

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045136**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.10.30

(21) Номер заявки
202390903

(22) Дата подачи заявки
2021.08.16

(51) Int. Cl. *A01N 63/30* (2020.01)
C12N 1/14 (2006.01)
C12R 1/645 (2006.01)

(54) **ШТАММ ЭНТОМОПАТОГЕННОГО ГРИБА BEAUVERIA BASSIANA ДЛЯ ЗАЩИТЫ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ ОТ НАСЕКОМЫХ И КЛЕЩЕЙ – ВРЕДИТЕЛЕЙ РАСТЕНИЙ**

(31) **2020131207**

(32) **2020.09.21**

(33) **RU**

(43) **2023.05.25**

(86) **PCT/RU2021/050263**

(87) **WO 2022/060252 2022.03.24**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "ОРГАНИК
ПАРК" (RU)**

(72) Изобретатель:

**Егоршина Анна Александровна,
Лукьянцев Михаил Александрович,
Назаренко Дарья Юрьевна (RU)**

(74) Представитель:

Гильманов Э.И. (RU)

(56) **RU-C1-2704859**

RU-C1-2311778

SARANRAJ P. et.al. Agrobeneficial entomopathogenic fungi-*Beauveria bassiana*: a review. Indo-Asian Journal of Multidisciplinary Reseach (IAJMR), 2017, 3 (2), p. 1051-1087 DOI: 10.22192/iajmr.2017.3.2.4

RU-C1-2103873

(57) Изобретение относится к сельскохозяйственной микробиологии и биотехнологии. Штамм энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana* 17HA депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов под номером ВКПМ F-1526. Штамм энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana* ВКПМ F-1526 может быть использован для создания микробиологического инсектицида с широким спектром действия, и пригодного для обработки различных сельскохозяйственных культур. Изобретение позволяет повысить урожайность сельскохозяйственных растений.

B1

045136

045136

B1

Область техники

Изобретение относится к сельскохозяйственной микробиологии и биотехнологии, касается биологических средств для защиты сельскохозяйственных растений от насекомых и клещей - вредителей и представляет собой штамм энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana* 17НА, депонированный в Национальном биоресурсном центре Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов (БРЦ ВКПМ) НИЦ "Курчатовский институт" - ГосНИИгенетика (адрес: 117545 Россия, Москва 1-й Дорожный проезд, д. 1) под регистрационным номером ВКПМ F-1526, дата депонирования: 19.08.2020.

Использование энтомопатогенных микроорганизмов для борьбы с насекомыми-вредителями сельскохозяйственных растений представляется перспективной альтернативой химическим инсектицидам. В этом аспекте микроскопические грибы, по сравнению с бактериями и вирусами, интересны, главным образом по двум причинам: 1) отсутствие узкой специализации по отношению к насекомым-мишеням у большинства штаммов; 2) для запуска инфекционного процесса достаточно попадания споры гриба на наружные покровы насекомого. На первом этапе инфекционного процесса конидия гриба адгезируется на кутикулу насекомого посредством неспецифических гидрофобных и электростатических взаимодействий. Затем конидия прорастает, формируя в большинстве случаев апрессорий, который разрывает кутикулу. Как только гриб дорастает до гемоцеля, его клетки приобретают дрожжеподобную форму (так называемые гифальные тельца), которые поэтапно поражают ткани хозяина, приводя в итоге к мумификации насекомого. Эти клетки также могут продуцировать вторичные метаболиты с иммуносупрессивной активностью, усиливающие развитие грибной инфекции. Мумифицированное насекомое является источником инфекции для других насекомых, что в ряде случаев может приводить к возникновению эпизоотии.

Предшествующий уровень техники

Среди энтомопатогенных грибов наиболее широкое применение в качестве основы микробиологических инсектицидов нашли представители родов *Beauveria* и *Metarhizium*.

Известен штамм *Beauveria bassiana* CL 67-13n (а.с. СССР 572163), полученный в результате направленного изменения вирулентности природного изолята, проявляющий высокую вирулентность против вредителей лесного хозяйства.

Известны штаммы *Beauveria bassiana* 113Н-278 (а.с. СССР 507645), полученный методом селекции на основе естественного моноспорового рассева после пассажа через колорадского жука, и *Beauveria bassiana* VILL 476-4С (а.с. СССР 982630), полученный путем ступенчатой селекции под действием нитрометилбиурета из штамма 113Н-278, обладающий более высокой продуктивностью и вирулентностью, предназначенные для использования в качестве продуцента препарата боверина для борьбы с колорадским жуком.

Известен штамм *Beauveria bassiana* ВКПМ Г-399 (а.с. СССР 1688820) для производства инсектицидного препарата боверина против насекомых-вредителей сельского и лесного хозяйства. Активность штамма выявлена против колорадского жука (личинка и имаго), зернового точильщика, амбарного долгоносика, рисового долгоносика, булавовидного хрущака.

