



MD 4560 B1 2018.04.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4560** (13) **B1**
(51) Int.Cl.: *A01N 63/00* (2006.01)
A01N 63/04 (2006.01)
C12N 1/14 (2006.01)
C12R 1/645 (2006.01)
A01P 7/04 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

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	
(21) Nr. depozit: a 2017 0057 (22) Data depozit: 2017.05.23	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2018.04.30, BOPI nr. 4/2018
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE ZOOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	
(72) Inventatori: MOLDOVAN Anna, MD; MUNTEANU-MOLOTTIEVSKIY Natalia, MD; TODERAȘ Ion, MD	
(73) Titular: INSTITUTUL DE ZOOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	

(54) Tulpină de fungi *Beauveria bassiana* in calitate de bioinsecticid pentru combaterea coleopterelor curculionide

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la biotehnologie și poate fi utilizată în agricultură pentru combaterea coleopterelor curculionide.

Tulpina de fungi *Beauveria bassiana* este depozitată în Colecția Națională de

2
Microorganismе Neapatogene cu numărul CNMN-FE-01 și poate fi utilizată în calitate de bioinsecticid pentru combaterea coleopterelor curculionide.

Revendicări: 1

MD 4560 B1 2018.04.30

(54) Strain of *Beauveria bassiana* fungi as a bioinsecticide against weevils**(57) Abstract:**

1

The invention relates to biotechnology and can be used in agriculture for controlling weevils.

The *Beauveria bassiana* fungi strain is deposited in the National Collection of

2

Nonpathogenic Microorganisms under the number CNMN-FE-01 and can be used as a bioinsecticide against weevils.

Claims: 1

(54) Штамм грибов *Beauveria bassiana* в качестве биоинсектицида против жуков-долгоносиков**(57) Реферат:**

1

Изобретение относится к биотехнологии и может быть использовано в сельском хозяйстве для борьбы с жуками-долгоносиками.

Штамм грибов *Beauveria bassiana* депонирован в Национальной Коллекции

2

Непатогенных Микроорганизмов под номером CNMN-FE-01 и может быть использован в качестве биоинсектицида против жуков-долгоносиков.

П. формулы: 1

Descriere:**(Descrierea se publică în redacția solicitantului)**

5 Invenția se referă la biotehnologie, în special la o tulpină de fungi și poate fi utilizată în
agricultură pentru combaterea coleopterelor curculionide.

Speciile din familia *Fabaceae* reprezintă culturi agricole importante fiind cultivate pe
suprafețe extinse. Datorită calităților nutritive sporite (conținut înalt de proteine și grăsimi)
semințele acestora sunt utilizate în alimentația umană. Biomasa fabaceelor, precum și
10 semințele unor specii sunt utilizate în calitate de furaj. De asemenea unele specii sunt
utilizate în calitate de plante decorative. O bogată diversitate de insecte sunt atașate trofic de
aceste culturi în toată lumea. Coleopterele curculionide (*Coleoptera*, *Curculionidea*) sunt
considerate dăunători abundenți în multe state din Europa, inclusiv Republica Moldova.
Impotriva curculionidelor se utilizează un spectru larg de insecticide chimice, însă aplicarea
15 acestor preparate manifestă acțiuni negative asupra mediului (Registrul Î.S. "Centrul de Stat
pentru Atestarea și Omologarea Produselor de Uz Fitosanitar și a Fertilizanților. Găsit
Internet: http://www.pesticide.md/registru-cautare/?_ame_registr=0&name_reg=0&t=0&c=0&comp=0&par=18497&search=Cautare).

Elaborarea metodelor inofensive și totodată efective de combatere a coleopterelor
20 curculionide este una dintre problemele stringente și actuale.

Controlul microbiologic al insectelor dăunătoare a fost adesea considerat o alternativă
favorabilă folosirii insecticidelor chimice, care posedă acțiune nespecifică, poluează mediul
ambiant și se acumulează în aer, apă și sol. Utilizarea agenților microbiologici pentru
controlul insectelor contribuie la reducerea dependenței de insecticidele chimice asigurând
25 sustenabilitatea agriculturii (Singh H.B., Keswani C., Ray S., Yadav S.K, Singh S.P., Singh
S., Sarma B.K. Chapter 10 *Beauveria bassiana*: Biocontrol Beyond Lepidopteran Pests. Ed.
Sree K.S., Varma A. Biocontrol of Lepidopteran Pests, Soil Biology, 2015, vol. 43, p. 219-
235).

