



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2011 01207**

(22) Data de depozit: **23.11.2011**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **28.11.2014** BOPI nr. **11/2014**

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

(73) Titular:
• **INSTITUTUL DE CERCETARE-
DEZVOLTARE PENTRU PROTECȚIA
PLANTELOR,**
*BD.ION IONESCU DE LA BRAD NR.8,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;*
• **INSTITUTUL DE CERCETĂRI ȘI
AMENAJĂRI SILVICE, BD.EROILOR
NR.128, VOLUNTARI, IF, RO**

(72) Inventatori:
• **FĂTU ANA-CRISTINA,**
*STR.TUDOR VLADIMIRESCU, BLD 9, 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.E 3, SC.C, ET.2, AP.4,
BOTOȘANI, BT, RO;*
• **CIORNEI CONSTANTIN,** *BD.UNIRII NR.11,
SC.A, AP.26, BACĂU, BC, RO*

(56) Documente din stadiul tehnicii:
US 6254864 (B1); KR 20100080107 (A)

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



RO 127712 B1

1 Invenția se referă la o tulpină de *Beauveria brongniartii*, patogenă pentru cărăbușul de
mai, izolată în România, dintr-un focar epizootic natural.

3 *Beauveria brongniartii* reprezintă cel mai important patogen al cărăbușului de mai,
Melolontha melolontha. Acest fung entomopatogen are o specificitate mare de gazdă, în condiții
5 naturale, infestând aproape exclusiv specii de *Melolontha* - *Melolontha melolontha* și *M.*
hippocastanei (Zimmermann G., 2007, **Review on safety of the entomopathogenic fungi**
7 ***Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. Biocontrol Science and Technology 17,**
553-596).

9 Dintre dăunătorii de rădăcină, speciile de cărăbuși (familia *Scarabeidae*) sunt în prezent
principalii factori biotici de stres în pepinierele și plantațiile silvice tinere. În ultimele două
11 decenii, cărăbușul de mai a înregistrat înmulțiri în masă și a produs pagube însemnate. În
prezent, în pădurile din România, înregistrându-se faza de erupție a acestui dăunător. Limitarea
13 utilizării insecticidelor chimice, pentru combaterea acestei categorii de dăunători, a impus
acordarea unei atenții deosebite măsurilor de combatere integrată și, în cadrul acesteia,
15 combaterii biologice, prin utilizarea unor microorganisme entomopatogene. Cele mai eficiente
biopesticide, utilizate în combaterea speciei *Melolontha melolontha*, în Europa, sunt cele pe
17 bază de ciuperci entomopatogene, *Beauveria brongniartii* (Sacc. Petch) fiind recunoscută în
acest sens.

19 Soluții brevetate în domeniul prezentei invenții: brevetul **US 6254864** (2001) se referă
la un compus pe bază de spori de *Beauveria bassiana*, pentru controlul gândacilor și al furnicilor
21 dăunătoare; brevetul **US 4942030** (1990) se referă la metoda de combatere a musculițelor, cu
ajutorul unui biopreparat pe bază de conidii de *Paecilomyces fumosoroseus*; brevetul
23 **KR 20100080107(A)** descrie o tulpină izolată de *Beauveria bassiana*, cu efect insecticid
excelent pentru *Myzus persicae*. Se descrie, de asemenea, un bioinsecticid obținut prin cultiva-
25 rea acestei tulpini pe mediu de cultură solid, ce conține orez alb, orez alb spart și tarătă de grâu;
brevetul **US 5595746** (1997) descrie un repelent pe bază de conidii de *Metarhizium anisopliae*,
27 pentru controlul termitelor în zonele infestate și pentru îndepărtarea acestora din zonele
neinfestate; brevetul **US 5888989** (1999) prezintă o compoziție sinergică de fungi entomopato-
29 geni (*Beauveria* și *Metarhizium*) cu parapiretroizi (silaflofen, etofenprox, imidacloprid,
fenoxycarb, fipronil); cererea de brevet **WO/2007/087813** (2007) descrie o tulpină egipteană de
31 *Beauveria bassiana*, izolată de pe *Rhychophorus ferrugineus*, un dăunător al palmierului. Se
cunoaște, de asemenea, o metodă brevetată de extragere a unor metaboliți secundari, produși
33 de *Aphanocladium album* și/sau *Beauveria brongniartii* și de aplicare a unei cantități care să fie
eficientă în prevenirea sau tratamentul ruginii la plante.

