

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 biofungică 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 chimicelor 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 reproductibil.

Se cunoaște un grup important de biopesticide, format din produsele bacteriene dirijate împotriva insectelor. Cel mai des folosit 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 fungică [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*.

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).

Microorganism	Număr depozit	Data depozitului
J76 <i>Nectria pityrodes</i> Montagne	DSM 7522	15 martie 1993

J1431	<i>Nectria pityrodes</i> Montagne	DSM 8805	10 decembrie 1993
J1432	<i>Nectria pityrodes</i> Montagne	DSM 8806	10 decembrie 1993
MOS1	<i>Nectria pityrodes</i> Montagne	DSM 8807	10 decembrie 1993
ROS2	<i>Nectria pityrodes</i> Montagne	DSM 8808	10 decembrie 1993

Caracteristicile morfologice ale microorganismelor sunt cele ce urmează.

Morfologice: Sporochii 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:

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.

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.

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.

Invenția se referă suplimentar la o compoziție biofungicidă, preparată din tulpina microbială, 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.

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 cereală 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 vlăstarilor 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 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. Se descrie, de asemenea, o metodă pentru sortarea tulpinilor fungice izolate din probe de sol.

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 udat 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 streptomicină, 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 streptomicină, 20 g agar și apă la 1000 ml) și ADC-streptomicină (39 g preparat ADC, 300 ppm streptomicină 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.

Teste de sol în câmp

Se pune sol din câmp mărunțit și udat 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 vlăstarilor sunt examinate după patru săptămâni de cultivare.

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.

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.

(A) Utilizarea tulpinilor fungice ca suspensii de spori

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*.

Rezultatele testelor grâului sunt date în tabelul 1.

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

Observațiile vlăstarilor 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 vlăstarilor

	Tratare	Vlăstari - număr/rând măsurat	Rata îmbolnăvirii - procentul de vlăstari îmbolnăviți sever
NEN: JOKIOI	semințe	50	5,2
	sănătoase		
	netratate	11	48
	acoperire-	45	10
	Baytan		
	J76	47	7,2
NEN: MIETOI	semințe	45	7,3
	sănătoase		
	netratate	10	42
	acoperire-	39	3,8
	Baytan		
	J76	33	13
NE: PÄLKÄ	semințe	50	3,0
	sănătoase		
	netratate	15	57
	acoperire-	51	24
	Baytan		
	J76	45	11

Tabelul 2

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

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

Tabelul 3

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

	Tratare	Vlăstari -număr/rând măsurat	Rata bolii-procentul vlăstarilor îmbolnăviți sever
JOKIOI			
NEN:			

	netratate	39	7,7
	acoperire-	40	1,2
Baytan			
	J76	40	0,9
<hr/>			
MIETOI			
NEN:			
	netratate	42	7,4
	acoperire-	42	1,4
Baytan			
	J76	43	2,8
<hr/>			
PÄLKÄ			
NE:			
	netratate	42	26
	acoperire-	42	9,4
Baytan			
	J76	44	6,3
<hr/>			

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 1992, s-a testat efectul ratei sale de aplicare asupra efectului de combatere într-un experiment, fiind însămânțat 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 însămânțate 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,	79	85,1
		8	,5	
B	15,9	60,	65	78,2
		9	,3	

J76-0	10,1	0	50,	66	70,3
			,6		
J76-1	23,1	8	51,	55	62,9
			,5		
J76-2	36,4	7	64,	76	78,0
			,0		
J76-3	68,6	8	72,	77	76,2
			,1		
Sămânță sănătoasă					
K	54,7	8	71,	67	85,1
			,6		
B	8,4	4	50,	58	73,6
			,3		
J76-0	14,3	0	48,	69	73,8
			,9		

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

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 vlăstarilor îmbolnăviți sever

	O	Grâu	Grâu	"	"La
rz	văz	Oinfectat	inoculat	Luja"	ari"
		natural	artificial	sănătos	sănătos
JOKIOINEN					
K	6	1	7,4	34,2	2
	,0	0,1			0,6
B	0	2	2,1	1,0	1
	,9	,0			,4
J76S	0	1	0,7	1,0	3
	,9	,4			,3
MIETOINEN					
K	1	3	20,4	72,0	
	2,8	,5			
B	1	0	5,7	6,6	
	,3	,6			
J76S	5	0	7,1	7,3	
	,4				
PÄLKÄNE					
K	9	7	10,9	26,9	
	,6	,4			

B	2	3	2,1	0,6
J76S	2	3	2,3	0

Tabelul 7

Rezultate obținute de la verificările în câmp ale suspensiei de spori J76, 1993 (kg/ha)

	O	O	Grâu	Grâu	“	“L
rz	văz	Oinfestat	inoculat	Luja”	aari”	“L
		natural	artificial	sănătos	sănătos	
JOKIOINEN						
K	7	6	6060	2950	6	63
B	7	6	5870	5690	5	60
J76S	7	6	6050	6040	6	65
	840	650			150	70
MIETOINEN						
K	5	5	4920	3890		
B	6	5	4910	4990		
J76S	6	5	4670	4810		
	120	440				
PÄLKÄNE						
K	4	5	3630	2950		
B	4	5	4190	4000		
J76S	4	5	3710	3650		
	710	430				

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 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 retezare în verificarea grâului

Tratare	Eficacitatea combaterii (%) (= descreșterea cantității de spice infectate)
Täyssato S lichid	78
Baytan Ws	100
Beret 050	100
Fungazil C	100
Panoctine 35	100
Raxil I pudră	100
Taxil I lichid	100
Prelude LS	100
Vitavax 200 FF	100
J76	85

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 Panoctin 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 retezării 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
Panoctine Plus	66
Fungazil C	66
Beret special (200 ml)	65
Raxil I lichid	64
Beret FS 050	49
PNL 210	39
J76	69

(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:

Formulara 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%

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 10^7 cfu/g (cfu = unități care formează colonie); cfu este o unitate care se folosește în determinarea 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.

