



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2011 01207

(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;
• FĂTU VIOREL, COMUNA GRIVIȚA, IL, RO;
• CARDAȘ GABRIEL, CALEA NAȚIONALĂ
NR. 66, BL. E3, SC. C, ET. 2, AP. 4,
BOTOȘANI, BT, RO;
• CIORNEI CONSTANTIN, BD. UNIRII
NR. 11, SC. A, AP. 26, BACĂU, BC, RO

(54) TULPINĂ DE *BEAUVERIA BRONGNIARTII*, PATOGENĂ
PENTRU CĂRĂBUȘUL DE MAI, *MELOLONTHA*
MELOLONTHA

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la o tulpină ce aparține genului *Beauveria brongniartii*, depozitată în Colecția Națională de Microorganisme pentru Industrie și Agricultură, și care este patogenă față de *Melolontha*

melolontha, insectă dăunătoare pepinierelor și plantațiilor silvice tinere.

Revendicări: 1



a. Sol. 2009
2009/01/11

14

TULPINA DE *BEAUVERIA BRONGNIARTII* PATOGENA PENTRU CARABUSUL DE MAI,
MELOLONTHA MELOLONTHA

Descrierea inventiei

Inventia se refera la o tulpina de *Beauveria brongniartii*, patogena pentru carabusul de mai, izolata în România, dintr-un focar epizootic natural.

Beauveria brongniartii reprezinta cel mai important patogen al carabusului de mai, *M. melolontha*. Acest fung entomopatogen are o specificitate mare de gazda, în conditii naturale infectând aproape exclusiv specii de *Melolontha* - *M. melolontha* si *M. hippocastanei* (Zimmermann, 2007). Dintre daunatorii de radacina, speciile de carabusi (familia Scarabeidae) sunt în prezent principalii factori biotici de stres în pepinierele si plantatiile silvice tinere. In ultimele doua decenii, carabusul de mai a înregistrat înmultiri în masa si a produs pagube însemnate, în prezent în padurile din România înregistrându-se *faza de eruptie* a acestui daunator. Limitarea utilizarii insecticidelor chimice pentru combaterea acestei categorii de daunatori a impus acordarea unei atentii deosebite masurilor de combatere integrata si în cadrul acesteia, combaterii biologice, prin utilizarea unor microorganisme entomopatogene. Cele mai eficiente biopesticide utilizate in combaterea speciei *M. melolontha* în Europa sunt cele pe baza de ciuperci entomopatogene, *Beauveria brongniartii* (Sacc. Petch) fiind recunoscuta în acest sens.

Solutii brevetate în domeniul prezentei inventii: 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 4942030 (1990) se refera la metoda de combatere a musculitelor cu ajutorul unui biopreparat pe baza de conidii de *Paecilomyces fumosoroseus*; brevetul U.S. 5,595,746 (1997) descrie un repelent pe baza de conidii de *Metarhizium anisopliae* pentru controlul termitelor în zonele infestate si pentru îndepartarea acestora din zonele neinfestate; brevetul U.S. 588,8989 (1999) prezinta o compozitie sinergica de fungi entomopatogeni (*Beauveria* si *Metarhizium*) cu parapiretroizi (silaflofen, etofenprox, imidacloprid, fenoxycarb, fipronil); brevetul WO/2007/087813 (2007) descrie o tulpina egipteană de *Beauveria bassiana* izolata de pe *Rhychophorus ferrugineus*, un daunator al palmierului. Se cunoaste, de asemenea, o metoda brevetata de extragere a unor metaboliti secundari produsii de *Aphanocladium album* si/ sau *Beauveria brongniartii* si de aplicare a unei cantitati care sa fie eficiente in prevenirea sau tratamentul ruginii la plante.

Problema tehnica pe care o rezolva inventia consta în faptul ca tulpina BbgMm1a/09, singura tulpina autohtona de *Beauveria brongniartii* poate asigura sursa de material biologic pentru obtinerea de insecticide cu actiune biologica specifica si strict adaptata conditiilor pedo-climatice caracteristice ecosistemelor forestiere din România. Tulpina BbgMm1a/09A este singurul agent de control biologic al carabusului de mai care raspunde unui principiu de baza al combaterii biologice, acela privind necesitatea ca un agent de control biologic vizat pentru protectia unui anumit habitat fata de un anumit agent de daunare sa isi aiba originea în acel habitat si sa fie izolat din acea insecta gazda. Astfel, tulpina BbgMm1a/09, având ca habitat de origine padurea de stejar, iar ca insecta gazda larva

23 -11- 2011

de *Melolontha*, asigura eficienta economica si ecologica a tratamentelor de protectie biologica a culturilor forestiere fata de atacul carabusului de mai. Având în vedere originea ei, tulpina BbgMm1a/09 are însusirile ecologice necesare colonizarii habitatului în care este lansata (culturi forestiere din România), precum si potentialul biologic de reglare naturala a densitatii populatiilor locale de *Melolontha* sp.

