



MD 4922 C1 2025.12.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4922** (13) **C1**
(51) Int.Cl: **A01N 63/30** (2020.01)
C12N 1/14 (2006.01)
A01P 3/00 (2006.01)
A01P 7/00 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. depozit: a 2022 0057 (22) Data depozit: 2022.12.27 (41) Data publicării cererii: 2024.06.30, BOPI nr. 6/2024	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2025.05.31, BOPI nr. 5/2025
(71) Solicitant: INSTITUȚIA PUBLICĂ UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (72) Inventatori: ȘCERBACOVA Tatiana, MD; VOLOȘCIUC Leonid, MD; LUNGU Andrei, MD (73) Titular: INSTITUȚIA PUBLICĂ UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	

(54) Tulpină de fungi *Lecanicillium lecanii* pentru combaterea dăunătorilor și fitopatogenilor în teren protejat

(57) Rezumat:

Invenția se referă la microbiologia agricolă, în special la domeniul protecției plantelor împotriva dăunătorilor și agenților patogeni ai bolilor în condiții de seră.

Tulpina *Lecanicillium lecanii* are activitate insecticidă și acaricidă împotriva dăunătorilor culturilor legumicole de seră, precum și activitate fungicidă împotriva unui complex de fungi fitopatogeni. Tulpina este depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene cu numărul CNMN-FE-03 și poate fi utilizată pentru obținerea unui preparat biologic pentru protecția culturilor legumicole de afidele bostănoaselor, acarianul roșu comun și fungi fitopatogeni în condiții de teren protejat.

Revendicări: 1

MD 4922 C1 2025.12.31

Descriere:

Invenția se referă la microbiologia agricolă, în special, la domeniul protecției plantelor împotriva dăunătorilor și agenților patogeni ai bolilor în condiții de seră și poate fi utilizată pentru obținerea unui produs biologic cu activitate insecticidă și acaricidă împotriva dăunătorilor cu aparat bucal înțepător-sugător și cu activitate fungicidă împotriva unui complex de fungi fitopatogeni.

Utilizarea produselor biologice de protecție a plantelor împotriva dăunătorilor și agenților patogeni ai bolilor reprezintă o alternativă aplicării pesticidelor chimice. Utilizarea pesticidelor în condiții de teren protejat este deosebit de periculoasă din cauza stabilității lor ridicate și acumulării de reziduuri toxice în produsele recoltate. În aceste condiții, evidențierea și izolarea din mijloacele naturale a tulpinilor active de microorganisme, regulatoare ale densității populațiilor de organisme dăunătoare, rămâne o problemă urgentă.

Sporirea rolului agenților microbieni în protecția plantelor necesită cercetări pentru extinderea funcțiilor microorganismelor - manifestarea simultană a proprietăților insecticide și fungicide de către o tulpină.

Ciupercile miceliene din genurile *Lecanicillium* (sin. *Verticillium*), *Beauveria*, *Metarhizium*, *Isaria* (*Paecilomyces*) (Gams W., Zare R. A revision of *Verticillium* sect. *Prostrata*. III. Generic classification. Nova Hedwigia, 2001, v. 72, (3-4), p. 329-337; Zare R., Gams W. A revision of *Verticillium* sect. *Prostrata*. IV. The genera *Lecanicillium* and *Simplicillium* gen. nov. Nova Hedwigia, 2001, v. 73 (1-2), p. 1-50) reprezintă patogeni naturali ai acarienilor și insectelor, de aceea și-au găsit aplicații practice în calitate de bioinsecticide.

Este cunoscută tulpina de fungi *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01, eficientă în reducerea densității populațiilor de gărgăriță *Sitona lineatus* L. [1]. O tulpină cunoscută de fungi *Verticillium lecanii* nr. 9 este producătoare de produs biologic împotriva larvelor musculiței albe de seră (*Trialeurodes vaporariorum*) cu o eficiență de 80% [2]. Este cunoscută o tulpină de fungi *Lecanicillium muscarium* F-8, a cărei eficacitate biologică pe un mediu nutritiv selectat împotriva acarianului roșu comun (*Tetranychus urticae* Koch.) este de 92,9-98,5% [3].

Se mai cunoaște o tulpină de fungi *Lecanicillium lecanii* BIM F-368 D, eficientă pentru suprimarea afidei piersicului (*Myzus persicae*) cu eficacitatea biologică de 97,5% la tomate [4].

Dezavantajul acestor tulpini este specializarea îngustă în raport cu dăunătorii și lipsa activității fungicide împotriva agenților patogeni ai plantelor.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în obținerea unei tulpini, care posedă activitate ridicată împotriva dăunătorilor cu aparat bucal înțepător-sugător din ordinul *Homoptera* - afida bostănoaselor (*Aphis gossypii*) și din super-ordinul *Acariformes* - acarianul roșu comun (*Tetranychus urticae*) și a unui complex de agenți patogeni fungici ai plantelor în condiții de seră.

