MD 4560 C1 2018.11.30

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenţia de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4560** (13) **C1**

(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 INVENŢIE

(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 ŞTIINŢE A MOLDOVEI, MD

(72) Inventatori: MOLDOVAN Anna, MD; MUNTEANU-MOLOTIEVSKIY Natalia, MD; TODERAŞ Ion, MD

(73) Titular: INSTITUTUL DE ZOOLOGIE AL ACADEMIEI DE ŞTIINŢE A MOLDOVEI, MD

MD 4560 C1 2018.11.30

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

(57) Rezumat:

1

Invenţia se referă la biotehnologie şi poate fi utilizată în agricultură pentru combaterea coleopterelor curculionide.

Tulpina de fungi *Beauveria bassiana* este depozitată în Colecţia Naţională de

2

Microorganisme Nepatogene cu numărul CNMN-FE-01 şi poate fi utilizată în calitate de bioinsecticid pentru combaterea coleopterelor curculionide.

Revendicări: 1

(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)

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

Speciile din familia *Fabaceae* reprezintă culturi agricole importante fiind cultivate pe suprafeţe extinse. Datorită calităţilor nutritive sporite (conţinut înalt de proteine şi grăsimi) seminţele acestora sunt utilizate în alimentaţia umană. Biomasa fabaceelor, precum şi seminţele 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 ataşate trofic de aceste culturi în toată lumea. Coleopterele curculionide (*Coleoptera, Curculionidea*) sunt considerate dăunători abundenţi în multe state din Europa, inclusiv Republica Moldova. Impotriva curculionidelor se utilizează un spectru larg de insecticide chimice, însă aplicarea acestor preparate manifestă acţiuni negative asupra mediului (Registrul I.S. ”Centrul de Stat pentru Atestarea şi Omologarea Produselor de Uz Fitosanitar şi a Fertilizanţilor. 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 şi totodată efective de combatere a coleopterelor curculionide este una dintre problemele stringente şi actuale.

Controlul microbiologic al insectelor dăunătoare a fost adesea considerat o alternativă favorabilă folosirii insecticidelor chimice, care posedă acţiune nespecifică, poluează mediul ambiant şi se acumulează în aer, apă şi sol. Utilizarea agenţilor microbiologici pentru controlul insectelor contribuie la reducerea dependenţei de insecticidele chimice asigurând 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., 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 in laborator impotriva unei game largi de specii de insecte, au prezentat un spectru îngust de acţiune. Astfel, fiecare tulpină poate avea o acţiune relativ specifică faţă de o gazdă anumită (Fargues J. Specificite des champignons pathognes 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 absenţei efectelor toxice asupra omului şi altor organisme homeoterme şi 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 şi timpul de acţiune lent de la aplicare.

Cea mai apropiată după esenţă şi 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 acţiune lent şi cantitatea sporită de spori aplicată pentru asigurarea efectului insecticid.

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

Invenţia soluţionează problema prin aceea că se propune o tulpină de fungi *Beauveria bassiana*, depozitată în Colecţia Naţională de Microorganisme Nepatogene cu numărul CNMN-FE-01, care poate fi utilizată în calitate de bioinsecticid pentru combaterea coleopterelor curculionide.

Rezultatul tehnic al invenţiei constă în faptul că tulpina propusă:

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

apropiată soluţie;

- este o tulpină autohtonă, ceea ce reduce semnificativ cheltuielile pentru obţinerea bioinsecticidelor şi asigură micşorarea gradului de poluare a mediului ambiant.

Rezultatul tehnic (efectul insecticid) obţinut este determinat de particularităţile biochimice ale tulpinii, şi anume capacitatea de a penetra cuticula insectei şi de a produce metaboliţi cu efect insecticid.

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

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 componenţă (g/L): infuzie din cartofi 4, D-glucoză 20, agar microbiologic 15.

Caracterele morfo-culturale ale tulpinii. Cercetarea macroscopică a tulpinii a evidenţiat prezenţa coloniilor cu aspectul exterior lânos-flocos sau catifelat spre pulverulent, uneori filamentoase. Coloniile cresc inițial de culoare albă, mai târziu devenind de culoare gălbuie, uneori roşcate. Uneori produce exsudat fără miros. Hifele submerse sunt hialine cu pereţii netezi de aproximativ 1,5…3 μ lăţime. Hifele miceliului aerian sunt, de asemenea, hialine cu pereţii netezi de aproximativ 1…2 μ lăţime, târâtoare sau ascendente. Hifele poartă grupuri laterale de celule umflate cel mai des de 3…6 x 3…5 μ, care ulterior formează ramificaţii şi dau naştere altor celule umflate mai mici sau 1-5 celule conidiogene. In cazul culturilor tinere conidiile sunt strâns grupate, la culturile mai bătrâne ramurile devin mai răzleţe, celulele conidiogene apar in grupuri mici sau solitar pe celulele laterale elipsoidale sau cilindrice (de 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 subţiri cu axul central bine dezvoltat, de până la 20 μ lungime, geniculat sau neregulat îndoit, zimţat. 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 observaţi.