Dezavantajul bioinsecticidelor similare este acela ca sursa de material biologic din care au fost obtinute (tulpini neautohtone de *Beauveria brongniartii*) nu are însusiri bioecologice strict adaptate habitatului în care urmeaza sa fie aplicate. Acest lucru conduce la necesitatea aplicarii unui numar mare de tratamente biologice, adesea cu eficacitate redusa, ceea ce determina cresterea pretului de cost al interventiilor fitosanitare pentru protectia padurilor din România.

Tulpina de ciuperca entomopatogena *Beauveria brongniartii*, conform inventiei (numita în continuare BbgMm1a/09) este depozitata în Colectia Nationala de Microorganisme pentru Industrie si Agricultura, NCAIM, din Budapesta, Ungaria, cu numarul de acces (P) F 001385 si este patogena fata de *Melolontha melolontha*, carabusul de mai, insecta daunatoare plantatiilor si pepinierelor silvice.

În continuare se prezinta exemple de realizare a inventiei:

Exemplul 1

Izolarea tulpinii de *B. brongniartii*

Tulpina de *B. brongniartii* a fost izolata direct de pe larva micozata de *M. melolontha* (fig.1), sub vizualizare stereomicroscopica.



Fig. 1 Larva micozata de *Melolontha melolontha*, din care s-a izolat tulpina BbgMm1a/09

Data izolarii : 18.05.2007

Locul izolarii: pepiniera de stejar, Ocol Silvic Roman (jud. Neamt)

Coloniile fungice au fost însământate pe mediu de cultura CGA (cartof-glucoza-agar) și incubate la $25\pm 1^\circ\text{C}$. Pentru purificarea culturii fungice s-au făcut izolări monosporale pornind de la cultura fungică sporulată; cantități mici de conidii au fost prelevate de pe mediul agarizat și suspendate în apă distilată sterilă care conține și Tween 80 (0,01%), apoi însământate în striuri paralele, în cutii Petri. După incubare 48 de ore, la 26°C , coloniile fungice au fost localizate și transferate în eprubete, pe mediu MEA (malt extract-agar). Tween 80 este o marcă înregistrată pentru un surfactant compus din polioxietilen sorbitan monooleat.

Caracterizarea macroscopică a tulpinii BbgMm1a/09 s-a făcut pe mediu de cultura MEA (malt 20g/l, peptona 1g/l, glucoză 20 g/l, agar 15g/l), pH final 4.6 ± 0.2 , după 6 zile de incubare la 25°C ; pe mediu agarizat, tulpina BbgMm1a/09 se prezintă sub forma unor colonii lănoase, catifelate spre pulverulente, la început de culoare albă, apoi galbui; pe mediul CGA reversul coloniei este alb; nua re miros, nu se formează exudat. Pe mediu CGA generează un pigment roșu.

Pentru caracterizarea microscopică s-au făcut preparate colorate cu bleu-cotton 0,1% în lactofenol; s-au evidențiat hife hialine, septate, cu contur regulat, purtând celule bazale conidiogene din care se formează conidii unicelulare predominant elipsoidale, hidrofobe, mici ($3,7- 4 \mu\text{m}$) cu un rahis în forma de zigzag.

Exemplul 2

Obținerea suspensiei conidiene de BbgMm1a/09 în vederea testării potențialului insecticid

Tulpina BbgMm1a/09 a fost testată, în condiții de laborator, după prelucrare sub forma de bioinsecticid obținut în felul următor: o cultură proaspătă de BbgMm1a/09 pe mediu solid inclinat MEA a fost spălată cu 25 ml de apă distilată sterilă + Tween 80 (0,01%). Suspensia a fost vortexată timp de un minut la 160 rpm. Pentru obținerea preinoculului, în vase Erlenmyer de 500 ml conținând câte 250 ml de mediu lichid cu extract de malt, (malt 20g/l, peptona 1g/l, glucoză 20 g/l) au fost inoculați câte 6 ml de suspensie conidiană. Vasul a fost plasat pe un agitator orbital programat la 150 rpm și 24°C . După o perioadă de 3 zile de agitare, din acest preinocul s-au luat 25 ml cu care s-a însământat direct în saci de plastic autoclavabili, substratul solid obținut prin mixarea a 500 de grame de orz cu 400 ml de apă distilată, autoclavarea la 121°C (timp de 20 de minute până la o oră, în funcție de volum) urmată de răcirea sacilor. Culturile inoculate au fost incubate la $20-26^\circ\text{C}$.

Exemplul 3

Testarea potențialului insecticid al tulpinii BbgMm1a/09 în condiții de laborator

Testele de laborator au fost efectuate pe larve de *M. melolontha*. Insectele test au fost puse în contact direct cu bioinsecticidul pe baza de BbgMm1a/09 și lasate o jumătate de oră, apoi au fost transferate în vase conținând 2 kg de pământ steril, în care s-au încorporat câte 60 g bioinsecticid. Cele 3 variante experimentale au fost analizate comparativ cu varianta martor, conținând sol steril infestat cu larve netratate. După o perioadă de incubare de 7 zile, la întuneric, la temperatura de 20°C s-au făcut

observatii privind mortalitatea larvelor si s-a constatat ca 90% dintre larve aveau simptomele micozei provocate de BbgMm1a/09.