Problema se rezolvă prin tulpina de fungi *Lecanicillium lecanii* (Zimmerm.) Zare & W. Gams 2T20, care a fost izolată din populația naturală a musculiței albe de seră cu selecție ulterioară prin pasajarea prin insecta-gazdă. S-au făcut 4 pasaje prin acarianul roșu comun (*Tetranychus urticae*) și 3 treceri prin afida bostănoaselor (*Aphis gossypii*), care prezintă patogenitate împotriva musculiței albe de seră (*Trialeurodes vaporariorum*). Tulpina este depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene cu numărul CNMN-FE-03 și poate fi utilizată pentru protecția plantelor de dăunători și fungi patogeni la culturile legumicole în teren protejat.

Particularitățile morfologo-culturale ale tulpinii. Pe mediul malț-geloză (%): must fără de hamei 40,0; apă 58,0; geloză 2,0; (pH 5,5-6,0), în decurs de cincisprezece zile de cultivare, la temperatura de 25°C coloniile sunt de 3,5-4,5 cm, miceliul aerian bine dezvoltat, pufos, de culoare albă, cu structură catifelată, pliarea radială și zonalitatea coloniilor este neevidențiată. Mediul de cultură nu se colorează, reversul de culoare maro. Colonia atinge dimensiuni de 80×80 mm în decurs de 4-5 săptămâni. Are miros slab de ciuperci. Pe mediu Czapek miceliul aerian este slab dezvoltat.

Particularitățile fiziologice și biochimice ale tulpinii. Este un microorganism strict aerob. Tulpina crește în limitele de temperatură +8-+32°C. Temperatura optimă de creștere și dezvoltare este de +23-+25°C. Limitele valorii pH-ului pentru dezvoltarea tulpinii - 4,7-8,0, pH-ul optimal - 5,5-6,0. În calitate de sursă de carbon asimilează zaharoza, amidonul, melasa. În calitate de sursă de azot anorganic asimilează sărurile NaNO₃ și NH₄NO₃. Din sursele de azot organic cel mai bine asimilează extractul de porumb și extractul de drojdii. Sporii tulpinii sunt rezistenți la uscarea, ceea ce facilitează utilizarea lor în obținerea unui produs biologic sub formă de pulbere de spori.

Tulpina CNMN-FE-03 nu este patogenă pentru oameni și animalele homeoterme, pești și albine. Nu este o tulpină modificată genetic.

Tulpina se păstrează în tuburi pe mediul gelozat, malt-geloză la temperatura de $+4\pm 1^{\circ}\text{C}$. Termenul de reînsămânțare - 12 luni.

Activitatea insecticidă a tulpinii a fost determinată în raport cu acarianul roșu comun, afida bostănoaselor, musculița albă de seră. Când este infectat, miceliul alb catifelat este observat pe insecte, care poate servi ca o condiție pentru răspândirea în continuare a agentului patogen în populația dăunătorilor. Debutul morții a fost observat în ziua a 4-5-a după tratament.

Invenția este ilustrată prin următoarele exemple specifice.

Exemplul 1 Cultivarea tulpinii CNMN-FE-03 pe medii nutritive solide în cutii Petri

Pe geloză cu cartof-glucoză, la inocularea în bloc de 6 mm la 25°C , se formează colonii albe, rotunde. Colonia atinge dimensiunea de 80×80 mm la 4-5 săptămâni de la însămânțare. Marginea este ciliată, consistența catifelată, iar reversul bej. La însămânțarea cu gazon, s-a observat creșterea completă a plăcii de geloză timp de 4-5 zile la 25°C . Compoziția mediului: cartofi - 200 g, glucoză - 20 g, geloză - 20 g, apă - până la un litru.

Pe mediul must-geloză, tulpina formează colonii albe rotunde cu profil convex și textura catifelată. Reversul este maro. Compoziția mediului: must fără hamei 12°B - 400 ml, geloză - 20 g, apă - până la 1 litru.

Pe mediul Chapek tulpina formează colonii albe de formă regulată rotunjită cu miceliul alb, subțire, slab dezvoltat.

Pe medii solide, activitatea fungicidă a tulpinii CNMN-FE-03 împotriva agenților patogeni ai plantelor a fost determinată prin metoda culturilor duble (Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках, Москва, МГУ, 2004, 528 p.).

Exemplul 2 Cultivarea tulpinii CNMN-FE-03 pe mediu nutritiv lichid

Tulpina CNMN-FE-03 a fost crescută în colbe cu 100 mL de mediu timp de 96 de ore pe un balansoar cu o viteză de rotație de 180 rpm la 25°C . Compoziția mediului: KH_2PO_4 - 2,0 g; MgSO_4 - 1,0 g; NaNO_3 - 2,0 g; zaharoză - 20,0 g; extract de drojdie - 5 g; H_2O - până la 1 L. Suspensia rezultată a ciupercii a fost utilizată pentru determinarea activității insecticide împotriva afidei bostănoaselor și activității acaricide împotriva acarianului roșu comun.

