



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2011 01332

(22) Data de depozit: 07.12.2011

(41) Data publicării cererii:
30.07.2013 BOPI nr. 7/2013

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
TEHNOLOGII CRIOGENICE ȘI IZOTOPICE
- ICSI RÂMNICU VÂLCEA, STR.UZINEI
NR.4, RÂURENI, VL, RO

(72) Inventatori:
• ȘTEFĂNESCU IOAN,
BD. NICOLAE BĂLCESCU NR. 4,
RÂMNICU VÂLCEA, VL, RO;
• BUTNARU GALLIA,
STR. L.VAN BEETHOVEN NR. 4, AP. 10,
TIMIȘOARA, TM, RO;

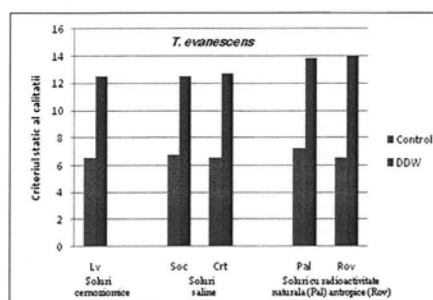
• ARDELEAN AUREL,
SPLAIUL TOTH SANDER NR. 6/B, ARAD,
AR, RO;
• GAVRILITA LIDIA,
STR. NICOLAE COSTIN NR. 63/2, AP. 145,
CHIȘINĂU, MD, MD;
• MLADIN CRISTIAN,
STR. DR. ION GHIULAMILA NR. 6,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• TITESCU GHEORGHE,
STR. MATEI BASARAB NR. 20 BL. 116
SC. C AP. 1, RÂMNICU VÂLCEA, VL, RO

(54) PROCEDU DE ÎNMULȚIRE A ENTOMOFAGULUI
TRICHOGRAMMA SPP.

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la un procedeu de înmulțire *ex situ* a entomofagului *Trichogramma spp.*, cu utilizare în agricultură, pentru protecția biologică a plantelor. Procedeu se realizează în etape, și anume, mai întâi se colectează ouăle gazdei *Sitotroga cerealella O.*, depuse la intervalul de 20...26 h, ouăle sunt pretratate timp de 5 min cu apă sărăcită în deuteriu, și pe acest mediu are loc înmulțirea în masă a oofagului *Trichogramma spp.* la 23...25°C și umiditate relativă de 75...85%, după care se face determinarea indicilor biologici ai populației de *Trichogramma spp.*, cum ar fi prolificitatea, procentul global de ecloziune și procentul de femele eclozate. Temperatura de incubație și de creștere a *Trichogrammei spp.* asigură indici biologici superiori ai indivizilor eclozați.

Revendicări: 1
Figuri: 1



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).



Procedeu de înmulțire a entomofagului *Trichogramma spp.*

Invenția se referă la un procedeu de înmulțire a entomofagului *Trichogramma spp.* cu utilizare în agricultura pentru protecția biologică a plantelor.

Se cunoaște un procedeu de înmulțire în masă a *Trichogramma spp.* pe ouă proaspete de molia cerealieră *Sitotroga cerealella O.* în vârstă de 24-28 ore, la temperatura de 23-25°C și umiditatea relativă a aerului de 75-85% (1). Deasemenea, este cunoscut un alt procedeu de înmulțire a entomofagului *Trichogramma spp.* care include înmulțirea lui pe oua de molie cerealiera *Sitotroga cerealella O.* la temperatura de 23...25 °C și umiditatea relativă a aerului de 75-85% folosind pentru înmulțire oua în varsta de 20...26 de ore, prelucrate preliminar cu fluide magnetice Fe₃O₄ sau γ-Fe₂O₄, având doza de 10...200 μL/L (MD 1974 G2 2002.08.31). Dezavantajul acestor procedee constă în faptul că în condiții de laborator *ex situ* înmulțirea de durată, câteva generații succesive (peste șase), duce la scăderea eficienței de parazitare a oofagului, având loc diminuarea indicilor biologici (prolificitatea, proporția femelelor din populație, capacitatea de eclozare) și de migrație/motilitate a oofagului în condiții de câmp.