35 Problema tehnică, pe care o rezolvă invenția, constă în faptul că tulpina BbgMm1a/09,
singura tulpină autohtonă de *Beauveria brongniartii*, poate asigura sursa de material biologic,
37 pentru obținerea de insecticide cu acțiune biologică specifică și strict adaptată condițiilor
pedoclimatice caracteristice ecosistemelor forestiere din România. Tulpina BbgMm1a/09A este
39 singurul agent de control biologic al cărăbușului de mai care răspunde unui principiu de bază
al combaterii biologice, acela privind necesitatea ca un agent de control biologic vizat pentru
41 protecția unui anumit habitat față de un anumit agent de dăunare să își aibă originea în acel
habitat și să fie izolat din acea insectă gazdă. Astfel, tulpina BbgMm1a/09, având ca habitat de
43 origine pădurea de stejar, iar ca insectă gazdă, larva de *Melolontha*, asigură eficiența econo-
mică și ecologică a tratamentelor de protecție biologică a culturilor forestiere față de atacul cără-
45 bușului de mai. Având în vedere originea acesteia, tulpina BbgMm1a/09 are însușirile ecologice
necesare colonizării habitatului în care este lansată (culturi forestiere din România), precum și
47 potențialul biologic de reglare naturală a densității populațiilor locale de *Melolontha* sp.

Dezavantajul bioinsecticidelor similare este acela că sursa de material biologic din care au fost obținute (tulpini neautohtone de *Beauveria brongniartii*) nu are însușiri bioecologice strict adaptate habitatului în care urmează să fie aplicate. Acest lucru conduce la necesitatea aplicării unui număr mare de tratamente biologice, adesea cu eficacitate redusă, ceea ce determină creșterea prețului de cost al intervențiilor fitosanitare, pentru protecția pădurilor din România.

Tulpina de ciuperca entomopatogenă *Beauveria brongniartii*, conform invenției, numită, în continuare, BbgMm1a/09, este depozitată în Colecția Națională de Microorganisme pentru Industrie și Agricultură, NCAIM, din Budapesta, Ungaria, cu numărul de acces (P) F 001385 și este patogenă față de *Melolontha melolontha*, cărăbușul de mai, insectă dăunătoare plantațiilor și pepinierelor silvice.

În continuare, se prezintă exemple de realizare a invenției.

Exemplul 1. Izolarea tulpinii de *Beauveria brongniartii*

Tulpina de *Beauveria brongniartii* a fost izolată direct de pe larva micozată de *Melolontha melolontha* (fig. 1), sub vizualizare stereomicroscopică.

Coloniile fungice au fost însămânțate pe un mediu de cultură CGA (cartof-glucoză-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 însămânțate în striuri paralele, în cutii Petri. După incubare 48 h, la 26°C , coloniile fungice au fost localizate și transferate în eprubete, pe mediu MEA (malț 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 cultură MEA (malț 20g/l, peptonă 1 g/l, glucoză 20 g/l, agar 15g/l), pH final $4,6 \pm 0,2$, 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 gălbuie; pe mediul CGA, reversul coloniei este alb, nu are miros, nu se formează exudat. Pe mediul 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 ($3,7 \dots 4 \mu\text{m}$) cu un rahis în formă 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 formă de bioinsecticid, obținut în felul următor: o cultură proaspătă de BbgMm1a/09, pe mediu solid înclinat 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 malț, (malț 20g/l, peptonă 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 însămânțat direct, în saci de plastic autoclavabili, substratul solid obținut prin mixarea a 500 g de orz cu 400 ml de apă distilată, autoclavarea la 121°C (timp de 20 mi până la o oră, în funcție de volum), urmată de răcirea sacilor. Culturile inoculate au fost incubate la $20 \dots 26^\circ\text{C}$.

