(19) **KG** (11) **487** (13) **C2** (46) **30.10.2026**

(51) ***C12N 1/145*** (2026.01)
A01N 63/30 (2026.01)

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ, ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ И ИННОВАЦИЙ КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

к патенту Кыргызской Республики

(21) 20250075.1
(22) 01.09.2025
(46) 30.10.2026. Бюл. № 10
(71) (73) Дөөлөткелдиева Тинатин Дөөлөткелдиевна (KG)
Бобушова Сайкал Токтосуновна (KG)
(72) Дөөлөткелдиева Тинатин Дөөлөткелдиевна (KG)
Бобушова Сайкал Токтосуновна (KG)
Леклерк Андреас (DE)
Шустер Кристина (DE)

(54) **Высокоэффективный штамм Metarhizium robertsii Met5 (KTMU M-5) для создания биопестицида против сосущих, прямокрылых, жесткокрылых и двукрылых вредителей в защите растений**

(57) Изобретение относится к сельскохозяйственной микробиологии и биотехнологии, а именно к области биологических средств защиты растений от насекомых-вредителей.

Задачей изобретения является создание микробиологического инсектицида с широким спектром действия против многих видов вредителей.

Поставленная задача решается в высокоэффективном штамме *Metarhizium robertsii* **Met5 (**KTMU M-5) для создания биопестицида против сосущих, прямокрылых, жесткокрылых и двукрылых вредителей в защите растений, который характеризуется высокой биоинсектицидной активностью, устойчивостью к стрессовым условиям окружающей среды и высокой способностью к спорообразованию.

1 н. п. ф., 8 фиг.

(19) **KG** (11) **487** (13) **C2** (46) **30.10.2026**

Изобретение относится к сельскохозяйственной микробиологии и биотехнологии, а именно к области биологических средств защиты растений от насекомых-вредителей.

Биологический контроль с применением энтомопатогенных микроорганизмов рассматривается как перспективная альтернатива традиционным химическим средствам защиты растений. Среди различных групп биологических агентов особый интерес представляют микроскопические грибы. Это обусловлено, в первую очередь, их широкой патогенностью по отношению к насекомым-вредителям, а также способностью инициировать инфекцию при непосредственном контакте споры с наружными покровами насекомого.

Начальный этап заражения начинается с прикрепления конидии к кутикуле насекомого. После прикрепления происходит прорастание споры с образованием специализированных структур (аппрессориев), обеспечивающих механическое проникновение сквозь кутикулу. Достигнув гемолимфы, гриб переходит в дрожжеподобную форму, формируя так называемые гифальные тельца, которые распространяются в организме хозяина, разрушая его ткани и вызывая гибель.

Известна композиция на основе равных объемов маточных культур *Beauveria bassiana* F-65 и *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* F-596 с добавлением янтарной кислоты (Патент RU № 2311768). Недостатком данного изобретения является то, что активность указана преимущественно против личинок жуков-щелкунов (семейство Elateridae), отсутствуют данные о действии на тлей (*Aphis fabae*) и щитовок (*Aspidiotus nerii*), *Tetranychus urticae* (паутинный клеща) совместное использование двух грибов усложняет масштабное культивирование и стандартизацию препарата.

Известны штаммы: *Metarhizium robertsii* 23013-3 (NRRL 67075), *Metarhizium anisopliae* 3213-1 (NRRL 67074) (Патент US № 11,058,119). Недостатком данного изобретения является, отсутствие данных об эффективности против *Aphis fabae, Aspidiotus nerii и Tetranychus urticae* и нет информации о применении в полевых условиях.

Известны A strain of the fungus Metarhizium anisopliae for controlling subterranean termites, *Metarhizium anisopliae* C4-B (NRRL 30905) (Патент WO 2007112257A2). Недостатком данного изобретения является, узкая специализация на термитах, без упоминания других вредителей, а также нет данных о применении на сельскохозяйственных культурах.

Задачей изобретения является создание микробиологического инсектицида с широким спектром действия против многих видов вредителей.

Поставленная задача решается в высокоэффективном штамме *Metarhizium robertsii* Met5 **(**KTMU M-5) для создания биопестицида против сосущих, прямокрылых, жесткокрылых и двукрылых вредителей в защите растений, который характеризуется высокой биоинсектицидной активностью, устойчивостью к стрессовым условиям окружающей среды и высокой способностью к спорообразованию.

Штамм энтомопатогенного гриба *Metarhizium robertsii* Met5 обладает высокой вирулентностью в отношении таких вредителей, как чёрная бобовая тля (*Aphis fabae*), щитовка олеандровая (*Aspidiotus nerii*) и *Tetranychus urticae* (паутинный клещ).