Prezenta invenție rezolvă problemele legate de înmulțirea *ex situ* pe ouăle gazdei *Sitotroga cerealella O.* cum sunt sporirea numărului de indivizi din populațiile de *Trichogramma*, amplificarea parametrilor biologici și de calitate ai oofagului, ceea ce contribuie la eficientizarea combaterii biologice a lepidopterelor din horticultură și agricultură, în principal combaterea sfredelitorului porumbului - *Ostrinia nubilalis* HB. Invenția se bazează pe capacitatea apei sărăcită în deuteriu DDW de a spori parametrii biologici ai oofagului în cazul în care creșterea în masă are loc pe ouă de *Sitotroga cerealella O.* pretratate cu DDW. Procedeu utilizază ouă proaspete de molia cerealelor, depuse într-un interval de la 20 la 26 ore, care sunt pretratate cu apă sărăcită în deuteriu DDW timp de 5 minute. Înmulțirea în masă a oofagului *Trichogramma spp.* are loc la temperatura de 23-25°C și la umiditatea relativă a aerului de 75-85%. În aceste condiții calitatea oofagului (indicii biologici) este mult îmbunătățită, iar cu cheltuieli de obținere sunt diminuate cu 54,9%.

Se da în continuare un exemplu de realizarea a procedeuului de înmulțire a entomofagului *Trichogramma spp.* cu referire la tabelele 1-3 și figura 1, în care sunt prezentați indicii biologici ai ecotipurilor de *Trichogramma spp.* înmulțite pe ouă de molia cerealelor prin aplicarea procedeuului.

Invenția constă în înmulțirea entomofagului *Trichogramma spp.* pe ouă de molie cerealelor pretratate cu apă sărăcită în deuteriu (DDW) în etapa de înmulțire în masă, utilizând ouă proaspete de molia cerealelor (depuse la intervalul de 20-26 ore) pretratate cu apă sărăcită în deuteriu (DDW) timp de 5 minute. Înmulțirea în masă a oofagului *Trichogramma spp.* Are loc la temperatura de 23-25°C și la o umiditate relativă a aerului de 75-85%.

Intr-o prima etapă sunt colectate ouăle de gazdă *Sitotroga cerealella O.*, în vârstă de 20-26 ore. În a doua etapă se efectuează pretratarea ouălor de *Sitotroga* cu apă sărăcită în deuteriu DDW timp de 5 minute. În a treia etapă este pregătită specia de *Trichogramma* pentru parazitarea ouălor gazdă. În a patra etapă are loc înmulțirea în masă a formei de *Trichogramma* pe ouă de molia cerealelor pretratate cu apă sărăcită în deuteriu DDW. În a cincea etapă sunt determinați indicii biologici ai populației de *Trichogramma* precum prolificitatea (ouă/femelă), procentul ecloziune a indivizilor (femele și masculi) și procentul de femele eclozate. Temperatura de incubație și de creștere a *Trichogrammei* în ouă pretratate cu DDW trebuie să fie de 24-25°C cu o umiditate relativă a aerului de 80-85%.

Rezultatele au la baza două experiențe în care materialul biologic utilizat a fost de origine diferită, România și R. Moldova și demonstrează superioritatea indicilor biologici în cazul în care procedeu propus este utilizat.

La ecotipurile de *Trichogramma evanescens* din România și R. Moldova care s-au dezvoltat pe ouă de molia cerealelor pretratate cu apă sărăcită în deuteriu DDW, capacitatea de eclozare (α_1) a fost superioară cu 11,4%, respectiv 10,0%, proporția dintre sexe de 1:1 (α_2 ; femele : masculi) a fost modificată în favoarea femelelor (21,2% respectiv 10,9%), indicii biologici esențiali au fost superiori comparativ cu populațiile obținute prin tehnologia clasică (ouă care nu au fost pretratate cu DDW). Efectul se



Trichogramma
Aur
celule

datorează stimulării proceselor biologice, potențării tuturor funcțiilor organismului - vitalitatea crescută a organismelor tratate și schimbări fizico-chimice la nivelul membranelor.