Exemplul 4

Testarea potentialului insecticid al tulpinii BbgMm1a/09 în conditii de câmp

Lucrarile experimentale s-au desfasurat în pepiniere din Moldova, situate în diferite conditii stationale, la altitudini cuprinse între 180 m si 700 m si infestate, în general, puternic si foarte puternic cu larve de carabusi. Dupa determinarea gradului de infestare cu *M.melolontha*, s-au aplicat tratamente biologice cu BbgMm1a/09 sporulata pe boabe de grâu, în doze cuprinse între 100-200 kg biopreparat/ha. Dispozitivele experimentale au fost de tip dreptunghi latin, cuprinzând și suprafata martor. Stabilirea eficacității generale a măsurilor de combatere integrată s-a efectuat prin compararea densității insectelor în sol la începutul și la finele anului, iar eficacitatea produsului biologic, prin raportarea numărului de larve moarte prin infectare cu BbgMm1a/09 la numărul total de larve prezente inițial în sol. Mortalitatea larvara indusa de BbgMm1a/09 a atins valori de pâna la 100% în unele dispozitive experimentale. Majoritatea larvelor au murit în vârsta mare (L₃). In cazuri izolate, au fost constatate mortalitati si în stadiul de pupa.

4.1. Experimentarea tulpinii BbgMm1a/09 în pepiniera Basta

Experimentul efectuat în pepiniera Bașta (O.S.Roman, D.S.Neamț, 180 m altitudine), situată pe malul râului Siret, a constat din aplicarea unui tratament cu BbgMm1a/09 în data de 20.04.2011 în cultura de duglas ornamental. Suprafata variantelor V₁, V₂ și V₃ a fost de câte 6 ari iar suprafata martor de 2 ari. Produsul biologic a fost aplicat prin împrăștiere manuală pe solul prelucrat cu motoprășitoarea iar încorporarea a avut loc cu aceeași unealtă mecanică. Datele privind eficacitatea tratamentelor sunt prezentate sintetic în tabelul 1. Infestarea cu larve de *M.melolontha* la data de 14.05.2011 (25 zile de la tratare) era nulă, datorită mortalității înregistrate prin aplicarea tratamentelor din anul 2010, în variantele V₁ și V₂ și puternică (1,0 L₃/m²) în varianta V₃. La data respectivă nu au fost evidențiate infecții cu *Beauveria*. La 58 zile de la tratare (16.06.2011) mortalitate produsă de ciuperca entomopatogenă în varianta V₃ a fost de 100%. Nu s-au înregistrat mortalități naturale în martor. Formula de calcul a mortalității medii pe variantă a fost : $100M_{B1,2,3}/\Sigma(M_{B1}+V_1)$, unde, M_{B1,2,3} - larve moarte prin infecție cu BbgMm1a/09 la diverse perioade de la tratare; V₁- larve vii la tratare.

4.2. Experimentarea tulpinii BbgMm1a/09 în pepiniera Zăvoi Siret (O.S.Dorohoi, D.S.Botoșani)

Pepiniera Zăvoi Siret este situată pe malul râului Siret (altitudine 270 m); tratamentele au fost efectuate în data de 05.04.2011. Suprafata variantelor V₁, V₂ și V₃ a fost de câte 9 ari iar suprafata martor de 3 ari. Produsul biologic a fost aplicat prin împrăștiere manuală pe solul prelucrat cu discul acționat de tractor iar încorporarea s-a efectuat tot cu discul. Infestarea, la data efectuării primei observații asupra eficacității, era foarte puternică (1,3 L₃/m² în V₁, 3,3 L₃/m² în V₂ și V₃ și 5,7 L₃/m² în martor). Datele privind eficacitatea tratamentelor sunt prezentate sintetic în tabelul 2. Analizând datele din tabel reiese că la 42 zile de la aplicarea tratamentului (17.05.2011) au fost înregistrate mortalități reduse produse de BbgMm1a/09 : 0% în V₁ (100 kg/ha), 30% în V₂ (150 kg/ha) și 10% în V₃ (200 kg/ha). În suprafata martor s-au găsit larve de *M. melolontha* de vârstă mare L₃ îmbolnăvite de ciupercă (6%), probabil

prin deplasarea sporilor din suprafața tratată în timpul inundației catastrofale din vara anului 2010. La 56 zile de la tratare (01.06.2011) s-a înregistrat mortalitatea maximă în toate variantele experimentale: 100% în V_1 , 40% în V_2 și 60% în V_3 . La ultima observație efectuată la data de 25.07.2011, adică după 111 zile de aplicarea tratamentului, mortalitatea înregistrată a fost de 10% în V_2 și V_3 și 12% în martor. Mortalitatea totală s-a cifrat la: 100% în V_1 , 80% în V_2 și V_3 și 18% în martor.