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 bază de BbgMm1a/09 și lăsate 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 trei variante experimentale au fost analizate comparativ cu varianta martor, conținând sol steril infestat cu larve netratate. După o perioadă de incubare de șapte zile, la întuneric, la temperatura de 20°C, s-au făcut observații privind mortalitatea larvelor și s-a constatat că 90% dintre larve aveau simptomele micozei provocate de BbgMm1a/09.

Exemplul 4. Testarea potențialului insecticid al tulpinii BbgMm1a/09, în condiții de câmp

Lucrările experimentale s-au desfășurat în pepiniere din Moldova, situate în diferite condiții staționate, la altitudini cuprinse între 180 și 700 m, și infestate, în general, puternic și foarte puternic cu larve de cărbuși. După determinarea gradului de infestare cu *Melolontha melolontha*, s-au aplicat tratamente biologice cu BbgMm1a/09 sporulată pe boabe de grâu, în doze cuprinse între 100 și 200 kg biopreparat/ha. Dispozitivele experimentale au fost de tip dreptunghi latin, cuprinzând și suprafață 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 infestare cu BbgMm1a/09 la numărul total de larve prezente inițial în sol. Mortalitatea larvară, indusă de BbgMm1a/09, a atins valori de până la 100% în unele dispozitive experimentale. Majoritatea larvelor au murit la vârstă mare (L3). În cazuri izolate, au fost constatate mortalități și în stadiul de pupă.

4.1. Experimentarea tulpinii BbgMm1a/09 în pepiniera Bașta

Experimentul efectuat în pepiniera Bașta (O. S. Român, D. S. Neamț, 180 m altitudine), situată pe malul râului Siret, a constat din aplicarea unui tratament cu BbgMm1a/09, la data de 20.04.2011, în cultura de duglas ornamental. Suprafața variantelor V_1 , V_2 și V_3 a fost de câte 6 ari, iar suprafața 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 *Melolontha melolontha* la data de 14. 05. 2011 (la 25 zile de la tratare) era nulă, datorită mortalității înregistrate prin aplicarea tratamentelor din anul 2010, în variantele V_1 și V_2 , și puternică ($1,0 L_3/m^2$) în varianta V_3 . La data respectivă, nu au fost evidențiate infestări cu *Beauveria brongniartii*. La 58 zile de la tratare (16.06.2011), mortalitatea produsă de ciuperca entomopatogenă în varianta V_3 a fost de 100%. Nu s-au înregistrat mortalități naturale în martor. Formula de calcul a mortalității medii pe variantă a fost: $100M_{B1,2,3} / \Sigma(M_{B1} + sV_1)$, unde: $M_{B1,2,3}$ - larve moarte prin infestare cu BbgMm1a/09 la diverse perioade de la tratare; V_1 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 la data de 05.04.2011. Suprafața variantelor V_2 și V_3 a fost de câte 9 ari, iar suprafața 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 ($1,3 L_3/m^2$ în V_1 , $3,3 L_3/m^2$ în V_2 și V_3 și $5,7 L_3/m^2$ în martor). Datele privind eficacitatea tratamentelor sunt prezentate sintetic în tabelul 2. Analizând datele din tabel, reiese că, la 42 de zile de la aplicarea tratamentului (17.05.2011), au fost înregistrate mortalități reduse, produse de BbgMm1a/09 : 0% în V_1 (100 kg/ha), 30% în V_2 (150 kg/ha) și 10% în V_3 (200 kg/ha). În suprafața martor, s-au găsit larve de *M. melolontha* de vârstă mare L_3 , îmbolnăvite de ciupercă (6%), probabil prin deplasarea sporilor din suprafața tratată în timpul inundației catastrofale din vara anului 2010. La 56 de 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 L₃/m². În anul 2010, aici, nu au fost efectuate tratamente cu produsul 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 V₁, V₂ și V₃ 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 L₃/m² în V₂ și martor) și foarte puternică (1,7 L₃/m² în V₁ și 1,3 L₃/m² în și V₃). Datele privind eficacitatea tratamentelor sunt prezentate sintetic în tabelul 3. După cum reiese din tabel, la 20 de zile de la aplicarea tratamentului (10.05.2011), au fost înregistrate mortalități produse de *Beauveria*, numai în varianta V₂ (25%). La 56 de zile de la tratare (01.06.2011), s-a înregistrat mortalitatea maximă în toate variantele experimentale: 40% în V₁, 50% în V₂ și 100% în V₃. La ultima observație (20.07.2011), adică după 92 de zile de aplicarea tratamentului, mortalitatea înregistrată a fost de 40% în V₁, 25% în V₂ și 0% în V₃ și în martor. Mortalitatea totală s-a cifrat la: 80% în V₁ și 100% în V₂ și V₃.

