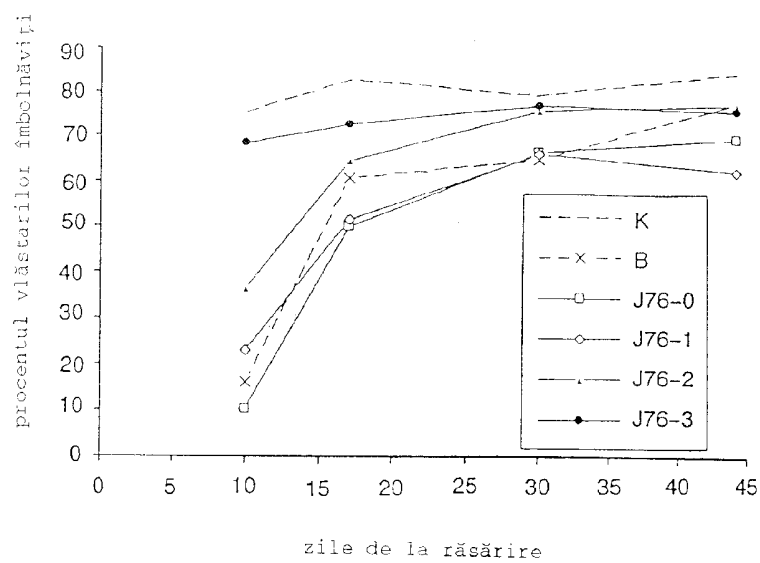


Fig. 1

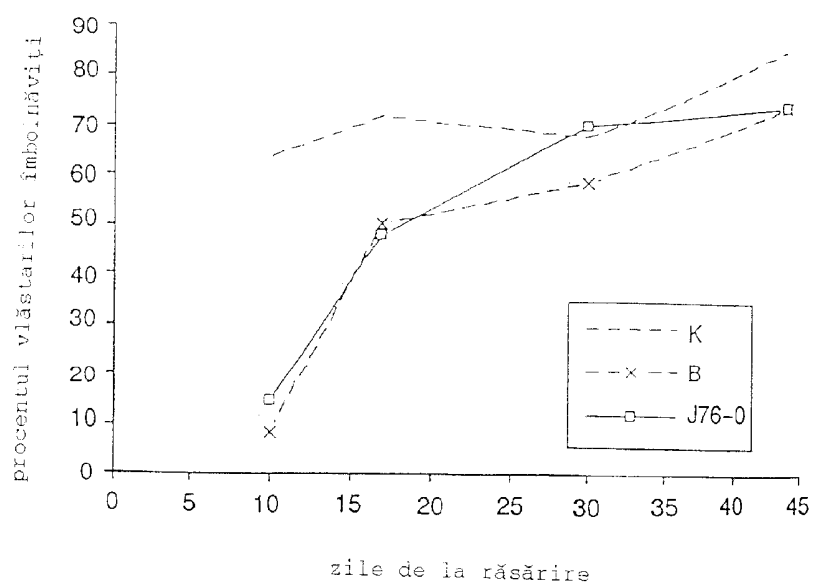


Fig. 2

MD 1651 F2

20

□ = 1 izolat izolat de la rădăcini ■ = 1 izolat izolat direct din sol

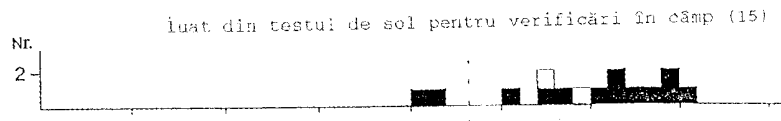


Fig. 3

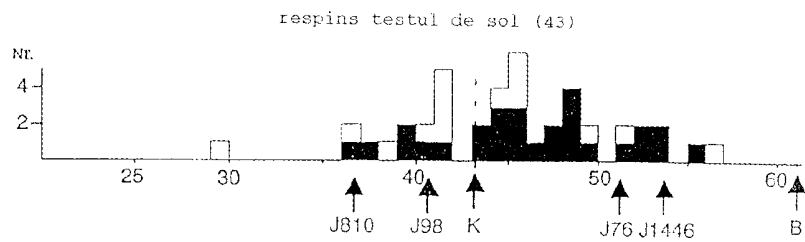


Fig. 4

□ = 1 izolat izolat de la rădăcini ■ = 1 izolat izolat direct din sol

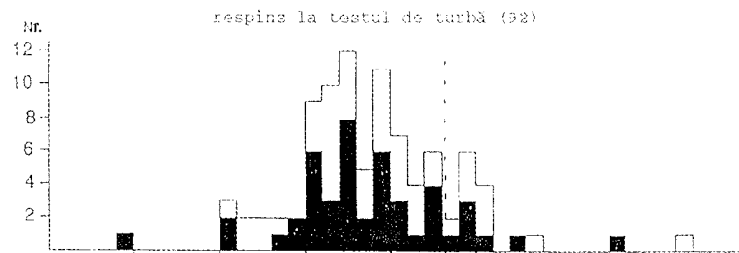


Fig. 5

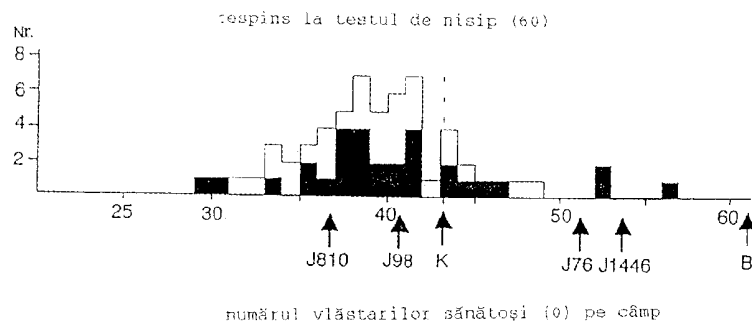


Fig. 6

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit:97-0176							
(22) Data depozit:1997.07.02							
(1) (54) Titlul : Procedeu de tratare a semințelor de morcov înainte de semănat Termeni caracteristici în limba română: tratarea semințelor, substanțe biologice active							
D O C U M E N T A R E ÎN LITERATURA DE BREVETE DE INVENȚII							
Indicii clasificărilor de brevete : (51) Int. Cl. : A 01 C 1/00 <table> <tr> <td>MD Perioada 1993-1997</td> <td> Brevete:n-u selectat Cereri publicate: n-au selectat Cereri nepublicate: n-au selectat </td> </tr> <tr> <td>BEA Perioada: 1996 1999</td> <td> Brevete: n-au selectat Cereri: n-au selectat Rapoarte de documentare: n-au selectat </td> </tr> <tr> <td>Data 01.09.1998</td> <td>Examinator , Bazarenco Tatiana</td> </tr> </table>		MD Perioada 1993-1997	Brevete:n-u selectat Cereri publicate: n-au selectat Cereri nepublicate: n-au selectat	BEA Perioada: 1996 1999	Brevete: n-au selectat Cereri: n-au selectat Rapoarte de documentare: n-au selectat	Data 01.09.1998	Examinator , Bazarenco Tatiana
MD Perioada 1993-1997	Brevete:n-u selectat Cereri publicate: n-au selectat Cereri nepublicate: n-au selectat						
BEA Perioada: 1996 1999	Brevete: n-au selectat Cereri: n-au selectat Rapoarte de documentare: n-au selectat						
Data 01.09.1998	Examinator , Bazarenco Tatiana						

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: 96-0242	(85) Data fazei naționale PCT: 1996.08.29
(22) Data depozit: 1995.01.27	(86) Cerere internațională PCT: PCT/FI95/00042, 27.01.1995