4.3. Experimentarea tulpinii BbgMm1a/09 în pepiniera Cerbărie

Pepiniera Cerbărie din ocolul silvic Mălini - Suceava (altitudine 420 m), a prezentat în toamna anului 2010 o infestare medie cu larve de *M. melolontha* de $1,12 L_3/m^2$. În anul 2010 aici nu au fost efectuate tratamente cu produs biologic pe bază de *Beauveria brogniartii*. În primăvara anului 2011 (20 aprilie) s-a instalat același dispozitiv experimental, cu suprafața de 5 ari în variantele V_1 , V_2 și V_3 și de 1,6 ari în suprafața martor. BbgMm1a/09 a fost aplicată prin împrăștiere manuală pe solul prelucrat cu freza acționată de tractor iar încorporarea s-a efectuat, de asemenea, cu freza. Infestarea, la data efectuării primei observații asupra eficacității, era puternică ($1,0 L_3/m^2$ în V_2 și martor) și foarte puternică ($1,7 L_3/m^2$ în V_1 și $1,3 L_3/m^2$ în și V_3). Datele privind eficacitatea tratamentelor sunt prezentate sintetic în tabelul 3. După cum reiese din tabel, la 20 zile de la aplicarea tratamentului (10.05.2011) au fost înregistrate mortalități produse de *Beauveria* numai în varianta V_2 (25%). La 56 zile de la tratare (01.06.2011) s-a înregistrat mortalitatea maximă în toate variantele experimentale: 40% în V_1 , 50% în V_2 și 100% în V_3 . La ultima observație (20.07.2011), adică după 92 zile de aplicarea tratamentului, mortalitatea înregistrată a fost de 40% în V_1 , 25% în V_2 și 0% în V_3 și în martor. Mortalitatea totală s-a cifrat la: 80% în V_1 și 100% în V_2 și V_3 .

4.4. Experimentarea tulpinii BbgMm1a/09 în pepiniera Izvor

În pepiniera Izvor (O.S. Gura Humorului, D.S. Suceava, altitudine 450 m), situată în albia majoră a râului Moldova, tratamentele au fost efectuate în data de 20.04.2011. Suprafața variantelor V_1 , V_2 și V_3 a fost de câte 7 ari iar suprafața martor de 1 ar. Produsul biologic (BbgMm1a/09) a fost aplicat în amestec cu humus de fag în aceleași doze. Infestarea înainte de executarea tratamentului (14.04.2011) era de $1,3 L_3/m^2$ în V_1 , $0,7 L_3/m^2$ în V_2 , $0 L_3/m^2$ în V_3 și $1,7 L_3/m^2$ în martorul netratat. Produsul biologic a fost aplicat prin împrăștiere manuală pe solul prelucrat cu freza acționată de tractor iar încorporarea s-a efectuat, de asemenea, cu freza. În varianta V_3 larvele au fost distruse prin tratamentele din anul 2010 (200 kg produs biologic pe hectar). Datele privind eficacitatea tratamentelor sunt prezentate sintetic în tabelul 4. Pe data de 11.05.2011, respectiv la 21 zile de la aplicarea tratamentului, nu au fost înregistrate mortalități produse de BbgMm1a/09. La 41 zile de la tratare (31.05.2011) mortalitatea produsă de *Beauveria* s-a cifrat la 50% în V_1 și 100% în V_2 . La 90 zile de la tratare (19.07.2011) mortalitatea produsă de *Beauveria* s-a cifrat la 50% în V_1 . Mortalitatea totală s-a cifrat la 100% în V_1 și 100% în V_2 .

4.5. Experimentarea tulpinii BbgMm1a/09 în pepiniera Tărnicioara

În pepiniera Tărnicioara (O.S. Stulpicani, D.S. Suceava, altitudine 700 m), tratamentul a fost efectuat în data de 30.04.2011. Suprafața variantelor a fost de câte 3,5 ari în variantele tratate și de 1 ar în suprafața martor. Produsul biologic (BbgMm1a/09) s-a aplicat pe altă suprafață decât în anul 2010

(culturi de molid de 2 ani, repicat, în V_1 și V_2 și teren gol în V_3 și martor). Produsul a fost aplicat în amestec cu humus de fag în aceleași doze. Infestarea la data efectuării primei observații asupra eficacității (30.05.2011), la 30 zile de la tratare, era foarte puternică în toate variantele: $1,7 L_3/m^2$ în V_1 și martor, $1,3 L_3/m^2$ în V_2 și $2,0 L_3/m^2$ în varianta V_3 . Datele privind eficacitatea tratamentelor sunt prezentate sintetic în tabelul 5. Pe data de 30.06.2011, respectiv la 60 zile de la aplicarea tratamentului a fost înregistrată mortalitatea maximă produsă de *Beauveria brongniartii*: 40% în V_1 , 75% în V_2 și 50% în V_3 . La 80 zile de la aplicarea tratamentului (19.07.2011) s-au înregistrat mortalități produse de *Beauveria* de 40% în varianta V_1 , 25% în varianta V_2 și 50% în varianta V_3 . Mortalitatea totală produsă în cursul anului 2011 s-a cifrat la: 80 % în V_1 și 100% în V_2 și V_3 corelația doză - efect (răspuns biologic) fiind și de această dată pozitivă.