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 la data de 20.04.2011. Suprafața variantelor V₁, V₂ și V₃ 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 L₃/m² în V₁, 0,7 L₃/m² în V₂, 0 L₃/m² în V₃ și 1,7 L₃/m² 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 V₃, 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 V₁ și de 100% în V₂. La 90 de zile de la tratare (19.07.2011), mortalitatea produsă de *Beauveria* s-a cifrat la 50% în V₁. Mortalitatea totală s-a cifrat la 100% în V₁ și 100% în V₂.

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 la 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 V₁ și V₂, și teren gol, în V₃ 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 de zile de la tratare, era foarte puternică în toate variantele: 1,7 L₃/m² în V₁ și martor, 1,3 L₃/m² în V₂ și 2,0 L₃/m² în varianta V₃. Datele privind eficacitatea tratamentelor sunt prezentate sintetic în tabelul 5. La data de 30.06.2011, respectiv, la 60 zile de la aplicarea tratamentului, a fost înregistrată mortalitatea maximă produsă de *Beauveria brogniartii*: 40% în V₁, 75% în V₂ și 50% în V₃. La 80 zile de la aplicarea tratamentului (19.07.2011), s-au înregistrat mortalități produse de *Beauveria* de 40% în varianta V₁, 25% în varianta V₂ și 50% în varianta V₃. Mortalitatea totală, produsă în cursul anului 2011, s-a cifrat la: 80% în V₁ și 100% în V₂ și V₃, corelația doză - efect (răspuns biologic) fiind și de această dată pozitivă.

RO 127712 B1

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

3 - tratamentele efectuate în pepinierele Tărnicioara (ocolul silvic Stulpicani) și Cerbărie
(ocolul silvic Mălini) (un singur an de aplicare) au înregistrat eficacități de 80% la doza de 100
5 kg/ha și de 100% la dozele de 150 kg/ha și 200 kg/ha, mortalitatea producându-se asupra
larvelor de vârstă L₃;

7 - tratamentele efectuate cu doza de 200 kg/ha (doi ani de aplicare pe aceeași suprafață)
au înregistrat eficacități cuprinse între 80 și 100%, mortalitatea producându-se asupra larvelor
9 de vârstă L₃;

11 - 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 și 100%, mortalitatea
producându-se asupra larvelor de vârstă L₃.

13 **Bibliografie**

15 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.

