



(12)

## CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2021 00187**

(22) Data de depozit: **21/04/2021**

(41) Data publicării cererii:  
**28/10/2022** BOPI nr. **10/2022**

(71) Solicitant:

- **INSTITUTUL DE CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU PROTECȚIA PLANTELOR, BD. ION IONESCU DE LA BRAD NR. 8, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU MAȘINI ȘI INSTALAȚII DESTINATE AGRICULTURII ȘI INDUSTRIEI ALIMENTARE, INMA, BD. ION IONESCU DE LA BRAD NR.6, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **STAȚIUNEA DE CERCETARE-DEZVOLTARE AGRICOLĂ TURDA, STR.AGRICULTURII NR.27, TURDA, CJ, RO;**
- **UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRONOMICE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ DIN BUCUREȘTI, BD.MĂRĂȘTI NR.59, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **STAȚIUNEA DE CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU LEGUMICULTURĂ BUZĂU, STR. MESTEACĂNULUI NR. 23, BUZĂU, BZ, RO;**
- **UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE**

**ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ DIN CLUJ-NAPOCA, CALEA MĂNĂȘTUR NR.3-5, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO**

(72) Inventatori:

- **FĂTU ANA-CRISTINA, STR. HĂȚIȘULUI NR. 5, BL. H12, SC. 1, ET. 1, AP. 5, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **DINU MIHAELA MONICA, STR.ION IONESCU DE LA BRAD, NR.8, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **MARIN EUGEN, STR.SOMEȘUL RECE, NR.79, AP.1, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **MUREȘANU FELICIA, STR. SCĂRIȘOAREI, NR.4, TURDA, CJ, RO;**
- **CICEOI ROXANA, STR.1 DECEMBRIE 1918, NR.1, SAT ROȘU, COMUNA CHIAJNA, IF, RO;**
- **BURNICHI FLOAREA, CARTIER DOROBANȚI, BL.26/6, AP.2, BUZĂU, BZ, RO;**
- **IACOMI BEATRICE MICHAELA, STR.VALEA LUI MIHAI, NR.4, BL.A4, SC.C, AP.37, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **TULPINĂ DE METARHIZIUM ANISOPLIAE, PATOGENĂ PENTRU CĂRĂBUȘUL DE STEPĂ, ANOXIA VILLOSA**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la utilizarea unei tulpini de ciuperci entomopatogene din genul *Metarhizium*, pentru combaterea biologică a populațiilor autohtone de cărăbuși de stepă, *Anoxia villosa*, insectă dăunătoare plantațiilor, pepinierelor silvice, pomicole și culturilor agricole. Utilizarea constă în folosirea acestei tulpini de *Metarhizium Anisopliae*, ca sursă autohtonă de material biologic pentru obținerea de bioinsecticide (sau ca agent de control biologic al larvelor cărăbușilor de stepă). Această tulpină are însușiri ecologice necesare colonizării habitatului în care este lansată (culturi

forestiere din România) precum și potențialul biologic de reglare naturală a densității populațiilor locale de *Anoxia sp.* Tulpina de *Metarhizium anisopliae*, denumită MaAn 1/2013, este depozitată în Colecția Națională de Microorganisme pentru Industrie și Agricultură, NCAIM, Budapesta, cu numărul de accesare (P) F 001481.

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).



TULPINĂ DE *METARHIZIUM ANISOPLIAE*, PATOGENĂ PENTRU CĂRĂBUȘUL DE STEPĂ,  
*ANOXIA VILLOSA*

### Descrierea invenției

Invenția se referă la o tulpină de *Metarhizium anisopliae*, patogenă pentru cărăbușul de stepă, izolată în România, dintr-un focar epizootic natural.

*Metarhizium anisopliae* e este una dintre cele mai importante ciuperci entomopatogene utilizate împotriva multor insecte dăunătoare. Actualii dăunători țintă sunt termitele, lăcustele și gândacii de bucătărie, unele cicade și alte hemiptere, noctuidele și alte insecte dăunătoare edafice, cum ar fi diferite specii de carabide și curculionide, dăunătorii de seră cum ar fi musculița albă sau tripsii, țânțarii și chiar căpușele (Zimmermann G., 2007, **Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae***, *Biocontrol Science and Technology*, **17:9, 879-920**).