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 ... 25ºC. Tulpina creşte bine pe mediul cartof-glucoză-agar. *Beauveria bassiana* produce un şir de enzime proteolitice, lipolitice, amilaza, chitinaza cu ajutorul cărora penetrează integumentele. De asemenea produce toxina beauvericina, un ciclodepsipeptid (Hamill R.L., Higgens C.E., 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).

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 reacţia de polimerizare în lanţ cu utilizarea primerilor specifici ITS (Internal Transcribed Spacer) şi 18S.

Exemplu de utilizare a invenţiei

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, sporii sunt recoltaţi de pe suprafaţa mediului şi transferaţi cu ajutorul unui micropistil steril intr-un tub de 2 ml ce conţine 1,5 ml de apă distilată sterilă. Masa de conidii este agitată uşor. Pentru a suspenda uniform propagulele hidrofobe în apă, 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 sporilor. 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.

Se pregăteşte suspensia de contaminare în apă distilată sterilă cu diferită concentraţie: $0{,}969 \cdot 10^7$ spori/ml, $0{,}969 \cdot 10^6$ spori/ml, $0{,}969 \cdot 10^5$ spori/ml, $0{,}969 \cdot 10^4$ spori/ml, $0{,}969 \cdot 10^3$ spori/ml.

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

Eficienţa a fost evaluată prin monitorizarea efectivului numeric al dăunătorilor colectaţi după prelucrare şi cantitatea exemplarelor de insecte pierite după infestare.

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

Activitatea insecticidă a tulpinii propuse a fost testată pe insectele adulte sănătoase, provenite din populaţia naturală a speciei *Sitona lineatus* L. Se prepară o serie din cinci diluţii ale culturii tulpinii în apă distilată sterilă cu pasul 10 (concentraţiile indicate mai sus). In 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 cate 10 exemplare ale speciei *Sitona lineatus*. Insectele au fost lăsate să se deplaseze pe suprafaţa hârtiei de filtru timp de 3 h pentru a intra în contact cu sporii fungici (Watson D.W., Geden C.J., Long S.J., Rutz D.A. Ef cacy of *Beauveria bassiana* for controlling the house ? y and stable y (Diptera: Muscidae). Biol. Control, 1995, vol. 5, p. 405-411).

După inoculare, insectele au fost incubate câte 10 în cuşti cu lucernă proaspătă în condiţii controlate, la temperatura camerei de 25±1ºC şi durata zilei de 14 h. Verificarea mortalităţii a fost efectuată la fiecare 24 de ore. Cadavrele insectelor au fost îndepărtate înainte ca ciuperca să sporuleze pentru a preveni transmiterea orizontală. Ulterior cuştile au fost spălate, sterilizate, iar lucerna a fost schimbată. Pentru a confirma că moartea insectelor a fost cauzată de infecţia fungică cadavrele au fost plasate în eprubete sterile cu dop de bumbac în condiţii de umiditate sporită urmărind dezvoltarea miceliului. Activitatea biologică a tulpinii, exprimată în LC_{50}, a fost calculată după formula lui Kerber în valorile concentraţiei de spori în diluţii ale culturii fungice: $\lg LC_{50} = \lg C_M - \Sigma\ (\Sigma L - 0{,}5)$, unde C_M - concentraţia maximă testată, Σ - logaritmul multiplicării diluţiei, ΣL - suma valorilor L pentru toate concentraţiile.

Cea mai efectivă dintre concentraţiile testate, pentru *Sitona lineatus* L., s-a dovedit a fi $0{,}969 \cdot 10^6$ spori/ml cauzand 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 obţinută la aplicarea culturii fungice *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01 în concentraţie de $1{,}127 \cdot 10^4$ spori/ml, in apă distilată. Rezultatele sunt prezentate in tabel.

Tabel

Rata mortalităţii 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.	*Beauveria bassiana* CNMN-FE-01	$0{,}969 \cdot 10^5$	10/10	100
2.	*Beauveria bassiana* 238	$1 \cdot 10^7$	17/20	85

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

(56) Referinţe 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 coleopterelor curculionide.