RO 127712 B1

Tabelul 1 1

Mortalitatea larvelor de *Melolontha 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		100MB _{1,2,3} /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	25 zile	58 zile	87 zile	25 zile	58 zile	87 zile	Σ
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
V ₁ -BbgMm1a/09 - Tratament 2010 -100 kg/ha - Tratament 2011 -100 kg/ha Σ = 200 kg/ha	- Pregătire sol cu motoprășitoarea - Aplicare manuală -Încorporare cu motoprășitoarea	Duglas 6 ari	R ₁	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-
			R ₂	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	
			R ₃	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	
V ₂ -BbgMm1a/09 - Tratament 2010 -150 kg/ha - Tratament 2011 -150 kg/ha Σ = 300 kg/ha	- Pregătire sol cu motoprășitoarea - Aplicare manuală - Încorporare cu motoprășitoarea	Duglas 6 ari	R ₁	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-
			R ₂	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	
			R ₃	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	
V ₃ -BbgMm1a/09 - Tratament 2010 - 200 kg/ha - Tratament 2011 - 200 kg/ha Σ =400 kg/ha	- Pregătire sol cu motoprășitoarea - Aplicare manuală - Încorporare cu motoprășitoarea	Duglas Teren gol 6 ari	R ₁	1L ₃	0	0	1L ₃	0	0	0	100	-	0	100	-	100
			R ₂	1L ₃	0	0	1L ₃	0	0	0	100	-	-	-	-	
			R ₃	1L ₃	0	0	1L ₃	0	0	0	100	-	-	-	-	
M - martor netratat	- Pregătire sol cu motoprășitoarea	Duglas 2 ari	R ₁	1L ₃	0	1L ₃	0	1L ₃	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	
			R ₃	1L ₃	0	1L ₃	0	1L ₃	0	0	0	0	0	0	0	

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

RO 127712 B1

Tabelul 2

Mortalitatea larvelor de *Melolontha 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 (%) $100MB_{1,2,3}/\Sigma(M_{B1}+V_1)$			Mortalitate medie cu BbgMm1a/09 pe variantă (%) $100M_{B1,2,3}/\Sigma(M_{B1}+V_1)$			
				42 zile		56 zile		111 zile		42 zile	56 zile	111 zile	42 zile	56 zile	111 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	42 zile	56 zile	111 zile	42 zile	56 zile	111 zile	Σ
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
V ₁ - BbgMm1a/09 - Tratament 2010 -100 kg/ha - Tratament 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	100	-	100
			R ₂	3L ₃	0	0	3L ₃	0	0	0	100	-				
			R ₃	0	0	0	0	0	0	100	-					
V ₂ - BbgMm1a/09 - Tratament 2010 -150 kg/ha - Tratament 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	-				
			R ₃	2L ₃	0	1L ₃	1L ₃	1P	0	0	50	0				
V ₃ - BbgMm1a/09 - Tratament 2010 - 200 kg/ha - Tratament 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				
			R ₃	2L ₃	0	1L ₃	1L ₃	1P	0	0	50	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	6	0	12	18
			R ₂	2L ₃	1L ₃	2L ₃	0	2L ₃	0	33	0	0				
			R ₃	4L ₃	0	4L ₃	0	3L ₃	1L ₃	0	0	25				

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

RO 127712 B1

Tabelul 3 1

Mortalitatea larvelor de *Melolontha melolontha*, după aplicarea tratamentelor cu BbgMm1a/09, în Pepiniera Cerbărie
(D. S. Suceava, O. S. Mălini) 3

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 (%) $100M_{B1+2+3}/\Sigma(M_{B1}+V_1)$			
				20 zile		41 zile		92 zile		20 zile	41 zile	92 zile	20 zile	41 zile	92 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	- 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
			R ₃	2L ₃	0	1L ₃	1L ₃	0	1L ₃	0	50	50	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	50	50	0	25	50	25	100
			R ₂	1L ₃	0	1L ₃	0	0	1L ₃	0	0	100	0	0	0	0
			R ₃	1L ₃	0	0	1L ₃	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	100	0	0	100	0	100
			R ₂	1L ₃	0	0	1L ₃	0	0	0	100	0	0	0	0	0
			R ₃	1L ₃	0	0	1L ₃	0	0	0	100	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
			R ₂	1L ₃	0	1L ₃	0	1L ₃	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

M_{B1,2,3} - larve moarte prin infestare cu BbgMm1a/09, la diverse perioade de la aplicarea tratamentelor; V₁- larve vii la tratare. 31

