



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2011 01206

(22) Data de depozit: 23.11.2011

(41) Data publicării cererii:
30.08.2012 BOPI nr. 8/2012

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
PROTECȚIA PLANTELOR,
BD. ION IONESCU DE LA BRAD NR. 8,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• FĂTU ANA CRISTINA,
STR. TUDOR VLADIMIRESCU BL.D9, AP.6,
MOINEȘTI, BC, RO;

• ANDREI ANA-MARIA, STR. PORUMBACU
NR.9, BL.31, SC.1, ET.4, AP.29, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;
• CIORNEI CONSTANTIN, BD. UNIRII
NR. 11, SC. A, AP. 26, BACĂU, BC, RO;
• CARDAȘ GABRIEL, CALEA NAȚIONALĂ
NR. 66, BL. E3, SC. C, ET. 2, AP. 4,
BOTOȘANI, BT, RO;
• FĂTU VIOREL, COMUNA GRIVIȚA, IL, RO

(54) **TULPINĂ DE *BEAUVERIA BASSIANA*, PATOGENĂ
PENTRU *VIESPEA FRUNZELOR DE ULM*, *APROCEROS
LEUCOPODA TAKEUCHI* (HYMENOPTERA, ARGIDAE) ȘI
PROCEDU DE OBTINERE A UNUI BIOINSECTICID PE
BAZA ACESTEI TULPINI**

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la un procedeu de obținere a unui insecticid biologic pe bază de *Beauveria bassiana* și la tulpina de ciupercă entomopatogenă aparținând genului *Beauveria bassiana*. Tulpina entomopatogenă, aparținând genului *Beauveria bassiana*, este depozitată în Colecția Națională de Microorganisme pentru Industrie și Agricultură, și este patogenă față de *Aproceros leucopoda*, insectă dăunătoare ulmului. Procedeu conform invenției include etapa de cultivare a tulpinii de *Beauveria bassiana* pe un mediu înclinat CGA, prepararea suspensiei conidiene prin spălarea eprubetei

de cultură cu apă distilată sterilă și Tween 80, urmată de vortexarea timp de 1 min la 160 rpm și obținerea unei culturi fungice preinocul, prin inocularea vaselor cu mediu Goral, cu 6 ml suspensie conidiană, agitare la temperatura de 24°C și viteza de rotație de 150 rpm, timp de 3 zile, urmată de însămânțarea unui litru de mediu proaspăt Goral cu 25 ml preinocul, agitare la 150 rpm și 25°C, timp de 5 zile.

Revendicări: 2

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



ca 200 01246
2011

6

**TULPINA DE *BEAUVERIA BASSIANA* PATOGENA PENTRU VIESPEA FRUNZELOR DE ULM,
APROCEROS LEUCOPODA TAKEUCHI (HYMENOPTERA, ARGIDAE) SI PROCEDEU DE
OBTINERE A UNUI BIOINSECTICID PE BAZA ACESTEI TULPINI**

Descrierea inventiei

Inventia se refera la o tulpina autohtona de *Beauveria bassiana*, patogena pentru viespea frunzelor de ulm, *Aproceros leucopoda*, izolata dintr-un focar epizootic natural (fig. 1).

Aproceros leucopoda (Hymenoptera: Argidae) este o insecta defoliatoare invaziva din Asia de Est care, începând cu anul 2003, a colonizat padurile de ulm din țările europene, inclusiv România. Larva poate defolia complet arborii de ulm si poate cauza cel puțin partial devitalizarea acestora.

Rezultate semnificative în domeniul protecției padurilor de foioase fata de atacul produs de viespea ulmului se refera la câteva metode chimice si biologice de combatere. Metodele chimice implica utilizarea pesticidelor chimice ceea ce conduce la efecte agresive fata de mediu si fata de sanatatea umana. Pesticidele chimice utilizate pentru controlul viespei ulmului sunt non-selective, afectând entomofauna utila din zonele tratate, inclusiv dusmanii naturali ai acestui daunator, ceea ce are ca urmare, aparitia re-infestarilor. Demararea procesului de certificare a padurilor din România, precum si Directiva 91 a UE restrictioneaza drastic utilizarea pesticidelor chimice. In acest context, a devenit absolut necesara identificarea unor metode de combatere eficiente și cât mai puțin agresive fata de mediu, în acord cu legislatia europeana si nationala în domeniu. Utilizarea patogenilor insectelor depășește multe probleme apărute prin folosirea pesticidelor chimice, de aceea metodele de combatere biologica au devenit apreciable in controlul daunatorilor cu importanta economica. Organismele care au fost studiate ca fiind potentiali agenti biologici de control ai insectelor daunatoare includ virusurile, nematozii, protozoarele, bacteriile si fungii. Fungi ca *Metharizium* si *Beauveria* au fost utilizati cu succes ca biopesticide.

