



MD 4251 B1 2013.09.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4251** (13) **B1**
(51) Int.Cl: *C12N 1/14* (2006.01)
C12R 1/885 (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

<p>In termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului</p>	
<p>(21) Nr. depozit: a 2012 0087 (22) Data depozit: 2012.10.12</p>	<p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2013.09.30, BOPI nr. 9/2013</p>
<p>(71) Solicitant: INSTITUTUL DE PROTECȚIE A PLANTELOR ȘI AGRICULTURĂ ECOLOGICĂ AL AȘM, MD (72) Inventatori: ȘCERBACOVA Tatiana, MD; VOLOȘCIUC Leonid, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE PROTECȚIE A PLANTELOR ȘI AGRICULTURĂ ECOLOGICĂ AL AȘM, MD</p>	

(54) **Mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de fungi *Trichoderma lignorum* CNMN-FD-14**

(57) **Rezumat:**

Invenția se referă la microbiologie și fitopatologie, în particular la un mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de fungi *Trichoderma lignorum* CNMN-FD-14 – producătoare de biopreparat care poate fi utilizat pentru protecția biologică și în calitate de stimulator de creștere a plantelor.

Mediul nutritiv, conform invenției, conține, în g/L: melasă din sfeclă de zahăr – 20,0; zaharoză – 10,0; KH₂PO₄ – 2,0; MgSO₄x7H₂O – 1,0; NaNO₃ – 2,0; CaCO₃ – 2,0 și apă potabilă – restul, cu pH 5,5...6,0.

Revendicări: 1

MD 4251 B1 2013.09.30

(54) Nutrient medium for cultivation of *Trichoderma lignorum* CNMN-FD-14 fungal strain

(57) Abstract:

1
The invention relates to microbiology and
phytopathology, in particular to a nutrient
medium for cultivation of *Trichoderma*
lignorum CNMN-FD-14 fungal strain –
producer of biopreparation that may be used
for biological protection and as plant growth
promoter.

2
The nutrient medium, according to the
invention, comprises, in g/L: molasses from
sugar beet – 20.0; sucrose – 10.0; KH_2PO_4 –
2.0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1.0; NaNO_3 – 2.0; CaCO_3
– 2.0 and drinking water – the rest, with pH
5.5...6.0.

Claims: 1

(54) Питательная среда для культивирования штамма грибов *Trichoderma lignorum* CNMN-FD-14

(57) Реферат:

1
Изобретение относится к микробио-
логии и фитопатологии, в частности к
питательной среде для культивирования
штамма грибов *Trichoderma lignorum*
CNMN-FD-14 – продуцирующего биопре-
парат который может быть использован
для биологической защиты и в качестве
стимулятора роста растений.

2
Питательная среда, согласно изобре-
тению, содержит, в г/л: мелассу из сахарной
свеклы – 20,0; сахарозу – 10,0; KH_2PO_4 –
2,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,0; NaNO_3 – 2,0; CaCO_3
– 2,0 и питьевую воду – остальное, с pH
5,5...6,0.

П. формулы: 1

15

Descriere:

Invenția se referă la microbiologie și fitopatologie, în particular la un mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de fungi *Trichoderma lignorum* CNMN-FD-14 – producătoare de biopreparat care poate fi utilizat pentru protecția biologică și în calitate de stimulator de creștere a plantelor.

Este cunoscut mediul nutritiv de cultivare submersă a tulpinii de fungi *Trichoderma lignorum* F-5 – producătoare de Trihodermin, utilizat pentru combaterea agenților patogeni din genul *Fusarium*. Componenta mediului (g/l): peptonă – 3; zaharoză – 5; extract de porumb – 10; NaNO₃ – 2, apă curentă până la 1 litru, durata de cultivare constituie 6 zile [1].

Dezavantajele acestui mediu sunt prețul înalt al peptonei, durata îndelungată de cultivare, cât și faptul că preparatul obținut conține miceliu granular, care este greu de utilizat.