Tabelul 1. Date comparative privind indicii biologici ai ecotipurilor de *Trichogramma spp.* din România înmulțită pe ouă de *Sitotroga cerealella* O. netratate și pretratate cu apă sărăcită în deuteriu DDW

Specii de <i>Trichogramma</i> , ecotip	Modul de prelucrare a ouălor de <i>Sitotroga cerealella</i>	Prolificitatea ouă/1femelă (P ₁)	Ecloziunea indivizilor (α ₁), %	Ecloziunea femelelor (α ₂), %	Criteriul static al calității (Y ₁)
<i>T. evanescens</i> , ecotipul Rovinari	ne tratate (control - C)	18,0±0,6	79,0±2,1	52±1,2	7,3±0,4
	pretratate cu DDW	26,0±1,0	88,0±2,5	63±1,4	14,4±1,0
	Diferenta % față de C	+44,4%	+11,4	+21,2	+97,3
<i>T. pintoi</i> , ecotipul Rovinari	ne tratate (control - C)	20,0±1,0	72,0±2,0	51±1,1	7,4±0,3
	pretratate cu DDW	29,0±1,5	80,0±2,4	55±1,0	12,7±1,1
	Diferenta % față de C	+45,0	+11,1	+7,8	+71,6

Tabelul 2. Date comparative privind indicii biologici ai *Trichogramma spp.*, ecotipuri din R. Moldova înmulțite pe ouă de *Sitotroga cerealella* O. netratate și pretratate cu apă sărăcită în deuteriu DDW

Specii de <i>Trichogramma</i> , ecotip	Modul de prelucrare a ouălor de <i>Sitotroga cerealella</i>	Prolificitatea ouă/1femelă (P ₁)	Ecloziunea indivizilor (α ₁), %	Ecloziunea femelelor (α ₂), %	Criteriul static al calității (Y ₁)
<i>T. evanescens</i> ecotipul Chișinău	ne tratate (control - C)	19,5±1,2	80,0±2,1	55±1,2	8,5±0,2
	pretratate cu DDW	29,3±1,7	88,0±2,6	61±1,7	15,7±0,6
	Diferenta % față de C	+50,3	+10,0	+10,9	+84,7
<i>T. pintoi</i> ecotipul Chișinău	ne tratate (control - C)	19,6±1,1	82,0±2,2	58±1,6	9,3±0,3
	pretratate cu DDW	30,5±1,9	88,0±2,8	62±1,3	16,6±0,7
	Diferenta % față de C	+55,6	+7,3	+6,9	+78,5

Tabelul 3. Capacitatea de migrare în câmp a indivizilor *Trichogramma evanescens* W. determinată prin evaluarea procentului de ouă de *Sitotroga cerealella* parazitare (cultura porumbului, Timișoara, 2010)

Nr. crt	<i>T. evanescens</i> ecotipul de:	Proveniența adulților lansați în câmp	Distanța (m) de la punctul de lansare				
			3m	6m	9m	12m	X _{3-12m}
			x ± sx	x ± sx	x ± sx	x ± sx	x ± sx
1	Timișoara	Control	56,89±1,44	49,22±1,86	29,33±1,93	12,56±1,93	37,00±8,66
2		DDW	68,33±2,50	61,89±2,09	42,11±1,53	20,22±3,01	48,14±9,40
Diferența DDW - Control			+11,44±3,94	+12,67±3,95	+12,78±3,46	+7,66±4,94	+11,14±1,04
Gradul de acoperire%			20,1	25,7	43,6	61,0	30,1
3	Rovinari	Control	53,00±1,32	43,22±1,38	30,11±1,49	11,00±0,44	34,33±7,86
4		DDW	77,22±1,39	66,56±0,80	39,56±1,12	19,33±0,63	50,67±11,36
Diferența DDW - Control			+24,22±2,71	+23,34±2,18	+9,45±2,61	+8,33±1,07	+16,34±3,73
Gradul de acoperire%			45,7	54,0	31,4	75,7	47,6

Indicii biologici relevați de indivizii de *Trichogramma evanescens* W. și *T. pintoi* V. creșcuți pe ouă de molia cerealelor tratate cu apă sărăcită în deuteriu DDW sunt superiori față de cei obținuți în varianta control (C - indivizii oofagului obținuți din ouă de *Sitotroga cerealella* netratate cu DDW).