Prezentam rezultate brevetate în acest domeniu: brevetul US 6,254,864 (2001) se refera la un compus pe baza de spori de *B.bassiana* pentru controlul gândacilor si furnicilor daunatoare; brevetul US 5,413,784 (1997) descrie o metoda de control al gândacilor si furnicilor tâmplar si faraon, utilizând tulpini de *Beauveria bassiana* crescute pe mediu de orez; brevetele US 5,939,065 (1999) si US 6,261,553 (2001) descriu biopreparate pe baza de *Beauveria* si metode pentru controlul insectelor din familia lacustelor.

Dezavantajul cercetarilor desfasurate pâna în prezent consta în aceea ca nici unul dintre bioinsecticidele sau tulpinile de *Beauveria bassiana* descrise nu a fost destinat combaterii daunatorului *Aproceros leucopoda*.

Problema tehnica pe care o rezolva inventia consta în izolarea din focar epizootic natural si identificarea unei tulpini autohtone de *Beauveria bassiana*, cu caracteristici bio-ecologice strict

adaptate habitatului de origine – larva de *Aproceros leucopoda* si cu însusiri biotehnologice care permit prelucrarea ei în vederea obtinerii de insecticide biologice. Tulpina de *Beauveria bassiana*, denumita în continuare BbAl1/10, a fost depozitata în Colectia Nationala de Microorganisme pentru Industrie si Agricultura, NCAIM, din Budapesta, Ungaria, cu numarul de acces (P) F 001386.



Fig. 1 Larva micozata de *Aproceros leucopoda* din care a fost izolata tulpina BbAl1/10

Data izolarii: iunie 2010

Locul izolarii: padurea Soldanesti, Ocol Silvic Trusesti, jud. Botosani

Avantajele inventiei prezentate constau in faptul ca:

- noua tulpina de *B.bassiana* este primul microorganism patogen pentru *Aproceros leucopoda* izolat în Romania din focar natural de infectie;
- noua tulpina de *B.bassiana* reprezinta sursa de material biologic pentru obtinerea de bioinsecticide, cu grad înalt de selectivitate fata de organismele ne-tinta.
- noua tulpina de *B.bassiana* isi pastreaza caracteristicile biologice, ecologice si de patogenitate dupa prelucrare biotehnologica.

In continuare se prezinta exemple de realizare a inventiei:

Exemplul 1

Izolarea tulpinii BbAl1/10

Izolarea tulpinii de *B. bassiana* s-a facut prin metoda izolarii directa de pe o larva de *A. leucopoda* micozata, sub lupa binocular. Coloniile fungice au fost însamantate pe mediu de cultura CGA (cartof-glucoza-agar) si incubate la $25\pm 1^{\circ}\text{C}$. Pentru purificarea culturii fungice s-au facut izolari monosporale pornind de la cultura fungica sporulata; cantitati mici de conidii au fost prelevate de pe mediul agarizat si suspendate in apa distilata sterila care contine Tween 80 (0,01%), apoi însamântate în striuri paralele, în cutii Petri. Dupa incubarea de 48 de ore, la 28°C , coloniile fungice au fost localizate si transferate în eprubete, pe mediu CGA. Tween 80 este o marca înregistrata pentru un surfactant compus din polioxietilen sorbitan monooleat. Caracterizarea macroscopica a tulpinii de *B.bassiana* s-a

facut pe mediu de cultura CGA (extract de cartof 4g/l, dextroza 20g/l, agar 15g/l), pH 5.4±0.2 (la 37°C), dupa 6 zile de incubare la 25°C ; tulpina de *B.bassiana* se prezinta, *in vitro*, sub forma unor colonii lânoase, catifelate spre pulverulente, de culoare alba, reversul alb pe mediu CGA, exudat si miros, absente. Pentru caracterizarea microscopica s-au facut preparate colorate cu bleu-cotton 0,1% în lactofenol; s-au evidentiat hife hialine, septate, cu contur regulat, purtând celule bazale conidiogene din care se formeaza conidii unicelulare globuloase spre elipsoidale, hidrofobe, mici (3-3,7 µm) cu un rahis în forma de zigzag. Pentru caracterizarea fiziologica s-au testat culturi obtinute in conditii stationare pe mediu de cultura cartof-glucoza-agar. Utilizarea diferitelor surse de carbon si azot sunt descrise în cele ce urmeaza:

Surse de carbon		Surse de azot	
valorificate eficient	valorificate ineficient	valorificate eficient	valorificate ineficient
melasa, amidon, zaharoza, glucoza, fructoza, maltoza, arabinoza, lactoza	celuloza	peptona, srot de soia, extract de porumb	srot de in, extract de drojdie

Exemplul 2

Obtinerea bioinsecticidului

Pentru obtinerea bioinsecticidului s-a folosit procedeul de cultivare submersa în conditii de agitare, timp de 5 zile. S-au parcurs urmatoarele etape :

- tulpina de *B.bassiana* BbA11/10 a fost cultivata în eprubete cu mediu înclinat CGA
- s-a preparat o suspensie conidiana prin spalarea unei astfel de eprubete, cu 25 ml de apa distilata sterila + Tween 80 (0,01%). Suspensia a fost vortexata timp de un minut la 160 rpm.
- pentru obtinerea preinoculului, în vase Erlenmyer de 500 ml continând câte 250 ml de mediu Goral (NaNO₃ 5g/l, KH₂PO₄ 5g/l, Mg SO₄ 2g/l, extract de porumb 0,8g/l); au fost inoculati câte 6 ml de suspensie conidiana. Vasul a fost plasat pe un agitator orbital programat la 150 rotatii pe minut 24 °C.
- dupa o perioada de 3 zile de agitare, din acest preinocul s-au luat 25 ml cu care s-a însamântat 1litru de mediu de cultura Goral proaspat, aflat în balon de sticla cu fund rotund. Aceasta cultura finala s-a lasat la agitat timp de 5 zile, la 150 rpm si 25 °C. La sfarsitul acestei perioade s-a analizat microscopic cultura fungic, având un titru de 2 x 10⁹ spori/ml si continând amestec de blastospori de (95%) si fragmente miceliene,

Exemplul 3

Evaluarea virulentei tulpinii de *B.bassiana* BbA11/10 fata de insecta tinta (*A. leucopoda*)

Pentru evaluarea in laborator a virulentei fata de viespea frunzelor de ulm, s-au testat culturi lichide obtinute în conditii de agitare submersa, în mediul Goral. Au fost testate doua tulpini de *Beuveria bassiana*, BbA11/10 si BbS1.07. Insectele în stadiul de larva si pupa, colectate din paduri cu ulmi infestati, au fost plasate, în conditii de laborator, pe ramuri proaspete de ulm, mentinând umiditate ridicata, temperatura de 25-27°C si fotoperioada naturala. Tratamentul s-a facut prin pulverizarea ramurilor cu biopreparatul obinut prin metoda descrisa în exemplul 2. Bioinsecticidul având un titru de 7,8 x 10⁹ conidii / ml a fost aplicat prin sprayere, în trei concentratii diferite (nediluat, diluat 1/2, diluat 1/4). S-au aplicat câte 40 de ml per tratament, în 3 repetitii. Dupa aplicarea tratamentului biologic,

ramurile de ulm au fost introduse în vase cu apă și au fost menținute la o temperatură de 25°C și umiditate 95%. Pentru fiecare repetiție au fost tratate câte 15-20 larve. Evaluarea gradului de specificitate al tulpinii BbAI1/10 față de insecta gazdă s-a făcut prin comparație cu varianta *martor tratat*, în care larvele au fost stropite cu suspensie conidică de BbS1.07, o tulpină de *B. bassiana* izolată din sol. În varianta martor insectele au fost pulverizate cu apă sterilă. S-au făcut zilnic observații asupra mortalității larvelor.