Se cunoaște, de asemenea, mediul nutritiv de cultivare a tulpinii de fungi *Trichoderma sp.* MГ - 97 – producătoare de Trihodermin, cu compoziția (g/l): zaharoză – 25,4; extract de porumb – 31,8; KH₂PO₄ – 3,14; MgSO₄·7H₂O – 0,645, agar-agar – 20, apă până la 1 litru. Cultivarea se efectuează pe mediu solid timp de 15 zile, la temperatura de 28°C, până la obținerea unei pelicule miceliale, care apoi se usucă și se mărunțește sub formă de praf [2].

Dezavantajele acestui mediu sunt perioada îndelungată de cultivare, numărul impunător de etape și lucrul anevoios de obținere a preparatului.

În calitate de cea mai apropiată soluție se consideră mediul Waksman, care se optimizează în dependență de particularitățile fiziologo-biochimice ale tulpinii, cu următoarea componentă (g/l): peptonă – 5,0; glucoză – 10,0; KH₂PO₄ – 1,0; MgSO₄·7H₂O – 0,5; apă potabilă până la 1 litru; pH – 5,5...6,0 [3].

În urma cultivării submerse a tulpinii *Trichoderma lignorum* CNMN-FD-14 pe mediul menționat, timp de 6 zile la temperatura de 28...30°C, în condiții de agitare continuă, se obține un biopreparat care manifestă activitate antifungică față de speciile *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium sporotrichiela* și *Botrytis cinerea*, diametrul zonei de inhibiție constituind 26,7...33,3 mm, această proprietate conducând la stimularea creșterii plantulelor de floarea-soarelui cu 38%.

Dezavantajul celei mai apropiate soluții constă în faptul că pe mediul Waksman tulpina nu-și realizează potențialul antifungic maxim.

Problema tehnică pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui mediu nutritiv de cultivare submersă a tulpinii *Trichoderma virens* CNMN-FD-14, care să asigure obținerea unui biopreparat cu proprietăți antifungice și de stimulare a creșterii plantelor, de asemenea să ducă la reducerea duratei de cultivare.

Esența invenției constă în faptul că se propune un mediu nutritiv optimizat pentru cultivarea tulpinii de fungi *Trichoderma lignorum* CNMN-FD-14, componentele fiind luate în următorul raport (g/l): melasă din sfeclă de zahăr – 20,0; zaharoză – 10,0; KH₂PO₄ – 2,0; MgSO₄·7H₂O – 1,0; NaNO₃ – 2,0; CaCO₃ – 2,0; apă curentă până la 1 litru; pH 5,5...6,0.

Rezultatul tehnic al invenției constă în reducerea duratei de cultivare a tulpinii de fungi cu 2 zile și în obținerea unui biopreparat cu proprietăți antifungice și stimulatorii mai pronunțate față de cea mai apropiată soluție.

Datele prezentate sunt media a 10 probe.

Exemple de realizare a invenției

Exemplul 1

Tulpina *Trichoderma lignorum* CNMN-FD-14 se cultivă în baloane Erlenmayer de 0,75 l în care se introduc câte 200 ml de mediu din cadrul celei mai apropiate soluții, cu compoziția (g/l): peptonă – 5,0; glucoză – 10,0; KH₂PO₄ – 1,0; MgSO₄·7H₂O – 0,5; apă potabilă până la 1 litru; pH- 5,5...6,0 și paralel 200 ml de mediu optimizat ce conține (g/l): melasă din sfeclă de zahăr – 20,0; zaharoză – 10,0; KH₂PO₄ – 2,0; MgSO₄·7H₂O – 1,0; NaNO₃ – 2,0; CaCO₃ – 2,0; apă potabilă până la 1 litru; pH-ul 5,5...6,0, în condiții de agitare continuă (200 rpm), la temperatura de 28...30°C, timp de 7 zile.