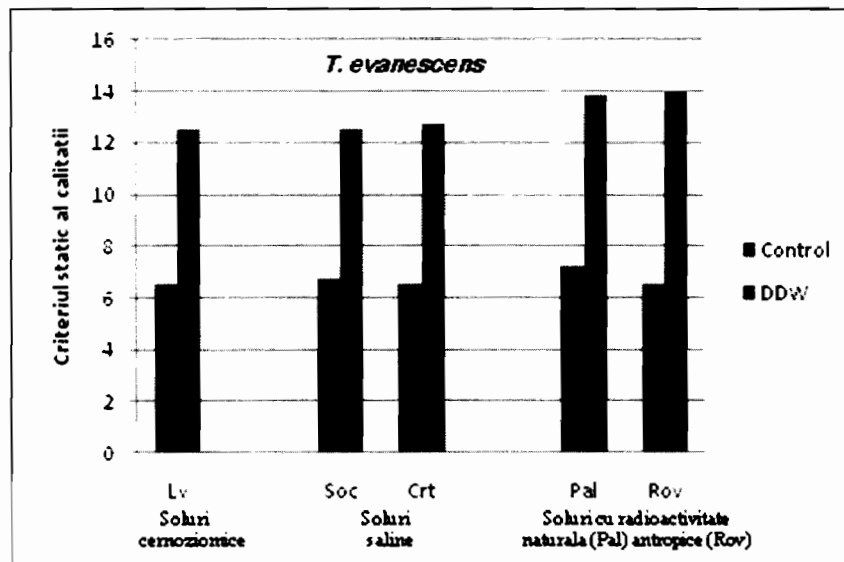
În cazul speciilor *T. evanescens* W. și *T. pintoi* V populații originare în România, ecosistemul Rovinari, prolificitatea (P₁) a crescut de 1,44 respectiv 1,45 ori; ecloziunea indivizilor (femele și masculi; α₁) s-a diferențiat cu +11,4% respectiv +11,1%; ecloziunea femelelor (α₂) s-a îmbunătățit cu +21,2% respectiv +7,8% și criteriul static al calității (Y₁) a fost cu +97,3% respectiv +71,6% mai mare comparativ cu cel calculat la indivizii din varianta control, la trei indicatori de calitate, fiind superiori matorului de 1,71 - 1,97 ori.

Rezultate asemănătoare au fost obținute și în cazul ecotipurilor din R. Moldova, Chișinău, la speciile *T. evanescens* W. și *T. pintoi* V. Astfel prolificitatea (P₁) este mai ridicată de 1,50 respectiv 1,55 ori, ecloziunea indivizilor (femele și masculi; α₁) a fost îmbunătățită cu +10,0% respectiv +7,3%; iar în populația eclozată numărul femelelor (α₂), a crescut cu +10,9% și respectiv cu +6,9% și în final valorile „criteriului static al calității” (Y₁) s-a diferențiat față de control cu +84,7% și respectiv 78,5%.



Handwritten signatures and initials, including 'A. M. ...' and 'P. ...'.

Figura 1. "Criteriului static al calității" (Y_1), al liniilor de *T. evanescens* - porumb colectate în 2009 din cinci ecosisteme diferite a căror ciclu de viață a avut loc în ouă de molia cerealelor prelucrate cu DDW (timp de 3 generații)



La ambele ecotipuri, de Timișoara și de Rovinari, indivizii de *T. evanescens* W eclozați din ouă de *Sitotroga cerealella* O. pretratate cu DDW au avut o motilitate mai bună acoperind o arie cultivată cu porumb mai mare cu 30,1% respectiv cu 47,6%.