Rezultatele privind eficacitatea aplicărilor fungice cu BbgMm1a/09 sunt prezentate sintetic în tabelul 6, din analiza caruia se desprind următoarele concluzii:

- tratamentele efectuate în pepinierele Târnicioara (ocolul silvic Stulpicani) și Cerbărie (ocolul silvic Mălini) (un singur an de aplicare) au înregistrat eficacități de 80% la doza de 100 kg/ha și de 100% la dozele de 150 kg/ha și 200 kg/ha, mortalitatea producându-se asupra larvelor de vârstă L_3 ;
- tratamentele efectuate cu doza de 200 kg/ha (doi ani de aplicare pe aceeași suprafață) au înregistrat eficacități cuprinse între 80 - 100%, mortalitatea producându-se asupra larvelor de vârstă L_3 ;
- tratamentele efectuate cu dozele de 300 kg/ha și 400 kg/ha (doi ani de aplicare pe aceeași suprafață) au înregistrat eficacități cuprinse între 80-100%, mortalitatea producându-se asupra larvelor de vârstă L_3 .

Bibliografie

- Zimmermann G., 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. Biocontrol Science and Technology 17, 553-596.
Tanada, Y., Kaya, H.K., 1993. Fungal infections. Acad. Press, Inc. London, 570-571.

Tabelul 1

Mortalitatea larvelor de *M.melolontha* după aplicarea tratamentelor cu BbgMm1a/09, în Pepiniera Bașta (D.S.Neamț, O.S. Roman)

Varianta experimentală	Mod de aplicare	Cultura	Repetiția	Infestare după....zile de la combatere						Mortalitate medie cu BbgMm1a/09 pe repetiție (%)			Mortalitate medie cu BbgMm1a/09 pe variantă (%)				
				25 zile		58 zile		87 zile		25 zile	58 zile	87 zile	25 zile	58 zile	87 zile		
				V ₁ Larve vii/m ²	M _{B1} Larve moarte B.b./m ²	V ₂ Larve vii/m ²	M _{B2} Larve moarte B.b./m ²	V ₃ Larve vii/m ²	M _{B3} Larve moarte B.b./m ²								
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
V ₁ - BbgMm1a/09 - Treatment 2010 - 100 kg/ha - Treatment 2011 - 100 kg/ha Σ = 200 kg/ha	-Pregătire sol cu motoprașitoare - aplicare manuală -Încorporare cu motoprașitoare	Duglas 6 ari	R ₁	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	
			R ₂	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-
			R ₃	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-
V ₂ - BbgMm1a/09 - Treatment 2010 - 150 kg/ha - Treatment 2011 - 150 kg/ha Σ = 300 kg/ha	-Pregătire sol cu motoprașitoare - aplicare manuală -Încorporare cu motoprașitoare	Duglas 6 ari	R ₁	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	
			R ₂	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-
			R ₃	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-
V ₃ - BbgMm1a/09 - Treatment 2010 - 200 kg/ha - Treatment 2011 - 200 kg/ha Σ = 400 kg/ha	-Pregătire sol cu motoprașitoare - aplicare manuală -Încorporare cu motoprașitoare	Duglas Teren gol 6 ari	R ₁	1L ₃	0	0	1L ₃	0	0	0	100	-	-	0	100	-	
			R ₂	1L ₃	0	0	1L ₃	0	0	0	0	100	-	-	0	100	-
			R ₃	1L ₃	0	0	1L ₃	0	0	0	0	100	-	-	0	100	-
M - martor netratat	-Pregătire sol cu motoprașitoare	Duglas 2 ari	R ₁	1L ₃	0	1L ₃	0	1L ₃	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			R ₂	1L ₃	0	1L ₃	0	1L ₃	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			R ₃	1L ₃	0	1L ₃	0	1L ₃	0	0	0	0	0	0	0	0	0

M_{B1,2,3} - larve moarte prin infecție cu BbgMm1a/09 la diverse perioade de la aplicarea tratamentelor V₁ - larve vii la aplicarea tratamentelor

Tabelul 2
Mortalitatea larvelor de *M.melolontha* după aplicarea tratamentelor cu BbgMm1a/09, în Pepiniera Zăvoi Siret (D.S.Botoșani, O.S. Dorohoi)