RO 127712 B1

Tabelul 4

Mortalitatea larvelor de *Melolontha 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 (%) $100M_{B1,2,3}/\Sigma(M_{B1}+V_1)$			Mortalitate medie cu BbgMm1a/09 pe variantă (%) $100M_{B1+2+3}/\Sigma(M_{B1}+V_1)$			
				21 zile		41 zile		90 zile		21 zile	41 zile	90 zile	21 zile	41 zile	90 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	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 ari	R ₁	1L ₃	0	1L ₃	0	0	1L ₃	0	0	100	0	50	50	80
			R ₂	2L ₃	0	1L ₃	1L ₃	0	1L ₃	0	50	50				
			R ₃	1L ₃	0	0	1L ₃	0	0	0	100	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 ari	R ₁	1L ₃	0	0	1L ₃	0	0	0	100	0	0	100	0	100
			R ₂	1L ₃	0	0	1L ₃	0	0	0	100	0				
			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 ari	R ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-
			R ₂	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
			R ₃	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	0	0	0	0	0	0	0
			R ₂	2L ₃	0	2L ₃	0	2L ₃	0	0	0	0				
			R ₃	1L ₃	0	1L ₃	0	1L ₃	0	0	0	0				

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

RO 127712 B1

Tabelul 5 1

Mortalitatea larvelor de *Melolontha melolontha*, după aplicarea tratamentelor cu BbgMm1a/09, în Pepiniera Tărnicioara
(D. S. Suceava, O. S. Stulpicani) 3

Varianta experimentală	Mod de aplicare	Cultura	Repetiția	Infestare după....zile de la combatere						Mortalitate medie cu BbgMm1a/09 pe repetiție (%) $100M_{1,2,3}/\Sigma(M_{B1}+V_1)$			Mortalitate medie cu BbgMm1a/09 pe variantă (%) $100M_{B1+2+3}/\Sigma(M_{B1}+V_1)$			
				30 zile		60 zile		80 zile								
				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	30 zile	60 zile	80 zile	30 zile	60 zile	80 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	- 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	50	50	0	40	40	80
			R ₂	1L ₃	0	1L ₃	0	1L ₃	0	0	0	0	0	0	0	0
			R ₃	2L ₃	0	1L ₃	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	50	50	0	75	25	100
			R ₂	1L ₃	0	0	1L ₃	0	0	0	100	0	0	0	0	0
			R ₃	1L ₃	0	0	1L ₃	0	0	0	100	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 3,5 ari	R ₁	2L ₃	0	1L ₃	1L ₃	0	1L ₃	0	50	50	0	50	50	100
			R ₂	2L ₃	0	0	2L ₃	0	0	0	100	0	0	0	0	0
			R ₃	2L ₃	0	2L ₃	0	0	2L ₃	0	0	100	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	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
			R ₃	2L ₃	0	2L ₃	0	2L ₃	0	0	0	0	0	0	0	0

M_{B1,2,3} - larve moarte prin infestare cu BbgMm1a/09, la diverse perioade după aplicarea tratamentelor; V₁ - larve vii la tratare.

RO 127712 B1

Tabelul 6

Eficacitatea tratamentelor cu BbgMm1a/09 în combaterea larvelor de *Melolontha 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 U	- Aplicat manual între rânduri; încorporare cu sapa	700	0,3 L ₃	80.0 (U)
150 kg/ha 2011	1,0 U	- 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 La	- 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)
	0,7 L ₃	- Pregătire sol cu freza; aplicat manual; încorporare cu freza	450	0	100 (L ₃)
ΣI = 300 kg/, ha					
200 kg/ha 2010	1,0 L ₃	- Pregătire sol cu motoprășitoarea; aplicat manual; încorporare cu motoprășitoarea	180	0	100 (La)
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 *Melolontha melolontha*;

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

RO 127712 B1

Revendicare

1

Tulpină de ciupercă entomopatogenă aparținând genului *Beauveria brongniartii*, **caracterizată prin aceea că** este depozitată în Colecția Națională de Microorganisme pentru Industrie și Agricultură, NCAIM, din Budapesta, Ungaria, cu numărul de acces (P) F 001385, și este patogenă față de cărbușul de mai *Melolontha melolontha*, insectă dăunătoare pepinierelor și plantațiilor silvice tinere.

3

5

7

(51) Int.Cl.

A01N 63/04 (2006.01);

A01N 63/00 (2006.01);

C12N 1/14 (2006.01)



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 765/2014