Известен штамм *Beauveria bassiana* 70И (патент СССР 1795980) для получения энтомопатогенного препарата. Активность описана против тепличной белокрылки на огурце и личинок лиственничной мухи в лесной подстилке под кроной лиственницы.

Известен штамм *Beauveria bassiana* ЦК МК "Б" N ЦКМ F-54Ц, (патент РФ 2034469) для получения энтомопатогенного препарата, обладающий повышенной продуктивностью и терморезистентностью. Среди чувствительных к нему насекомых указаны трипс, оранжевая белокрылка и паутинный клещ.

Известен штамм *Beauveria bassiana* АТСС N 74040 (патент РФ 2103873) для получения энтомопатогенного препарата против хлопкового долгоносика, белянки сладкого картофеля и хлопкового слепняка.

Известен штамм *Beauveria bassiana* ВКМ F-3732 D (патент РФ 2172588) для получения энтомопатогенных препаратов, обладающий высокой продуктивностью в глубинной культуре. Штамм активен против личинок и кубышек саранчи.

Известен штамм *Beauveria bassiana* IC 1530-25-1 (патент РФ 2704859) для производства биопрепарата против колорадского жука, грибных патогенов и стимуляции роста картофеля в вегетационный период.

Известен штамм *Beauveria bassiana* СФ 127-13 (заявка РФ 2015109186), являющийся активным началом энтомопатогенного препарата.

Известна композиция для борьбы с личинками жуков-щелкунов (патент РФ 2311778), содержащая твердый носитель и микробиологический источник лизина, а также маточную культуру энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana* F-65 и янтарную кислоту. Известна микробная композиция для борьбы с личинками жуков-щелкунов (патент РФ 2311768), содержащая твердый носитель и микробиологический источник лизина, а также равнообъемную смесь маточных культур энтомопатогенных грибов *Beauveria bassiana* F-65 и *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* F-596 и янтарную кислоту.

Общим недостатком перечисленных изобретений является ограниченность или неопределенность спектра насекомых-вредителей, против которых эффективно применение указанных штаммов *Beauveria bassiana*. При этом известно, что широта спектра поражаемых насекомых относится к штаммоспецифич-

ным свойствам.

Раскрытие изобретения

Задачей заявленного изобретения является выделение нового природного энтомопатогенного штамма гриба, поражающего широкий спектр насекомых-вредителей, в том числе трипса пшеничного, белокрылку, хлопковую совку, зеленую цикадку, злаковых тлей, гороховую тлю, бахчевую тлю, картофельную тлю, капустную моль, луковую моль, картофельную моль, кукурузного мотылька, вредную черепашку, яблонную плодоядку, гроздевую листовертку, личинок колорадского жука, жука-щелкуна, хлебных пилильщиков и других насекомых-вредителей, а также паутиного клеща, и совместимого хотя бы с некоторыми химическими пестицидами, что позволило бы проводить совместные обработки без потери жизнеспособности биологического агента.

Эта задача решается благодаря выделению и использованию штамма *Beauveria bassiana* 17HA, депонированный в Национальном биоресурсном центре Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов (БРИЦ ВКПМ) НИЦ "Курчатовский институт" - ГосНИИГенетика (адрес: 117545 Россия, Москва 1-й Дорожный проезд, д. 1) под регистрационным номером ВКПМ F-1526, дата депонирования: 19.08.2020. Штамм был выделен из личинок колорадского жука третьего возраста. Видовая принадлежность культуры была определена на основании результатов секвенирования нуклеотидной последовательности ITS - D1/D2 рДНК, в ФГБУ "ГосНИИГенетика".

Заявленный штамм имеет следующие характеристики.

Культурально-морфологические и физиолого-биохимические признаки.

При температуре 25°C на картофельно-декстрозном агаре и среде Сабуро при расसेве суспензии конидий видимые невооруженным глазом колонии появляются на третьи сутки роста и имеют диаметр не более трех мм. Колонии растут достаточно медленно, достигая диаметра 38-42мм к 14 суткам роста. Колонии белого цвета, бархатистые, довольно плотные, прилегают к поверхности среды, мицелий врастает в агар на небольшую глубину; с возрастом колонии становятся мучнистыми. Колонии белого цвета независимо от возраста культуры, обратная сторона - желтоватая. Штамм не продуцирует растворимых пигментов; выделение экссудата также не характерно.