Rezultatul invenției constă în aceea că populațiile de *T. evanescens* W. și *T. pintoii* V. provenite atât din România cât și din Republica Moldova au evoluat și au crescut în ouă proaspete de *Sitotroga cerealella* cu vârsta de 20-26 ore pretratate cu apă sărăcită în deuteriu (DDW) timp de 5 minute.

Apa sărăcită în deuteriu influențează pozitiv atât indicii biologici ai entomofagului *Trichogramma spp.* dar cele mai semnificative îmbunătățiri au fost stabilite prin calculul criteriului static al calității (Y_1) și la evaluarea motilității în câmp a indivizilor.

Îmbunătățirea criteriului static al calității (Y_1) asigură randament superior în valorificarea ouălelor de molia cerealelor cu 15-20%.

Motilitatea în câmp evidențiază capacitatea de a controla ponta lepidopterelor pe o arie mai mare, ceea ce se exprimă în lansarea unui număr mai mic de indivizi la unitatea de suprafață.

Referințe bibliografice

1. Așașchin A., Grinberg A. Îndrumător pentru înmulțirea în masă și aplicarea *Trichogramma*, M., 1979; p. 35-45.
2. Brevet MD 1974 G2 2002.08.31



Handwritten signatures and initials, including 'M. J. Pellerin', 'A. Cur', and 'C. J. Pellerin'.

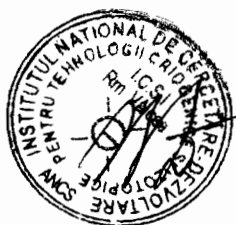
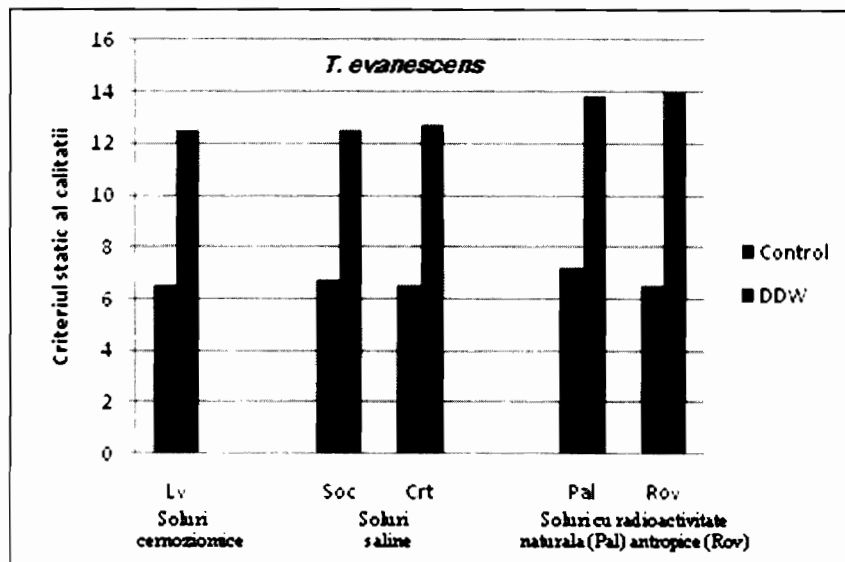
Revendicare

1. Procedeu de înmulțire a entomofagului *Trichogramma spp.* caracterizat prin aceea ca se realizeaza printr-o înmulțire a entomofagului pe ouă de molia cerealelor (*Sitotroga cerealella O.*), cu vârsta de 20-26 ore, pretratate timp de 5 minute cu apa saracita in deuteriu DDW, la o temperatura de 23-25°C și o umiditatea relativă a aerului de 75-85%.



Handwritten signatures and text:
Mullerbach
Aur
efelley
[Signature]

Figura 1.



Handwritten signatures and notes:
Iulian
A. ...
cefulley