Larvele de cărăbuși sau viermii albi (Coleoptera: Scarabaeidae) reprezintă stadiile imature de dezvoltare ale cărăbușilor în care aceștia sunt cei mai păgubitori. Dintre dăunătorii de rădăcină, speciile de cărăbuși sunt în prezent principalii factori biotici de stres în pepiniere și plantații silvice tinere. Larvele se hrănesc cu rădăcinile diferitelor plante ierboase și lemnoase. Atacul apare sub formă de vetre și începe primăvara, din luna mai și continuă până în toamnă. Roaderea sistemului radicular poate duce, în funcție de densitatea larvelor, la pieirea plantelor sau debilitarea lor și, respectiv, la reducerea recoltei. *Anoxia villosa* (cărăbușul de stepă) reprezintă unul dintre cei mai importanți dăunători din fondul forestier. Provoacă, de asemenea, pagube mari și în culturile agricole (porumb, grâu, orz, ovăz) și horticole (plantații tinere de pomi) și viticole.

În prezent, pentru combaterea acestor dăunători sunt utilizate insecticidele chimice. Chiar dacă oferă un control preventiv eficient și curativ timpuriu împotriva stadiilor larvare, aplicarea lor afectează negativ parazitoizii himenopteri ai gândacilor. Mai mult, neonicotinoidele sunt în general amestecate cu piretroizi care au un spectru activ extrem de larg, rezultând efecte negative asupra dușmanilor naturali ai insectelor [Gyawaly S, Koppenhöfer A, Wu S, et al. Biology, ecology, and management of masked chafer (Coleoptera: Scarabaeidae) grubs in turfgrass. *J Integr Pest Manag.* 2016;7:3]. În plus, acele pesticide chimice persistă în mediu contaminând solul, zonele umede, apele subterane, plantele nevizate și prada vertebratelor, și nu în ultimul rând, hrana oamenilor (Cimino AM, Boyles AL, Thayer KA, et al. Effects of neonicotinoid pesticide exposure on human health: a systematic review. *Environ Health Perspect.* 2017;125:155–1; Wood TJ, Goulson D. The environmental risks of neonicotinoid pesticides: a review of the evidence post 2013. *Environ Sci Pollut Res.* 2017;24:17285–17325).

Utilizarea patogenilor insectelor depășește multe probleme apărute prin folosirea pesticidelor chimice, de aceea metodele de combatere biologică au devenit apreciable în controlul dăunătorilor cu importanță economică. Organismele care au fost studiate ca fiind potențiali agenți biologici de control ai viermilor albi includ virusurile, nematozii, protozoarele, bacteriile și fungii. Fungi ca *Metharizium* și *Beauveria* au fost și sunt utilizați cu succes ca biopesticide.

Soluții brevetate în domeniul prezentei invenții: brevetul **CN102776130B** (2012) se referă la un compus pe bază de spori de *Metarhizium anisopliae* pentru controlul sfredelitorului trestiei de zahăr (*Diatraea saccharalis*), gândacului frunzelor de palmier (*Brontispa longissima*), lacustei

călătoare asiatice (*Locusta migratoria asiatica*), ploșniței plantelor de litchi (*Tessaratoma papillosa*); brevetul **US10563272B2** (2015) se referă la utilizarea unei tulpini de *Metarhizium*, în combaterea dăunătorilor culturilor de bumbac; brevetul **CN107836465B** (2017) descrie un amestec de spori fungici de *Metarhizium*, lichior de fermentație al acestui fung și hydrametilnon cu efect insecticid pentru gândacul de bucătărie german; brevetul **CN109337823B** (2018) se referă la utilizarea unei tulpini de *Metarhizium*, în combaterea lăcustelor asiatice. De asemenea, este cunoscut brevetul **US7416880B2** (2018) în care un biopesticid care are în compoziție o tulpină de *Metarhizium* este utilizat împotriva larvelor de *Adoretus tenuinaculatu*.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în faptul că tulpina MaAn 1/2013, o tulpină autohtonă de *Metarhizium anisopliae*, poate asigura sursa de material biologic pentru obținerea de insecticide cu acțiune biologică specifică și strict adaptată condițiilor pedo-climatice caracteristice ecosistemelor forestiere și agricole din România. Tulpina MaAn 1/2013 este singurul agent de control biologic al cărbușului de stepă care răspunde unui principiu de bază al combaterii biologice, acela privind necesitatea ca un agent de control biologic vizat pentru 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 MaAn 1/2013, având ca habitat de origine o plantație de plop și salcie, iar ca insectă gazdă larva de *Anoxia*, asigură eficiența economică și ecologică a tratamentelor de protecție biologică a culturilor forestiere față de atacul cărbușului de stepă. Având în vedere originea ei, tulpina MaAn 1/2013 are însușirile ecologice necesare colonizării habitatului în care este lansată (culturi forestiere din România), precum și potentialul biologic de reglare naturală a densității populațiilor locale de *Anoxia* sp.