Штамм *Beauveria bassiana* 17HA имеет следующие микроморфологические признаки. Vegetативные гифы септированные, разветвленные, бесцветные, с гладкими стенками, 1-2 мкм шириной. Конидиеносцы одиночные, но собраны в плотные мутовки из 4-5 и более штук, с расширенным основанием и тонкой вытянутой вершиной с зигзагообразным недетерминированным рахисом, образуются латерально на воздушных гифах. Конидии бесцветные, несептированные, с тонкими гладкими стенками, имеют размер 2-3 мкм, форму, близкую к сферической, иногда со слабо заметной выемкой у основания. При поверхностном росте воздушные конидии агрегированы в сферические кластеры среди воздушного мицелия и имеют высокогидрофобную оболочку. При глубинном культивировании штамма происходит образование бластоспор, форма которых зависит от состава питательной среды и возраста культуры и может быть вытянутой (почти палочковидной), овальной, лимонovidной, округлой, подобной кофейным зернам.

Физиолого-биохимические признаки.

Штамм является аэробом, сапротрофом, при контакте с насекомыми - активным энтомопатогеном.

Для роста оптимальной является температура 28°C, при этом на питательных средах штамм может расти в диапазоне температур от +12 до +35°C. Оптимальные значения pH среды находятся в пределах 6,7 - 7,5, рост отмечается при значениях pH среды от 3,0 до 9,0.

В качестве источника углерода и энергии утилизирует глюкозу, фруктозу, сахарозу, мальтозу, гликоген, крахмал, глицерин, полисорбаты 20-80, природные жиры растительного и животного происхождения.

В качестве источника азота *Beauveria bassiana* 17HA может использовать соли аммония, нитраты, мочевины, органический азот в виде аминокислот и пептидов.

Вариант осуществления изобретения

Размножение микроорганизма может осуществляться несколькими способами. При поверхностном способе конидии и мицелий штамма *Beauveria bassiana* 17HA вносят на поверхность питательной среды в чашках Петри, микробиологических матрасах или в любой микробиологической посуде с большой площадью рабочей поверхностью, далее биомасса распределяется по поверхности среды шпателем Дригальского и сосуды инкубируются в термостате при 27°C.

При глубинном способе культивирования, конидии штамма прорастают и образуют мицелий в жидкой питательной среде в конических колбах Эрленмейера, либо в качалочных колбах, либо в ферментере. При культивировании конидий и мицелия штамма в колбах используют шейкеры инкубаторы. Колбы, наполненные питательной средой на 1/4-1/3 от своего объема, инокулируются аликвотами биомассы штамма с плотной питательной среды, устанавливаются на шейкер-инкубатор и качаются при 28°C в течение 3-5 суток. При культивировании в ферментере питательная среда в культуральном сосуде инокулируется суточным мицелием штамма, полученным в колбах описанным выше способом.

В качестве питательной среды для глубинного культивирования подходит среда Чапека-Докса с дрожжевым экстрактом (состав, г/л: сахароза - 30,0; нитрат натрия - 3,0, сульфат магния - 0,5, хлорид

калия - 0,5, сульфат железа (II) - 0,01, фосфат калия двузамещенный - 1,0, дрожжевой экстракт (ДЭ) - 0,5; вода дистиллированная до 1 л; рН 7,0) или среда Сабуро (состав, г/л: глюкоза - 40 г/л, пептон - 10 г/л, вода водопроводная до 1 л; рН 7,0).

Промышленная применимость

Штамм *Beauveria bassiana* 17HA является патогеном трипса пшеничного, белокрылки, хлопковой совки, зеленой цикадки, злаковых тлей, гороховой тли, бахчевой тли, картофельной тли, капустной моли, луковой моли, картофельной моли, кукурузного мотылька, стеблевого мотылька, вредной черепашки, яблонной плодовой гни, гроздевой листовёртки, личинок колорадского жука, жука-щелкуна, хлебных пильщиков и других насекомых-вредителей, а также паутиного клеща. При этом пчелы не проявляют чувствительности к этому штамму.

Бластоспоры штамма *Beauveria bassiana* 17HA сохраняют жизнеспособность в баковых смесях с такими фунгицидами, как Феразим, КС (действующее вещество - карбендазим) и Скальпель, КС (действующее вещество - флутриафол), а также гербицидами на основе хлорсульфурина.

Изобретение иллюстрируется следующими примерами:

Пример 1. Крупноделяночный полевой опыт по выявлению эффективности заявленного штамма *Beauveria bassiana* 17HA проводили в 2017 году в Узбекистане в Уртачирчикском районе Ташкентской области в фермерском хозяйстве "QURBONALI AGRO" на посевах хлопчатника в борьбе с хлопковой совкой, тлями и паутиным клещом. Для обработки использовали глубинную культуру гриба, полученную на среде Чапека-Докса с дрожжевым экстрактом, с титром 1×10^8 бластоспор/мл и нормой расхода 3 л/га. Внесение биологического агента осуществляли посредством опрыскивания (расход рабочей жидкости - 300 л/га). Площадь опытных делянок составляла 1 га для каждого варианта опыта в трехкратной повторности. Учет численности вредителей проводился перед обработкой растений (предварительный учет), затем на 3, 7 и 14 сутки после опрыскивания. Результаты представлены в табл. 1. Биологическая эффективность *Beauveria bassiana* 17HA в борьбе с хлопковой совкой, тлями и паутиным клещом на хлопчатнике составила 80,4%, 84,9% и 91,6% соответственно, что свидетельствует о высокой степени патогенности штамма *Beauveria bassiana* 17HA по отношению к различным насекомым и клещам - вредителям растений и отсутствию у него выраженной специализации.