În paralel s-a testat și patogenitatea bioinsecticidului asupra pupelor de *A. leucopoda*, prin metoda de biotestare descrisă mai sus. După tratare, pupele atașate în mod natural de frunze au fost plasate în cutii de plastic sterile, compartimentate și închise. Pentru stabilirea procentului de mortalitate s-au luat în calcul numai larvele de *A. leucopoda* care au prezentat în decurs de 12 zile, simptomele caracteristice micozei provocate de *B. bassiana*. Evidențierea mortalității larvare induse microorganismele testate, s-a făcut prin metoda „camerei umede”. Tulpina BbAI1/10 aplicată sub formă lichidă a manifestat o virulență crescută în comparație cu tulpina BbS1.07. Cea mai ridicată rată de mortalitate s-a înregistrat atunci când larvele au fost tratate cu produs nediluat, celelalte două concentrații testate determinând valori ale mortalității nesemnificativ mai mici. Astfel, media mortalității insectelor de *A. leucopoda* tratate în stadiul de larvă a fost de 84% iar a celor tratate în stadiul de pupă de 76%, comparativ cu doar 11% în cazul celor tratate cu BbS1.07.

Exemplul 4

Evaluarea virulenței tulpinii BbAI1/10 față de insecta test *Plodia interpunctella*

Larvele *Plodia interpunctella* au fost ⁹descuse în condiții controlate, de laborator, pe mediu Hydak (malai 4 parti, făină 2 parti, lapte praf 2 parti, drojdie uscată 1 parte, tarate 2 parti, miere+glicerina 1/1 v/v). Testele s-au desfășurat la temperatura de 25°C iar tratamentele s-au efectuat pe larve de vârstă a doua și a treia, după următorul procedeu: într-o cutie Petri tapetată cu hârtie de filtru s-au introdus 15 larve care au fost stropite cu produs lichid pe baza de BbAI 1/10, cu un titru de $7,8 \times 10^9$, nediluat. După circa 10 secunde acestea au fost transferate în cutii de plastic sterile, compartimentate. În fiecare compartiment s-a distribuit câte o larvă. S-au folosit pentru fiecare tratament câte 15 larve, în 4 repetiții. După o jumătate de oră de la tratament în fiecare compartiment a fost distribuită hrana constând din mediu Hydak, sub formă de bile. În cursul celor 7 zile de incubare la 25 °C, s-au făcut observații privind mortalitatea larvară și s-a constatat o rată medie de mortalitate relativ redusă, de 30%.

Bibliografie

- Blank S.M., Hara H., Mikulas J., Csoka G., Ciornei C., Constantineanu R., Constantineanu I., Roller L., Altenhofer E., Huflejt., Vetek G., 2010. *Aproceros leucopoda* (Hymenoptera: Argidae): An East Asian pest of elms (*Ulmus* sp.) invading Europe. Eur. J. Entomol. 107: 357-367.
- Zandiciacomo P., Cargnus E., Villani A., 2011. First record of invasive sawfly *Aproceros leucopoda* infesting elms in Italy. Bulletin of Insectology, 64 (1): 145-149

Revendicari

1. Tulpina de ciuperca entomopatogena aparținând genului *Beauveria bassiana* caracterizată prin aceea că este depozitată în Colectia Nationala de Microorganisme pentru Industrie și Agricultură, NCAIM, din Budapesta, Ungaria, cu numărul de acces (P) F 001386 patogenă față de *Aproceros leucopoda* (viespea frunzelor de ulm), insecta dăunătoare ulmului.
2. Procedeu de obținere a unui insecticid biologic pe baza de *Beauveria bassiana*, caracterizat prin aceea că este obținut în următoarele etape: (I) cultivarea tulpinii de *B.bassiana* BbA11/10 în eprubeta, pe mediu înclinat CGA; (II) prepararea suspensiei conidiene prin spalarea eprubetei conținând cultura de 14 zile, cu 25 ml de apă distilată sterilă + Tween 80 (0,01%) și vortexarea timp de un minut, la 160 rpm; (III) obținerea culturii fungice preinocul, prin inocularea vaselor cu 250 ml de mediu Goral (NaNO_3 5g/l, KH_2PO_4 5g/l, Mg SO_4 2g/l, extract de porumb 0,8g/l, apă distilată) cu 6 ml suspensie conidiană, agitare la temperatura de 24 °C și viteza de rotație de 150 rpm, timp de 3 zile; (IV) însămânțarea unui litru de mediu proaspăt Goral cu 25 ml preinocul, agitare la 150 rpm și 25 °C, timp de 5 zile.