Varianta experimentală	Mod de aplicare	Cultura	Repetiția	Infestare după....zile de la combatere						Mortalitate medie cu BbgMm1a/09 pe repetiție (%)			Mortalitate medie cu BbgMm1a/09 pe variantă (%)					
				42 zile		56 zile		111 zile		42 zile	56 zile	111 zile	42 zile	56 zile	111 zile	42 zile	56 zile	111 zile
				V ₁ Larve vii/m ²	M _{B1} Larve moarte B.b./m ²	V ₂ Larve vii/m ²	M _{B2} Larve moarte B.b./m ²	V ₃ Larve vii/m ²	M _{B3} Larve moarte B.b./m ²									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17		
V ₁ - BbgMm1a/09 - Tratement 2010 - 100 kg/ha - Tratement 2011 - 100 kg/ha Σ = 200 kg/ha	-Pregătire sol cu discul -Aplicat manual -Încorporare cu discul	Teren gol 9 ari	R ₁	1L ₃	0	0	1L ₃	0	0	0	100	-	0	10	0	10		
			R ₂	3L ₃	0	0	3L ₃	0	0	0	0	100	-	0	0	0	0	
			R ₃	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	-	0	0	0	0
V ₂ - BbgMm1a/09 - Tratement 2010 - 150 kg/ha - Tratement 2011 - 150 kg/ha Σ = 300 kg/ha	-Pregătire sol cu discul -Aplicat manual -Încorporare cu discul	Teren gol 9 ari	R ₁	4L ₃	1L ₃	2L ₃	2L ₃	1P	1L ₃	20	40	20	30	40	10	80		
			R ₂	1L ₃	2L ₃	0	1L ₃	0	0	67	33	-	-	0	0	0	0	
			R ₃	2L ₃	0	1L ₃	1L ₃	1P	0	0	0	50	0	0	0	0	0	0
V ₃ - BbgMm1a/09 - Tratement 2010 - 200 kg/ha - Tratement 2011 - 200 kg/ha Σ = 400 kg/ha	-Pregătire sol cu discul -Aplicat manual -Încorporare cu discul	Teren gol 9 ari	R ₁	2L ₃	1L ₃	1L ₃	1L ₃	0	1L ₃	33	33	34	10	60	10	80		
			R ₂	5L ₃	0	1L ₃	4L ₃	1P	0	0	80	0	0	0	0	0	0	
			R ₃	2L ₃	0	1L ₃	1L ₃	1P	0	0	50	0	0	0	0	0	0	0
M - martor netratat	-Pregătire sol cu discul	Teren gol 3 ari	R ₁	10L ₃	0	10L ₃	0	9L ₃	1L ₃	0	0	10	0	0	0	0	0	
			R ₂	2L ₃	1L ₃	2L ₃	0	2L ₃	0	33	0	0	0	6	0	12	18	
			R ₃	4L ₃	0	4L ₃	0	3L ₃	1L ₃	0	0	25	0	0	0	0	0	0

M_{B1,2,3} - larve moarte prin infecție cu *Beauveria brogniartii* la diverse perioade de la tratare V₁ - larve vii la tratare

Tabelul 3

Mortalitatea larvelor de *M.melolontha* după aplicarea tratamentelor cu BbgMm1a/09, în Pepiniera Cerbărie (D.S.Suceava, O.S. Mălini)

Varianta experimentală	Mod de aplicare	Cultura	Repetiția	Infestare după...zile de la combatere						Mortalitate medie cu BbgMm1a/09 pe repetiție (%)			Mortalitate medie cu BbgMm1a/09 pe variantă (%)					
				20zile		41 zile		92 zile		100M _{B1,2,3} /Σ(M _{B1} +V ₁)			100M _{B1,2,3} /Σ(M _{B1} +V ₁)					
				V ₁ Larve vii/m ²	M _{B1} Larve moarte B.b./m ²	V ₂ Larve vii/m ²	M _{B2} Larve moarte B.b./m ²	V ₃ Larve vii/m ²	M _{B3} Larve moarte B.b./m ²	20 zile	41 zile	92 zile	20 zile	41 zile	92 zile	20 zile	41 zile	92 zile
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17		
V ₁ - BbgMm1a/09 - 100 kg/ha	-Pregătire sol cu freza -Aplicat manual -Încorporare cu freza	Teren gol 5 ari	R ₁	2L ₃	0	1L ₃	1L ₃	0	1L ₃	0	50	50	0	40	40	80		
			R ₂	1L ₃	0	1L ₃	0	1L ₃	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
			R ₃	2L ₃	0	1L ₃	1L ₃	0	1L ₃	0	50	50	50	0	0	0	0	0
V ₂ - BbgMm1a/09 - 150 kg/ha	-Pregătire sol cu freza -Aplicat manual -Încorporare cu freza	Teren gol 5 ari	R ₁	1L ₃	1L ₃	0	1L ₃	0	0	0	50	50	0	25	50	100		
			R ₂	1L ₃	0	1L ₃	0	1L ₃	0	0	0	0	100	0	0	0	0	
			R ₃	1L ₃	0	0	1L ₃	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0
V ₃ - BbgMm1a/09 - 200 kg/ha	-Pregătire sol cu freza -Aplicat manual -Încorporare cu freza	Teren gol 5 ari	R ₁	2L ₃	0	0	2L ₃	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
			R ₂	1L ₃	0	0	1L ₃	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	
			R ₃	1L ₃	0	0	1L ₃	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0
M - martor netratat	-Pregătire sol cu freza	Teren gol 1,6 ari	R ₁	1L ₃	0	1L ₃	0	1L ₃	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
			R ₂	1L ₃	0	1L ₃	0	1L ₃	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			R ₃	1L ₃	0	1L ₃	0	1L ₃	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