Штамм хранится в лабораторной коллекции Отделения защиты растений Кыргызско - Турецкого университета «Манас». Штамм *Metarhizium robertsii* Met5 может быть использован для создания микробиологического инсектицида с широким спектром действия против многих видов вредителей из отряда *Homoptera, Diptera, Coleoptera, Orthoptera,* который может рекомендован для обработки различных сельскохозяйственных культур во всех фаз вегетации. Изобретение обеспечивает эффективное снижение численности нимфальных стадий и взрослых особей сосущих вредителей, таких как *Aphis fabae* (черная бобовая тля), *Aspidiotus nerii* (щитовка) и *Tetranychus urticae* (паутинный клещ), без негативного влияния на полезных насекомых и энтомафогов, в том числе опылителей как медоносная пчела.

1. выраженная патогенность к *Aphis fabae, Aspidiotus nerii* и *Tetranychus urticae* при лабораторных и полевых испытаниях;

2. способность продуцировать бластоспоры и конидии с высокой жизнеспособностью;

3. эффективный рост на стандартных питательных средах (Сабуро, Чапека-Докса и др.)

5

4. получение промышленной партии препарата на дешевых средах (отходах пищевой промышленности;

5. безвреден при применении для окружающей среды и полезных насекомых, в том числе для медоносной пчелы.

Заявленный штамм имеет следующие характеристики.

Источник штамма: штамм энтомопатогенного гриба *Metarhizium robertsii* Met5 был выделен из мёртвых насекомых, собранных в природных условиях на территории Кыргызской Республики**.** Получение чистых культур данного штамма проводилось методом микологической изоляции на питательных средах в лабораторных условиях. Идентификация штамма проведена на основании морфологических признаков, культуральных характеристик, а также с использованием молекулярно-генетических методов (ITS, EF1A, RPB1, RPB2 и 5TEF). Видовая принадлежность определена как *Metarhizium robertsii* (фиг. 1 и 2).

Макроморфология на плотных питательных средах.

На среде Сабуро (Sabouraud Dextrose Agar) - колонии *Metarhizium robertsii* Met5 изначально белые или кремовые, со временем приобретают оливково-зелёную окраску по мере образования конидий. Структура колоний флоккозная (пушистая), с плотным центром и белой каймой по периферии. Обратная сторона колоний может иметь коричнево-оранжевый оттенок. На среде Чапека - колонии округлые, ватообразные, слегка приподнятые, белого цвета. Толщина мицелия составляет 1,5-6 мкм, диаметр колоний достигает 15-19 мм на 10-е сутки культивирования. Агар не окрашивается (фиг. 3)

Физиолого-биохимические признаки.

Metarhizium robertsii Met5 является аэробным сапротрофом и активным энтомопатогеном при контакте с насекомыми. Оптимальная температура роста составляет 25-27 °C, однако гриб способен 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 от 3,0 до 9,0. В качестве источников углерода и энергии гриб утилизирует глюкозу, фруктозу, сахарозу, мальтозу, гликоген, крахмал, глицерин, полисорбиты 20-80, а также природные жиры растительного и животного

6

происхождения. В качестве источников азота *Metarhizium robertsii* Met5 может использовать соли аммония, нитраты, мочевину, а также органический азот в виде аминокислот и пептидов.

Микроморфология.

У штамма *Metarhizium robertsii* Met5 вегетативный мицелий представлен септированными, разветвлёнными, тонкостенными гифами белого цвета. На начальных стадиях роста мицелий развивается в субстрате, не поднимаясь на поверхность. К третьим суткам наблюдается формирование плотного, клочковато-ватистого воздушного мицелия, не прикреплённого к субстрату, с выраженным радиальным ветвлением. Конидиеносцы образуются к концу четвёртых суток культивирования, располагаются на воздушном мицелии небольшими пучками, плотно скрученными, в массе имеют жёлтую окраску. Фиалиды формируются на концах конидиеносцев, тесно скручены, расположены группами. Конидии одноклеточные, цилиндрической формы, прямые или слегка изогнутые с закруглёнными концами, формируются на фиалидах на пятые или шестые сутки культивирования.

Настоящее изобретение подтверждается примерами реализации.