Formulara 2

Celulele s-au cultivat similar ca pentru Formulara 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 Formulara 1 și s-a măcinat până la pudră. Viabilitate 10^7 cfu/g.

Formulara 3

S-au cultivat celule similar ca pentru Formulara 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 Formulara 1 și s-a măcinat până la pudră. Viabilitate 10^7 cfu/g.

S-a 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.

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
- 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 m² cu șase replicări la tratare.

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)

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

Tabelul 10

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

	O	G	Gr	"Lu	"La
rz	văz	Orâu	âu	ja" sănătos	ari" sănătos
		infectat	inoculat		
		natural	artificial		
JOKIOINEN					
K	6,	1	7,	34	20,6
0	0,1	4	,2		5,7
B	0,	2	2,	1,	1,4
9	,0	1	0		0,7
J76PK	2,	1	2,	7,	6,2
2	,5	7	0		2,8
J76PN	1,	1	3,	1,	5,7
2	,9	9	3		4,6
MIETOINEN					
K	12	3	20	72	
,8	,5	,4	,0		
B	1,	0	5,	6,	
3	,6	7	6		
J76PK	10	0	17	42	
,1		,2	,5		
J76PN	9,	0	13	14	
1	,3	,7	,3		
PÄLKÄNE					
K	9,	7	10	26	
6	,4	,9	,9		
B	2,	3	2,	0,	
5	,3	1	6		
J76PK	5,	2	4,	6,	
3	,6	8	1		
J76PN	3,	3	3,	2,	

9 ,8 9 7

Tabelul 11
Rezultatele obținute ale verificărilor în câmp ale pudrei J76 în anul 1993

	O rz	O văz	G râu infectat natural	Gr âu inoculat artificial	“Lu ja” sănătos	“La ar” sănătos
JOKIOINEN						
K	7	6	60	29	610	636
460	650	60	50	0	0	
B	7	6	58	56	594	606
500	790	70	90	0	0	
J76PK	7	6	60	51	640	632
610	940	60	40	0	0	
J76PN	7	6	60	60	600	640
610	970	40	20	0	0	
MIETOINEN						
K	5	5	49	38		
900	780	20	90			
B	6	5	49	49		
070	200	10	90			
J76PK	6	5	47	46		
000	670	70	20			
J76PN	6	5	47	49		
110	760	90	50			
PÄLKÄNE						
K	4	5	36	29		
670	560	30	50			
B	4	5	41	40		
550	200	90	00			
J76PK	4	5	36	33		
730	560	00	90			
J76PN	4	5	36	37		
870	470	60	60			

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

Tratare	R ăsărire, %	Procent sănătate totală	Index boală (0-3)	Greutate proaspătă	
				g/re plicat.	g/ vlăstar
Combate rea bolii (nu s-a tratat cu J76)	78 ,7	65,3	0,76	5,8	0, 28
Acoperir e uscată J76 KF 8 g/kg	81 ,3	76,0	0,55	10,1	0, 46
Acoperir e lichidă J76 10 ⁶ cfu/ml	90 ,7	81,3	0,31	10,4	0, 43

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	Pr ocent răsărire	Procent sănătate totală	Ind ex boală (0- 3)	Gre utate proaspătă
				g/re plicat.
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 răsadurilor 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 răsării	Procent sănătat e totală	Greutate proaspătă	
			g/re plicare	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	Pr ocent răsărire	Procent sănătate totală	Inde x boală (0- 3)	Greut ate proaspătă g/replicare
Sănătos	93 ,3	37,3	0,91	8,9
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 ROS2 cfu/ml	10 ⁷	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 *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 biologic 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 *F.culmorum* 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 umed, 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 10⁶ 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 circularea lor la plante (s-au inoculat semințe de grâu cu suspensie *Fusarium* și s-a reisolat patogenul din vlăstarii 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.

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.

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).

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.

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:

- 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
- 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.

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 Torrionsuo, după care s-a folosit turbă brută, deja cernută de la Eurajoki.

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

Turba umedă s-a împărțiat 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

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 împărțiată pe hârtie.

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.

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

Însămânțările s-au crescut în seră la o temperatură de circa 15°C. La perioada de întineric 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

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 10⁶ 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 funghi 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 replicare 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 funghi, 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.

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:

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%

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

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.

În testul de turbă J1432 a obținut următoarele rezultate:

T: 10 îmbolnăviri

F: 60 îmbolnăviri

F0: 10 îmbolnăviri

F2: 37 îmbolnăviri

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.