Activitatea antifungică a biopreparatelor obținute se determină în dinamică începând cu ziua a 4-a, conform metodei de difuzie. Fitopatogenii *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium sporotrichiela* și *Botrytis cinerea* se însămânțează în cutii Petri cu mediu malț-agar, apoi în

fiecare cutie se face cate un godeu in care se introduce cate 1ml biopreparat. Difuzia biopreparatului durează 24 ore, la temperatura de 4°C, apoi se inoculează fitopatogenii, care se cultivă timp de 3...4 zile, la temperatura de 28...30°C. Activitatea antifungică se determină conform diametrului zonei de inhibiție a fitopatogenilor.

5 Maximumul activității antifungice față de *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium sporotrichiela* și *Botrytis cinerea* a biopreparatului obținut pe mediul proxim a fost înregistrat după 6 zile de cultivare (diametrul zonelor de inhibiție – 33,3; 26,0 și 26,7 mm, respectiv), iar pe mediul propus după 4 zile de cultivare (diametrul zonelor de inhibiție – 60,7; 40,0 și 35,7 mm, respectiv).

10

Tabelul 1

Activitatea antifungică a biopreparatului în dependență de durata și mediul de cultivare a tulpinii *Trichoderma lignorum* CNMN-FD-14

15

Culturile-Test	Durata de cultivare, zile.			
	Diametrul zonei de inhibiție, mm			
	Mediul proxim			Mediul optimizat
	4	5	6	4
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	18,70±2,36	26,30±1,31	33,30±2,36	60,70±2,36
<i>Fusarium sporotrichiela</i>	14,0±1,13	20,30±0,65	26,0±1,13	40,0±1,31
<i>Botrytis cinerea</i>	13,30±1,31	19,70±1,73	26,70±0,65	35,70±1,73

Exemplul 2

Pentru verificarea prin comparație a efectului stimulator al biopreparatului obținut pe mediul proxim, cât și pe cel optimizat a fost montat un experiment vegetativ de laborator. In calitate de material semincer s-au folosit boabe de floarea-soarelui (soiul Rodnicioac).

20

Experimentele s-au efectuat în condiții de cameră, la temperatura de 20... 24°C, in sol steril, cu umiditatea de 60...80% și iluminarea de zi. Durata experimentului a constituit 10 zile.

25

Semințele de floarea-soarelui au fost prelucrate cu biopreparatul obținut pe mediul proxim după 6 zile de cultivare, iar cu preparatul obținut pe mediul optimizat după 4 zile de cultivare.

Rezultatele obținute în experimentele de laborator au arătat că biopreparatul obținut pe mediul optimizat în comparație cu biopreparatul proxim este mai efectiv.

30

Tabelul 2

Activitatea stimuloare a biopreparatului pentru floarea-soarelui în dependență de mediul de cultivare a tulpinii *Trihoderma lignorum* CNMN-FD-14

Indicii de biomasă, M±m	Tratarea semințelor cu biopreparat proxim	Tratarea semințelor cu biopreparat optimizat
Lungimea plantulei, cm	7,10±0,30	9,80±0,28
Masa a 100 de plantule, g	74,20±4,50	86,80±3,20
Masa rădăcinilor la 100 plantule, g	9,10±0,40	11,60±0,45

35

Masa a 100 de plantule și masa rădăcinilor la 100 plantule de floarea-soarelui sub influența biopreparatului obținut pe mediul optimizat a sporit cu 17,0% și 27,50% respectiv, iar lungimea plantulelor – cu 38% față de proxim.

40

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. RU 2121793 C1 1998.11.20
2. RU 2171580 C1 2001.08.10
3. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. Под ред. Егорова М.С. Москва, МГУ, 1995, 224 с.

(57) Revendicări:

Mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de fungi *Trichoderma lignorum* CNMN-FD-14, care conține melasă din sfeclă de zahăr, zaharoză, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaNO_3 , CaCO_3 și apă potabilă, cu pH 5,5...6,0, componentele fiind luate în următorul raport, g/L:

melasă din sfeclă de zahăr	20,0
zaharoză	10,0
KH_2PO_4	2,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,0
NaNO_3	2,0
CaCO_3	2,0
apă potabilă	restul.

Șef Secție:	IUSTIN Viorel
Examinator:	LUPAȘCU Lucian
Redactor:	LOZOVANU Maria