Пример 1. Использование заявляемого штамма для получения энтомопатогенного препарата. Анализ производства конидий штамма *Metarhizium robertsii* Met5 показал, что наибольшая концентрация конидий достигается при выращивании на среде (ч. Петри) из овсяных отрубей - $7{,}2\times10^7$ кл/мл**,** что значительно превышает показатели на среде Чапека-Докса ($12{,}5\times10^5$ кл/мл), агаре среды Сусло ($13{,}7\times10^5$ кл/мл) и среде картофельно-декстрозном агаре (PDA) (4×10^6 кл/мл). Размеры конидий на средах Сусло и из овсяных отрубей находятся в диапазоне от 0,40 до 0,42 мкм**,** что несколько больше, чем на среде Чапека-Докса (0,28-0,30 мкм**)** и картофельно-декстрозном агаре (PDA) **(**0,36-0,38 мкм**)** (указан в предыдущем патенте).

В сравнении с использованием пшеничных зерен и кукурузных отрубей в качестве твердого субстрата для культивирования штамма *Metarhizium robertsii* Met5, овсяные отруби показывают лучшие результаты по равномерности роста мицелия и образованию конидий. При использовании овсяных отру-

7

бей достигается более высокая концентрация спор, что повышает эффективность биопрепарата.

При использовании пшеничных зерен концентрация спор составляет около 10-15×10^9 спор на грамм готового продукта, а при использовании кукурузных отрубей - до 20×10^9 спор/г. В нашем случае на овсяных отрубях получен препарат с концентрацией спор 25×10^9 на грамм.

Твердую основу из овсяных отрубей подвергают стерилизации перегретым паром при температуре 121 °С и давлении 1,5 атм в течение 20 минут. После охлаждения осуществляют посев спор штамма *Metarhizium robertsii* Met5 и укрывают культуру полиэтиленовой пленкой для создания оптимальных условий. Экспозиция продолжается 14-20 суток при контролируемой температуре (25 °С и влажности 50-70).

После формирования обильного зелёного конидиального налёта культура с остатками субстрата высушивается и измельчается до мелкодисперсного порошка. Готовый препарат содержит 25×10^9 спор на грамм. При разведении порошка в жидкой среде концентрация спор достигает порядка 1×10^9 спор на мл, что соответствует эффективным дозам для применения в биозащите.

Для сохранения жизнеспособности препарата рекомендуется хранение в холодильнике при 4 °С в течение не менее 6 месяцев.

В процессе культивирования использовали следующее технологическое оборудование и материалы:

1. Автоклав JSAC-60.
2. Ламинар-бокс JSCB-I800SL.
3. Весы лабораторные общего назначения с наибольшим пределом взвешивания 200 г и пределом допускаемой погрешности ±2 мг для взвешивания реактивов.
4. Шкаф сушильный. NE9-112S.
5. Термостаты электрические для выращивания культур грибов с автоматическим терморегулятором до температуры 35 °С и с ценой деления 0,2 °С. NB-205VQ.
6. Холодильник бытовой электрический.
7. Вортекс.
8. Микроскоп световой биологический с увеличением в 900х - 1000х раз.
9. Счетная камера - Tom chamber, Neubauer chamber.

8

10. Блендер.
11. pH-метр с пределом допускаемой погрешности не более 0,05 ед. pH. pH метр pH- 410 № ND 12256.
12. Дистиллятор. ELGA Lab Water PURELAB UHQ II.
13. Potter Precision laboratory Spay Tower.

Пример 2. Тестирование биологической активности грибного энтомопатогенного агента *Metarhizium robertsii* Met5 против *Aphis fabae* и *Aspidiotus nerii* в лабораторных условиях.

Изучение эффективности штамма *Metarhizium robertsii* Met5 проводилось на популяциях чёрной бобовой тли (*Aphis fabae*) и олеандровой щитовки (*Aspidiotus nerii*) и паутинного клеща (*T.urticae*). Тестирование осуществлялось методом опрыскивания листьев растений, на которых локализовались указанные вредители.

Высушенная рецептура с высоким содержанием конидий тестируемых изолятов использовалась для оценки их инсектицидной активности против взрослых особей и дейтонимф *A. fabae, A.nerii* и *T.urticae* с использованием доз 7,2× 10^{-1}, 7,2× $10^{-2,}$ 7,2× 10^{-3}, 7,2× 10^{-4} конидий мл.