Dezavantajul utilizării unei tulpini străine de *M.anisopliae* pentru combaterea populațiilor autohtone de cărbuși de stepă sunt legate de eficacitatea extrem de scăzută a acesteia, din cauza lipsei (i) specificității de gazdă a acestei tulpini față de populațiile locale de dăunători, precum și (ii) a însușirilor bioecologice care să îi confere capacitatea de adaptare la condițiile staționare specifice habitatelor agricole și silvice din România. Eficiența economică și ecologică a tratamentelor biologice cu fungi entomopatogeni rezidă din capacitatea acestora de a coloniza habitatul în care sunt inoculate în cantități mici. Din acest motiv, utilizarea unor tulpini fungice străine este inefficientă, în plan economic determinând creșterea prețului de cost al intervențiilor fitosanitare, iar în plan ecologic, neavând capacitate de reglare a echilibrului biocenotic dintre patogen și gazdă, principiu de bază al controlului biologic.

Tulpina de ciupercă entomopatogenă *Metarhizium anisopliae*, (numită în continuare MaAn 1/2013) conform invenției este depozitată în Colecția Națională de Microorganisme pentru Industrie și Agricultură, NCAIM, Budapesta, cu numărul de accesare (P) F 001481 și este patogenă față de cărbușul de stepă, *Anoxia villosa*, insectă dăunătoare pepinierelor, plantațiilor silvice tinere și culturilor agricole.

În continuare se prezintă exemple de realizare a invenției:

#### **Exemplul 1. Izolarea și caracterizarea tulpinii de *M.anisopliae***

Tulpina a fost izolată direct de pe larvă micozată de *A. villosa*, sub vizualizare stereomicroscopică.

Coloniile fungice au fost însămânțate pe mediu de cultură 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 o cultură fungică sporulată; cantități mici de conidii au fost prelevate de pe mediul agarizat și suspendate în apă distilată sterilă și Tween 80 (0,01%), apoi însămânțate în striuri paralele, în cutii Petri. După incubare 48 de ore, la  $25^{\circ}\text{C}$ , coloniile fungice au fost localizate și transferate în eprubete.

Caracterizarea macroscopică a tulpinii MaAn 1/2013 s-a făcut pe mediu de cultură CGA (extract de cartof 4g/l, glucoza 20 g/l, agar 15g/l), pH final  $5.6\pm 0.2$ , după 6 zile de incubare la  $27^{\circ}\text{C}$ ; pe mediu agarizat, MaAn 1/2013 se prezintă sub forma unor colonii lănoase, de culoare albă, iar pe măsură ce se formează spori, culoarea coloniei se transformă în verde închis; pe mediul CGA reversul coloniei este alb; nu are miros, nu se formează exudat.

Pentru caracterizarea microscopică, din colonia sporulată s-au făcut preparate microscopice; s-au evidențiat hife hialine, septate, cu contur regulat, purtând celule conidiogene (fialide) din care se formează conidii unicelulare înlanțuite, compactate în coloane, predominant cilindrice, cu capete rotunjite, hidrofobe, mici ( $5.14-8.24 \times 2.56-3.53 \mu\text{m}$ ).

**Exemplul 2.** *Obținerea suspensiei conidiene de MaAn 1/2013 în vederea testării potențialului insecticid*

Tulpina MaAn 1/2013 a fost testată, în condiții de laborator, în felul următor: o cultură proaspătă de MaAn 1/2013, pe mediu solid înclinat CGA a fost spălată cu 25 ml de apă distilată sterilă și Tween 80 (0,01%). Suspensia a fost omogenizată prin ultrasonare timp de 5 minute la 40 KHz iar apoi diluată, în vederea numărării sporilor cu ajutorul lamei Burkner.

**Exemplul 3.** *Testarea viabilității conidiilor de MaAn 1/2013 în vederea testării potențialului insecticid*

Suspensia de spori preparată ca în exemplul 2, a fost ajustată la un titru de  $1 \times 10^6$  spori/ml prin diluare cu apă distilată sterilă în care a fost adăugat Tween 80 (0,01 %).