Beauveria bassiana este un agent patogen fungic caracteristic multor grupe de insecte
fiind cunoscute cazuri de infestare a mai bine de 100 specii (McCoy C.W., Samson R.A.,
30 Boucias D.G. Entomogenous fungi. Ed. Ignoffo C.M., Mandava N.B., Handbook of natural
pesticides. Vol. Microbial pesticides. Part A: Entomogenous protozoa and fungi. Boca Raton
(FL): CRC Press., 1988, p. 151-236).

Cu toate acestea, tulpinile de *Beauveria bassiana*, izolate de pe anumite specii de insecte,
fiind testate în laborator împotriva unei game largi de specii de insecte, au prezentat un
35 spectru îngust de acțiune. Astfel, fiecare tulpină poate avea o acțiune relativ specifică față de
o gazdă anumită (Fargues J. Specificite des champignons pathogènes imparfaits
(Hyphomycetes) pour les larves de Coleopteres (Scarabaeidae et Chrysomelidae).
Entomophaga, 1976, vol. 21, p. 313-323). *Beauveria bassiana* este utilizată pe scară largă ca
bioinsecticid pentru controlul multor insecte dăunătoare, datorită absenței efectelor toxice
40 asupra omului și altor organisme homeoterme și lipsei poluării mediului ambiant.

Este cunoscută tulpina *Beauveria bassiana* F419, utilizată pentru combaterea speciei
Sitona obsoletus [1].

Neajunsul acestei tulpini constă în activitatea insecticidă redusă și timpul de acțiune lent
de la aplicare.

45 Cea mai apropiată după esență și rezultatul tehnic este tulpina de fungi *Beauveria
bassiana* 238, activă împotriva speciei *Sitona lineatus* L. [2].

Dezavantajul acestei tulpini constă în activitatea insecticidă redusă, timpul de acțiune lent
și cantitatea sporită de spori aplicată pentru asigurarea efectului insecticid.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în izolarea unei tulpini noi autohtone
50 de *Beauveria bassiana*, care ar asigura producerea de metaboliți cu efecte insecticide, cu o
activitate insecticidă sporită contra coleopterelor curculionide într-un timp mai scurt.

Invenția soluționează problema prin aceea că se propune o tulpină de fungi *Beauveria
bassiana*, depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Neapatogene cu numărul
CNMN-FE-01, care poate fi utilizată în calitate de bioinsecticid pentru combaterea
55 coleopterelor curculionide.

Rezultatul tehnic al invenției constă în faptul că tulpina propusă:

- posedă o activitate insecticidă sporită asupra speciei *Sitona lineatus* față de cea mai

apropiată soluție;

- este o tulpină autohtonă, ceea ce reduce semnificativ cheltuielile pentru obținerea bioinsecticidelor și asigură micșorarea gradului de poluare a mediului ambiant.

5 Rezultatul tehnic (efectul insecticid) obținut este determinat de particularitățile biochimice ale tulpinii, și anume capacitatea de a penetra cuticula insectei și de a produce metaboliți cu efect insecticid.

Tulpina propusă nu este patogenă pentru organismele homeoterme și se păstrează în tuburi pe medii agarizate cartof-glucoză-agar, la temperatura de 4°C în Colecția Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM.

10 Tulpina a fost izolată în cultură pură din corpul insectei *Sitona lineatus* L. colectate pe teritoriul Republicii Moldova (Manual of Techniques in Invertebrate Pathology, 2nd Edition, Ed. L. Lacey, Academic Press, eBook ISBN :9780123869005, 2012, 504 p).

Pentru cultivarea tulpinii poate fi utilizat mediul nutritiv cu următoarea componență (g/L): infuzie din cartofi 4, D-glucoză 20, agar microbiologic 15.