Exemplul 3

Suspensia de spori obținută conform exemplului 2 a fost adusă la concentrația necesară de 5×10^7 - 1×10^6 prin diluarea cu apă, determinând activitatea insecticidă asupra afidei bostănoaselor. Plantele de castraveți (hibridul Mirabelle) au fost infestate cu afida bostănoaselor. Tratamentele au fost efectuate cu pulverizatorul manual. Afidele afectate au fost acoperite cu miceliu alb al ciupercii. Mortalitatea dăunătorului este prezentată în tabelul 1.

Tabelul 1

Activitatea insecticidă a tulpinii CNMN-FE-03 împotriva afidei bostănoaselor

Tulpina	Titrul, spori/mL	Mortalitatea afidelor după zile, %	
		7	14
CNMN-FE-03	5×10^7	72,6	98,3
	1×10^6	63,7	92,7
БИМ F-368Д	$4,4\times 10^8$	77,3	97,5

În ceea ce privește afidele, activitatea insecticidă a tulpinii revendicate la titrul de 5×10^7 spori/mL a fost mai mare decât cea a tulpinii BIM F-368D la titrul de $4,4\times 10^8$ spori/mL.

Exemplul 4

Suspensia de spori obținută similar exemplului 2 a fost adusă la concentrația necesară prin diluarea cu apă și a fost determinată activitatea acaricidă împotriva acarianului roșu comun. Plantele de castraveți (hibridul Mirabelle) au fost infestate cu acarianul roșu comun. Tratamentele au fost efectuate cu pulverizatorul manual. Indivizii afectați ai acarianului au fost acoperiți cu miceliul alb al ciupercii. Mortalitatea dăunătorului este prezentată în tabelul 2.

Tabelul 2

Activitatea acaricidă a tulpinii CNMN-FE-03 în raport cu acarianul roșu comun

Tulpina	Titrul, spori/mL	Mortalitatea acarienilor după zile, %	
		7	14
CNMN-FE-03	5×10^7	75,5	97,8
	1×10^6	67,7	93,5

Exemplul 5

Activitatea fungicidă a tulpinii CNMN-FE-03 în raport cu ciupercile fitopatogene a fost determinată în timpul cultivării prin metoda culturilor duble (Еропов Н.С., 2004).

5 Tulpina a fost crescută similar exemplului 1 pe geloza cu cartof-glucoză pentru a obține blocuri de geloză. În același timp, ciupercile fitopatogene au fost crescute pe mediul GCG timp de 7 zile la 25°C. Primul bloc de tulpină CNMN-FE-03 și fitopatogen a fost plasat în cutia Petri pe pereții opuși unul altuia. Cultivarea a fost efectuată timp de 10 zile. Zona de inhibare a creșterii culturilor-gazdă a fost măsurată în mm (Tabelul 3).

Tabelul 3

10 Activitatea fungicidă a tulpinii CNMN-FE-03 împotriva fitopatogenilor în cultură duală

Cultura-test		Zona de inhibare a creșterii, mm
1	<i>Alternaria alternata</i>	8±0,4
2	<i>Fusarium graminearum</i>	10±0,4
3	<i>Fusarium oxysporum</i>	9±0,7
4	<i>Fusarium sporotrichioides</i>	14±0,8
5	<i>Fusarium verticillioides</i>	8±0,4
6	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	5,5±0,3
7	<i>Thielaviopsis basicola</i>	7,5±0,6

După cum rezultă din datele obținute în tabelul 3, tulpina revendicată *Lecanicillium lecanii* CNMN-FE-03 demonstrează activitate fungicidă împotriva unei game largi de agenți patogeni fungici care infectează plantele din sere.

15 Astfel, datele de mai sus indică o activitate insecticidă ridicată a tulpinii *Lecanicillium lecanii* CNMN-FE-03 împotriva afidei bostănoaselor și a acarianului roșu comun în condiții de seră. De asemenea, tulpina demonstrează activitate fungicidă împotriva unui complex de agenți patogeni ai culturilor de seră. Acest lucru face posibilă utilizarea tulpinii de *Lecanicillium lecanii* CNMN-FE-03 ca producător de produse biologice pentru protecția plantelor de dăunători și agenți patogeni ai bolilor

20 fungice în teren protejat.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. MD 4560 B1 2018.04.30
2. RU 2035144 C1 1995.05.20
3. RU 2421512 C1 2011.06.20
4. BY 12755 C1 2009.12.30

(57) Revendicări:

Tulpină de fungi *Lecanicillium lecanii* CNMN-FE-03 pentru protecția plantelor de dăunători și fungi patogeni la culturile legumicole în teren protejat.