Testele de germinare s-au efectuat utilizând lame de microscop dezinfectate în prealabil cu etanol. După marcarea a trei arii pe reversul lamei, aceasta a fost așezată într-o cutie Petri prevăzută cu hârtie de filtru umectată. Pe suprafața fiecărei lame microscopice s-au distribuit câte 3-4 ml de mediu agarizat iar pe fiecare arie delimitată s-au însămânțat câte 0.05 ml de suspensie conidiană. După 18 de ore de incubare la  $27^{\circ}\text{C}$ , procesul de germinare s-a stopat prin picurarea unei soluții de lactofenol cu albastru metilen (glicerol 40%, fenol 20%, acid lactic 20%, albastru metil 0.05% și apă) pe fiecare arie delimitată. Conidiile au fost considerate germinate atunci când lungimea tubului germinativ a depășit de 1-1,5 ori lățimea lor. În trei câmpuri microscopice s-au notat 200 de conidii germinate și negerminate pentru a calcula procentul de germinare. Datele s-au utilizat pentru calcularea procentului de germinare.

**Exemplul 4.** *Testarea potențialului insecticid al tulpinii MaAn 1/2013 în condiții de laborator*

Testele de laborator au fost efectuate pe larve de *Anoxia villosa*. Acestea au fost colectate din pepiniere de plop și salcie infestate puternic. Larvele au fost colectate individual în recipiente de plastic cu capac, umplute  $\frac{3}{4}$  cu substrat universal autoclavat. Determinarea la nivel de gen a speciei de cărăbuși s-a făcut în stadiul de larvă, analizând forma orificiului anal și dispunerea ghimpișorilor și perișorilor de pe partea ventrală a ultimului inel abdominal; determinarea vârstei larvare s-a făcut prin măsurarea capsulei cefalice (Simionescu și Mihalache, 2000). Pentru determinarea la nivel de specie,

s-au utilizat cheile de determinare după S. Panin (1955), după ce 5 larve au fost lăsate să ajungă la stadiul de adult. Larvele utilizate în experiment au fost cele care au supraviețuit unei perioade de carantină în laborator, timp de 30 de zile, la 15°C.

Testarea insectelor s-a făcut prin scufundare în 100 de ml de suspensie conidiană preparată ca în exemplul 2, cu titrul de  $1 \times 10^7$  conidii/ml, timp de 10 secunde după care au fost transferate individual în tuburi transparente, ventilate, din polipropilenă (7cm înălțime și 4cm Ø), conținând fiecare câte 60 ml de substrat universal autoclavat (turbă, humus și substanțe nutritive pentru plante). În fiecare tub au fost adăugate bucăți mici de morcovi pentru hrănirea larvelor. Pentru varianta martor, larvele au fost tratate cu apă distilată sterilă și Tween 80 (0,01%). Tuburile au fost incubate la  $20 \pm 2^\circ$  C, în întuneric complet. Mortalitatea a fost înregistrată săptămânal timp de 60 de zile prin răsturnarea întregului conținut al fiecărui tub pe substraturi sterile, de unică folosință. Larvele moarte au fost îndepărtate și plasate în camere umede pentru a încuraja dezvoltarea micozei. Larvele vii au fost returnate în tuburi și evaluate în săptămâna următoare. Datele de mortalitate ale larvelor tratate fungic au fost analizate folosind curbele de supraviețuire Kaplan Meier, iar testul log-rank a fost aplicat pragului de semnificație  $p < 0,05$  în GraphPadPrism versiunea 5.00 pentru Windows (GraphPad Software, San Diego California SUA). Indivizii care au supraviețuit până la sfârșitul perioadei de observație au fost considerați cenzurați.

Rezultatele au arătat ca mortalitatea larvelor tratate a fost datorată îmbolnăvirii cu tulpina *MaAn 1/2013* într-un procent de 66%, după 59 de zile de incubare la o temperatură de  $20 \pm 2^\circ$  C (figura 1). În cazul larvelor din varianta martor, nu au fost înregistrate mortalități. Compararea curbelor de mortalitate dintre cele două variante de tratament au indicat o diferență semnificativă între cele două tratamente ( $p=0,0032$ ). Perioada medie de supraviețuire a larvelor de *A. villosa* de vârsta a treia tratate cu *M. anisopliae*, tulpina *MaAn 1/2013* a fost de 48 de zile.

**Revendicare**

Tulpină de ciupercă entomopatogenă aparținând genului *Metarhizium anisopliae* caracterizată prin aceea că este depozitată în Colecția Națională de Microorganisme pentru Industrie și Agricultură, **NCAIM, Budapesta, cu numărul de accesare (P) F 001481** și este patogenă față de **cărăbușul de stepă, *Anoxia villosa***, insectă dăunătoare **pepinierelor, plantațiilor silvice, pomicole și culturilor agricole.**