Пример 2. Полевые испытания эффективности *Beauveria bassiana* 17HA проводили в 2017 году в Ростовской области на луке против гусениц луковой моли и на картофеле против гусениц картофельной моли. Для обработки использовали глубинную культуру гриба, полученную на среде Чапека-Докса с дрожжевым экстрактом, с титром 1×10^8 бластоспор/мл и нормой расхода 3 л/га. В обоих случаях было проведено по 2 обработки по вегетации посредством опрыскивания с нормой расхода рабочей жидкости 300 л/га с интервалом 10 суток. Учет численности вредителей проводился перед обработкой растений (предварительный учет), затем на 3, 7 и 10 сутки после опрыскивания. Результаты представлены в таблицах 2 и 3. В обоих случаях были достигнуты высокие показатели эффективности применения *Beauveria bassiana* 17HA по контролю численности гусениц луковой и картофельной моли.

Таблица 1

Биологическая эффективность *Beauveria bassiana* 17HA в борьбе с хлопковой совкой, тлями и паутиным клещом на хлопчатнике

Вариант опыта	Хлопковая совка							Тли						
	Средняя численность вредителя на 100 растений, экз.				Биологическая эффективность по дням учета, %			Средняя численность вредителя на 1 растение, экз.			Биологическая эффективность по дням учета, %			
	До обработки		После обработки, по дням учета					До обработки		После обработки, по дням учета				
	3	7	14	3	7	14	3	7	14	3	7	14		
<i>B. bassiana</i> 17HA	9,7	4,6	2	1	47,8	72,4	80,4	19,8	10,4	4,1	1,9	40,6	73,4	84,9
Контроль (без обработки)	9,9	9	7,4	5,2	-	-	-	19	16,8	14,8	12,1	-	-	-

Таблица 1 (продолжение)

Паутинный клещ						
Средняя численность вредителя на 1 лист, экз.				Биологическая эффективность по дням учета, %		
До обработки	После обработки, по дням учета			3	7	14
	3	7	14			
19,4	11,5	4,7	1,3	40,1	72,5	91,6
20	19,8	17,6	16	-	-	-

Таблица 2

Биологическая эффективность *Beauveria bassiana* 17НА в борьбе с луковой молью на луке

Вариант опыта	Первая обработка						Вторая обработка							
	Среднее число гусениц на растении			Снижение численности относительно исходной с поправкой на контроль, по дням учета, %			Среднее число гусениц на растении			Снижение численности относительно исходной с поправкой на контроль, по дням учета, %				
	До обработки	После обработки, по дням учета		3	7	10	До второй обработки	После обработки, по дням учета		3	7	10		
		3	7					10	3				7	10
<i>B. bassiana</i> 17НА	3,2	2,7	2,2	1,4	29,0	48,9	72,0	1,4	1,1	1,0	0,9	79,3	83,4	85,8
Контроль (без обработки)	3,2	3,8	4,3	5,0	-	-	-	5,0	5,3	6,0	6,3	-	-	-

Таблица 3

Биологическая эффективность *Beauveria bassiana* 17НА в борьбе с картофельной молью на картофеле

Вариант опыта	Первая обработка						Вторая обработка							
	Среднее число гусениц на растении			Снижение численности относительно исходной с поправкой на контроль, по дням учета, %			Среднее число гусениц на растении			Снижение численности относительно исходной с поправкой на контроль, по дням учета, %				
	До обработки	После обработки, по дням учета		3	7	10	До второй обработки	После обработки, по дням учета		3	7	10		
		3	7					10	3				7	10
<i>B. bassiana</i> 17НА	3,4	2,7	2,2	1,4	32,5	51,1	73,1	1,4	1,1	1,0	0,8	80,4	83,9	87,5
Контроль (без обработки)	3,4	4,0	4,5	5,2	-	-	-	5,2	5,6	6,2	6,4	-	-	-

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Штамм энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana*, депонированный в Национальном биоресурсном центре Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов (БРЦ ВКПМ) НИЦ "Курчатовский институт" - ГосНИИгенетика под регистрационным номером ВКПМ F-1526 для защиты сельскохозяйственных растений от насекомых и клещей - вредителей растений.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2