Prioritatea invocată : (31) nr.: 940463 32) data : 31.01.1994 33) țara :FI (51) Int. Cl. (7) : C 12 N 1/14; A 01 N 63/04; C 12 G 1/18//C 12 N 1/14; C 12 R 1:645 (54) Titlul : Tulpini fungice de Nectria pityrodes Montagne care manifestă proprietăți fungicide și (55) procedeu de selectare a lor, biofungicid, compoziție biofungicidă și metodă de inhibare a infecției fungice (71) Solicitantul : Kemira AGRO OY, FI Termeni caracteristici : tulpinile, cultivarea, screening, al tulpinii, biofungicide și compozițiile biofungicide, inhibare infecțiilor fungice	
I. Minimul de documente consultate (sistema clasificării și indicii de clasificare)	
C.I.B. 7: C 12 N 1/14; A 01 N 63/04; C 12 G 1/18//C 12 N 1/14; C 12 R 1:645 MD 1993- 1994	
II. Documente considerate ca relevante	
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si indicarea pasajelor pertinente
	Numărul revendicării vizate
☐ Documentele următoare sunt indicate în continuare a rubricii II	
☐ Informația referitoare la brevete paralele se anexează	
* categoriile speciale ale documentelor consultate:	P - document publicat înainte de data depozitului național reglementat dar după data priorității invocate
A - document care definește statutul general al tehnicii	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 evidența principiul sau teoria care conține baza invenției
E - document anterior dar publicat la data de depozit național reglementar sau după aceasta data	X - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă
L - document care poate pune în discuție data priorității invocate, poate contribui la data publicării altor divulgări sau pentru un motiv expres (se va indica motivul)	Y - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe alte documente de aceeași natură, aceasta combinație fiind evidentă pentru o persoană de specialitate
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expunere sau orice altă	& - document care face parte din aceeași familie de documente
Data efectuării documentării	2000.06.26
Examinatorul	Bazarenco Tatiana

ANEXĂ la RAPORTUL DE DOCUMENTARE

Informația referitoare la brevete paralele		(21) Nr. depozit:	
Date de identificare ale documentelor citate în raport	Data publicării	Brevete paralele	Data publicării
1	2	3	4