M_{B1,2,3} - larve moarte prin infecție cu BbgMm1a/09 la diverse perioade de la aplicarea tratamentelor V₁- larve vii la tratare2011-01207-
23-11-2011

Tabelul 4
Mortalitatea larvelor de *M. melolontha* după aplicarea tratamentelor cu BbgMm1a/09, în Pepiniera Izvor (D.S.Suceava, O.S. Gura Humorului)

Varianta experimentală	Mod de aplicare	Cultura	Repetiția	Infestare după....zile de la combatere						Mortalitate medie cu BbgMm1a/09 pe repetiție (%)			Mortalitate medie cu BbgMm1a/09 pe variantă (%)					
				21 zile		41 zile		90 zile		100M _{B1,2,3} /Σ(M _{B1} +V ₁)			100M _{B1,2,3} /Σ(M _{B1} +V ₁)					
				V ₁ Larve vii/m ²	M _{B1} Larve moarte B.b./m ²	V ₂ Larve vii/m ²	M _{B2} Larve moarte B.b./m ²	V ₃ Larve vii/m ²	M _{B3} Larve moarte B.b./m ²	21 zile	41 zile	90 zile	21 zile	41 zile	90 zile	Σ		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17		
V ₁ - BbgMm1a/09 - 100 kg/ha Humus de fag - 100 kg/ha	-Pregătire sol cu freza -Aplicat manual -Încorporare cu freza	Teren gol 7 ani	R ₁	1L ₃	0	1L ₃	0	0	1L ₃	0	0	100						
			R ₂	2L ₃	0	1L ₃	0	1L ₃	0	50	50	0	50	100				
			R ₃	1L ₃	0	1L ₃	0	1L ₃	0	100	0	100	0	0				
V ₂ - BbgMm1a/09 - 150 kg/ha Humus de fag - 150 kg/ha	-Pregătire sol cu freza -Aplicat manual -Încorporare cu freza	Teren gol 7 ani	R ₁	1L ₃	0	1L ₃	0	0	100	0	100	0						
			R ₂	1L ₃	0	1L ₃	0	1L ₃	0	100	0	100	0	10	0	100		
			R ₃	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-		
V ₃ - BbgMm1a/09 - 200 kg/ha Humus de fag - 200 kg/ha	-Pregătire sol cu freza -Aplicat manual -Încorporare cu freza	Teren gol 7 ani	R ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
			R ₂	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
			R ₃	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
M - martor netratat	-Pregătire sol cu freza	Teren gol 1 ar	R ₁	2L ₃	0	2L ₃	0	2L ₃	0	2L ₃	0	0	0	0	0	0		
			R ₂	2L ₃	0	2L ₃	0	2L ₃	0	2L ₃	0	0	0	0	0	0	0	
			R ₃	1L ₃	0	1L ₃	0	1L ₃	0	1L ₃	0	0	0	0	0	0	0	

M_{B1,2,3} - larve moarte prin infecție cu BbgMm1a/09 la diverse perioade de la aplicarea tratamentelor V₁ - larve vii la tratare

a-2011-01207--
 23 -11- 2011

Tabelul 5
 Mortalitatea larvelor de *M.melolontha* dupa aplicarea tratamentelor cu BbgMm1a/09, în Pepiniera Tărnicioara (D.S.Suceava, O.S. Stulpicani)