15 Caracterele morfo-culturale ale tulpinii. Cercetarea macroscopică a tulpinii a evidențiat prezența coloniilor cu aspectul exterior lănos-flocos sau catifelat spre pulverulent, uneori filamentoase. Coloniile cresc inițial de culoare albă, mai târziu devenind de culoare gălbuie, uneori roșcate. Uneori produce exsudat fără miros. Hifele submerse sunt hialine cu pereții netezi de aproximativ 1,5...3 μ lățime. Hifele miceliului aerian sunt, de asemenea, hialine cu pereții netezi de aproximativ 1...2 μ lățime, târătoare sau ascendente. Hifele poartă grupuri laterale de celule umflate cel mai des de 3...6 x 3...5 μ, care ulterior formează ramificații și dau naștere altor celule umflate mai mici sau 1-5 celule conidiogene. În cazul culturilor tinere conidiile sunt strans grupate, la culturile mai bătrâne ramurile devin mai răzlețe, celulele conidiogene apar în grupuri mici sau solitar pe celulele laterale elipsoidale sau cilindrice (de 25 aproximativ 15 x 6 μ) sau direct din hife. Celulele conidiogene sunt globulare uneori alungite bazal (3...6 x 2,5...3,5 μ), celulele terminale cel mai des sunt subțiri cu axul central bine dezvoltat, de până la 20 μ lungime, geniculat sau neregulat îndoit, zimțat. Conidiile hialine sunt uneori de culoare gălbuie, netede, globulare spre elipsoide cu o bază apicală (1,5 -) 2 - 3 (- 4) x (1,5 -) 2 - 2,5 (- 3) μ. Clamidospori nu au fost observați.

30 Caracteristica fiziologo-biochimică a tulpinii. Coloniile ciupercii timp de 8 zile ating diametrul de 6 ... 23 mm, temperatura optimă de dezvoltare a tulpinii fiind de 20 ... 25°C. Tulpina crește bine pe mediul cartof-glucoză-agar. *Beauveria bassiana* produce un șir de enzime proteolitice, lipolitice, amilaza, chitinaza cu ajutorul cărora penetrează integumentele. De asemenea produce toxina beauvericina, un ciclodepsipeptid (Hamill R.L., Higgins C.E., 35 Boaz H.E., Gorman M. The structure of beauvericin, a new depsipeptide antibiotic toxic to *Artemia salina*. Tetrahedron Letters, 1969, Nr. 49, p. 4255-4258), care împreună cu alte toxine are efect antibacterian (Ferron P. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. Annual Review of Entomology, 1978, vol. 23, p. 409-442).

40 Gradul de puritate al tulpinii. Tulpina a fost izolată în cultură pură din corpul insectei *Sitona lineatus* L. colectate pe teritoriul Republicii Moldova. Pentru cultivare se utilizează mediul agarizat cartof-glucoză-agar. Gradul de puritate al tulpinii a fost verificat prin reacția de polimerizare în lanț cu utilizarea primerilor specifici ITS (Internal Transcribed Spacer) și 18S.

Exemplu de utilizare a invenției

45 Tulpina *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01 este cultivată timp de 7...14 zile pe mediu agarizat cartof-glucoză-agar la temperatura de 25 °C pentru a asigura sporularea culturii. Pentru a pregăti inoculul, spori sunt recoltați de pe suprafața mediului și transferați cu ajutorul unui micropistil steril într-un tub de 2 ml ce conține 1,5 ml de apă distilată sterilă. Masa de conidii este agitată ușor. Pentru a suspenda uniform propagulele hidrofobe în apă, 50 sunt folosite metode de suspensie mecanică fără a provoca deteriorarea celulelor. Cuantificarea numărului de propagule per unitate de volum este realizată cu utilizarea hemocitometrului (camera Goreaev). Ulterior, se determină rata de germinare a sporiilor. Pentru a calcula numărul de spori viabili per unitate de volum, cantitatea de spori/ml determinată cu ajutorul hemocitometrului este multiplicată cu valoarea ratei de germinare.

55 Se pregătește suspensia de contaminare în apă distilată sterilă cu diferită concentrație: 0,969·10⁷ spori/ml, 0,969·10⁶ spori/ml, 0,969·10⁵ spori/ml, 0,969·10⁴ spori/ml, 0,969·10³ spori/ml.

În experiență a fost utilizat dăunătorul culturilor agricole *Sitona lineatus* Linnaeus 1758, (*Coleoptera, Curculionidae*).

Eficiența a fost evaluată prin monitorizarea efectivului numeric al dăunătorilor colectați după prelucrare și cantitatea exemplarelor de insecte pierite după infestare.

5 **Exemplul 1.** Estimarea eficacității metodei de combatere a dăunătorului culturilor agricole *Sitona lineatus* Linnaeus 1758, (*Coleoptera, Curculionidae*).