Varianta experimentală	Mod de aplicare	Cultura	Repetiția	Infestare după....zile de la combatere						Mortalitate medie cu BbgMm1a/09 pe repetiție (%) $100M_{B1,2,3}/\Sigma(M_{B1}+V_1)$			Mortalitate medie cu BbgMm1a/09 pe variantă (%) $100M_{B1,2,3}/\Sigma(M_{B1}+V_1)$						
				30 zile		60 zile		80 zile		30 zile	60 zile	80 zile	30 zile	60 zile	80 zile	Σ			
				V_1 Larve vii/m ²	M_{B1} Larve moarte B.b./m ²	V_2 Larve vii/m ²	M_{B2} Larve moarte B.b./m ²	V_3 Larve vii/m ²	M_{B3} Larve moarte B.b./m ²										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17			
V_1 - BbgMm1a/09 - 100 kg/ha Humus de fag - 100 kg/ha	-Aplicat manual între rânduri -Încorporare cu sapa	MoS ₁₀ 3,5 ari	R ₁	2L ₃	0	1L ₃	1L ₃	0	1L ₃	0	1L ₃	0	0	0	40	80			
			R ₂	1L ₃	0	1L ₃	0	1L ₃	0	1L ₃	0	0	0	0	0	40	80		
			R ₃	2L ₃	0	1L ₃	1L ₃	0	1L ₃	0	1L ₃	0	50	50	0	0	0	0	
V_2 - BbgMm1a/09 - 150 kg/ha Humus de fag - 150 kg/ha	-Aplicat manual între rânduri -Încorporare cu sapa	MoS ₁₀ 3,5 ari	R ₁	2L ₃	0	1L ₃	1L ₃	0	1L ₃	0	1L ₃	0	50	50	75	25	100		
			R ₂	1L ₃	0	0	1L ₃	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	100	
			R ₃	1L ₃	0	0	1L ₃	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	100
V_3 - BbgMm1a/09 - 200 kg/ha Humus de fag - 200 kg/ha	-Pregătire sol cu freza -Aplicat manual -Încorporare cu freza	Teren gol 3,5 ari	R ₁	2L ₃	0	1L ₃	1L ₃	0	1L ₃	0	1L ₃	0	50	50	50	50	100		
			R ₂	2L ₃	0	0	2L ₃	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	100	
			R ₃	2L ₃	0	2L ₃	0	0	0	2L ₃	0	0	0	100	0	0	0	0	100
M - martor netratat	-Pregătire sol cu freza	Teren gol 1 ar	R ₁	2L ₃	0	2L ₃	0	2L ₃	0	2L ₃	0	0	0	0	0	0	0	0	
			R ₂	1L ₃	0	1L ₃	0	1L ₃	0	1L ₃	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			R ₃	2L ₃	0	2L ₃	0	2L ₃	0	2L ₃	0	0	0	0	0	0	0	0	0

$M_{B1,2,3}$ - larve moarte prin infecție cu BbgMm1a/09 la diverse perioade după aplicarea tratamentelor V_1 - larve vii la tratare

a-2011-012074

23 -11- 2011

Tabelul 6

Eficacitatea tratamentelor cu BbgMm1a/09 în combaterea larvelor de *M.melolontha* (tabel sintetic)

Doza de bioinsecticid	Nivel infestare primăvara 2011 (I ₁)	Mod de administrare	Altitudine - m -	Nivel infestare toamna 2011 (I ₂)	Mortalitate BbgMm1a/09 (%) 100M _B / Σ(M+V)
100 kg/ha 2011	1,7 L ₃	-Pregătire sol cu freza; aplicat manual;încorporare cu freza	420	0,3 L ₃	80.0 (L ₃)
	1,7 L ₃	-Aplicat manual între rânduri; încorporare cu sapa	700	0,3 L ₃	80.0 (L ₃)
150 kg/ha 2011	1,0 L ₃	-Pregătire sol cu freza; aplicat manual;încorporare cu freza	420	0	100 (L ₃)
	1,3 L ₃	-Aplicat manual între rânduri; încorporare cu sapa	700	0	100 (L ₃)
200 kg/ha 2011	1,3 L ₃	-Pregătire sol cu freza; aplicat manual;încorporare cu freza	420	0	100 (L ₃)
	2,0 L ₃	-Aplicat manual între rânduri; încorporare cu sapa	700	0	100 (L ₃)
100 kg/ha 2010	0	-Pregătire sol cu motoprășitoarea; aplicat manual; încorporare cu motoprășitoarea	180	0	-
100 kg/ha 2011	1,3 L ₃	-Pregătire sol cu discul; aplicat manual; încorporare cu discul	270	0	100 (L ₃)
Σ = 200 kg/ha	1,3 L ₃	-Pregătire sol cu freza; aplicat manual;încorporare cu freza	450	0	100 (L ₃)
150 kg/ha 2010	0	-Pregătire sol cu motoprășitoarea; aplicat manual; încorporare cu motoprășitoarea	180	0	-
150 kg/ha 2011	3,3 L ₃	-Pregătire sol cu discul; aplicat manual; încorporare cu discul	270	0,7P	80.0 (L ₃)
Σ = 300 kg/ha	0,7 L ₃	-Pregătire sol cu freza; aplicat manual;încorporare cu freza	450	0	100 (L ₃)
200 kg/ha 2010	1,0 L ₃	-Pregătire sol cu motoprășitoarea; aplicat manual; încorporare cu motoprășitoarea	180	0	100 (L ₃)
200 kg/ha 2011	3,3 L ₃	-Pregătire sol cu discul; aplicat manual; încorporare cu discul	270	0,7P	80.0 (L ₃)
Σ = 400 kg/ha	0	-Pregătire sol cu freza; aplicat manual;încorporare cu freza	450	0	-

M - total insecte moarte; V - insecte vii; M_B - insecte moarte, micoza BbgMm1a/09; L / P - larve / pupe de *M.melolontha*

I₁ - infestare în momentul combaterii; I₂ - infestare după combatere (la sfârșitul anului)

Q-2011-01207--
23-11-2011

2

Revendicari

1. Tulpina de ciuperca entomopatogena aparținând genului *Beauveria brongniartii* 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 001385 și este patogenă față de *Melolontha melolontha* (carabusul de mai), insecta dăunătoare pepinierelor și plantațiilor silvice tinere.