10 Activitatea insecticidă a tulpinii propuse a fost testată pe insectele adulte sănătoase, provenite din populația naturală a speciei *Sitona lineatus* L. Se prepară o serie din cinci diluții ale culturii tulpinii în apă distilată sterilă cu pasul 10 (concentrațiile indicate mai sus). În calitate de martor a fost utilizată apa distilată sterilă. Inoculul cu volumul de 1 ml a fost aplicat pe hârtie de filtru sterilă plasată în cutii Petri. Ulterior, în fiecare cutie Petri au fost plasate câte 10 exemplare ale speciei *Sitona lineatus*. Insectele au fost lăsate să se deplaseze pe suprafața hârtiei de filtru timp de 3 h pentru a intra în contact cu spori fungici (Watson D.W., Geden C.J., Long S.J., Rutz D.A. Efficacy of *Beauveria bassiana* for controlling the house fly and stable fly (Diptera: Muscidae). Biol. Control, 1995, vol. 5, p. 405-411).

15 După inoculare, insectele au fost incubate câte 10 în cuști cu lucernă proaspătă în condiții controlate, la temperatura camerei de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ și durata zilei de 14 h. Verificarea mortalității a fost efectuată la fiecare 24 de ore. Cadavrele insectelor au fost îndepărtate înainte ca ciuperca să sporuleze pentru a preveni transmiterea orizontală. Ulterior cuștile au fost spălate, sterilizate, iar lucerna a fost schimbată. Pentru a confirma că moartea insectelor a fost cauzată de infecția fungică cadavrele au fost plasate în eprubete sterile cu dop de bumbac în condiții de umiditate sporită urmărind dezvoltarea miceliului. Activitatea biologică a tulpinii, exprimată în LC_{50} , a fost calculată după formula lui Kerber în valorile concentrației de spori în diluții ale culturii fungice: $\lg LC_{50} = \lg C_M - \Sigma (\Sigma L - 0,5)$, unde C_M - concentrația maximă testată, Σ - logaritmul multiplicării diluției, ΣL - suma valorilor L pentru toate concentrațiile.

20 Cea mai eficientă dintre concentrațiile testate, pentru *Sitona lineatus* L., s-a dovedit a fi $0,969 \cdot 10^6$ spori/ml cauzând o mortalitate de 100% la a 5-a zi de la tratament. Totodată, o reducere cu 50% a efectivului dăunătorului *Sitona lineatus* L. poate fi obținută la aplicarea culturii fungice *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01 în concentrație de $1,127 \cdot 10^4$ spori/ml, în apă distilată. Rezultatele sunt prezentate în tabel.

Tabel

35 Rata mortalității dăunătorului *Sitona lineatus* L. după aplicarea suspensiei de spori din cultura fungică a tulpinilor de *Beauveria bassiana*

Nr.	Tulpina	Cantitatea de spori per individ	Mortalitatea, nr. exemplare moarte/nr. total	Mortalitatea, %
1.	<i>Beauveria bassiana</i> CNMN-FE-01	$0,969 \cdot 10^5$	10/10	100
2.	<i>Beauveria bassiana</i> 238	$1 \cdot 10^7$	17/20	85

40 Datele din tabel denotă că tulpina de fungi propusă posedă o activitate insecticidă pronunțată asupra coleopterelor curculionide și poate fi utilizată în calitate de agent biologic în controlul efectivului lor numeric. Tulpina este ecologic inofensivă, deoarece a fost extrasă din mediu natural, nu este patogenă pentru plante și organismele homeoterme. În natură nu sunt introduse organisme noi, ceea ce exclude deteriorarea ecosistemelor, cum se observă în cazul utilizării altor patogeni și preparate.

(56) Referințe bibliografice citate in descriere:

1. Nelson T.L., McNeill M.R., van Koten C., Goldson S.L. Comparative virulence of *Beauveria bassiana* isolates against clover root weevil (*Sitona obsoletus*). New Zealand Plant Protection. 2015, vol. 68, p. 139-145
2. Riedel W., Steenberg T. Adult polyphagous coleopterans overwintering in cereal boundaries: winter mortality and susceptibility to the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Biocontrol. 1998, vol. 43, p.175...188

(57) Revendicări:

Tulpină de fungi *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01 in calitate de bioinsecticid pentru combaterea coleoptelilor curculionide.