На рисунке 4 показана инсектицидная активность различных концентраций тестируемого изолята Metarhisium *robertsii* Met5 по отношению к нимфалидной стадии вредителей, упомянутых выше. Доза конидий 7,2 х 10^{-1} показала низкую патогенность для нимфалидной стадии всех трех вредителей, а смертность составила от 22,0 ± 0,96 % для *T.urticae*; 29,0 ± 0,95 % для *A. fabae* и 40,0 ± 0,95 % *A.nerii*. В то время как доза 7,2 х 10^{-2} Met5 имеет 50 ± 0,95 % смертности у *T.urticae*, 60 ± 0,95 % у *A.nerii* и 60 ± 0,95 % в популяции *A. fabae.* Доза 7,2 Х 10^{-3} конидий уже показала более эффективную активность в отношении личиночной стадии всех трех видов вредителей; смертность достигла 78 ± 0,95 % в популяции нимфалид *T.urticae,* 90,0 ± 0,95 % в популяции *A. fabae*, 97,0 ± 0,95 % в популяции *A.nerii.* Наиболее активная инсектицидная доза составила 7,2х10^{-4}, при которой изолят Met5 вызывал 97,0% ± 0,95 % гибели *T.urticae* и 98,9,0% ± 0,95 % у *A. fabae* и 99,9 ± 0,95 % в популяции нимфалид *A.nerii.*

9

Морфологические признаки микоза проявлялись в виде интенсивного развития мицелия на поверхности кутикулы насекомых, начиная с третьих суток. У щитовки (*Aspidiotus nerii*) характерное прорастание гриба происходило под щитком, что подтверждалось микроскопически - наблюдался плотный мицелий с характерными цилиндрическими конидиями (фиг. 4).

Многократная повторность опыта (n=3) подтвердила статистически достоверную эффективность тестируемого изолята ($P \leq 0,05$). Гибель вредителей сопровождалась типичной грибной мумификацией, что свидетельствует о высокой патогенности штамма и перспективности его применения в биологической защите растений (фиг. 5 и 6).

При наличии вредителей на растениях до обработки как в опытном, так и в контрольном вариантах использовали формулу:

$$БЭ = \frac{Ои \times К - О \times Ки}{ОиКи} \times 100\%$$

где БЭ - биологическая эффективность, %; Ои, О - плотность вредителей на опытном участке (исходная и на дату учета), экз/м^2, Ки, К - плотность вредителей на контрольном участке (исходная и на дату учета), экз/м^2, экз/растение.

Пример 3. Тестирование биопрепарата на основе *Metarhizium robertsii* Met5 на ростостимулирующее действие у овощных культур. В данном эксперименте изучали влияние биопрепарата, содержащего энтомопатогенный гриб *Metarhizium robertsii* штамма Met5, на рост и развитие овощных культур: томата (*Solanum lycopersicum*), фасоли (*Phaseolus vulgaris*) и огурца (*Cucumis sativus*). Биопрепарат представлял собой суспензию с концентрацией 1×10^7 конидий (спор) на 1 мл. Обработка растений осуществлялась путем полива прикорневой зоны молодого растения по 20 мл суспензии.

10

Применение биопрепарата проводилось трижды за вегетационный период с интервалом 10 дней между обработками. Такой режим обеспечивал равномерное и непрерывное воздействие препарата на корневую систему растений в течение периода активного роста.

Для оценки эффективности биопрепарата проводили сравнительный анализ с контрольной группой растений, которые получали аналогичный полив без биопрепарата. В контрольном варианте рост растений был значительно ниже, что свидетельствует о недостаточном стимулирующем воздействии при отсутствии препарата.

Результаты эксперимента показали значительное положительное влияние применения штамма *Metarhizium robertsii* Met5 на рост вегетативной массы исследуемых культур. Особенно заметный эффект наблюдался у томатов и фасоли - средняя высота побегов обработанных растений превышала контрольные значения на 9-13 см. У огурца также отмечался положительный прирост, однако менее выраженный и составил в среднем 7-8 см (фиг. 7). На фиг 8 показана ростстимулирующая активность: 1 - контроль, 2 - *Metarhizium robertsii* Met5, 3-5 - другие штаммы *Metarhizium.*

Таким образом, биопрепарат на основе штамма *Metarhizium robertsii* Met5 продемонстрировал способность значительно стимулировать рост овощных культур по сравнению с контрольным вариантом. При этом отмечалось усиление общего тургора листьев и повышение насыщенности их зелёной окраски, что может свидетельствовать об улучшенном усвоении элементов питания. Эти результаты подтверждают перспективность применения данного биопрепарата в агротехнологиях для повышения продуктивности и устойчивости растений. Штамм *Metarhizium robertsii* Met5 рассматривается не только как эффективный энтомопатогенный агент против вредителей, но и как потенциальный биоинокулянт с ростостимулирующим эффектом при внесении в прикорневую зону растений.

11

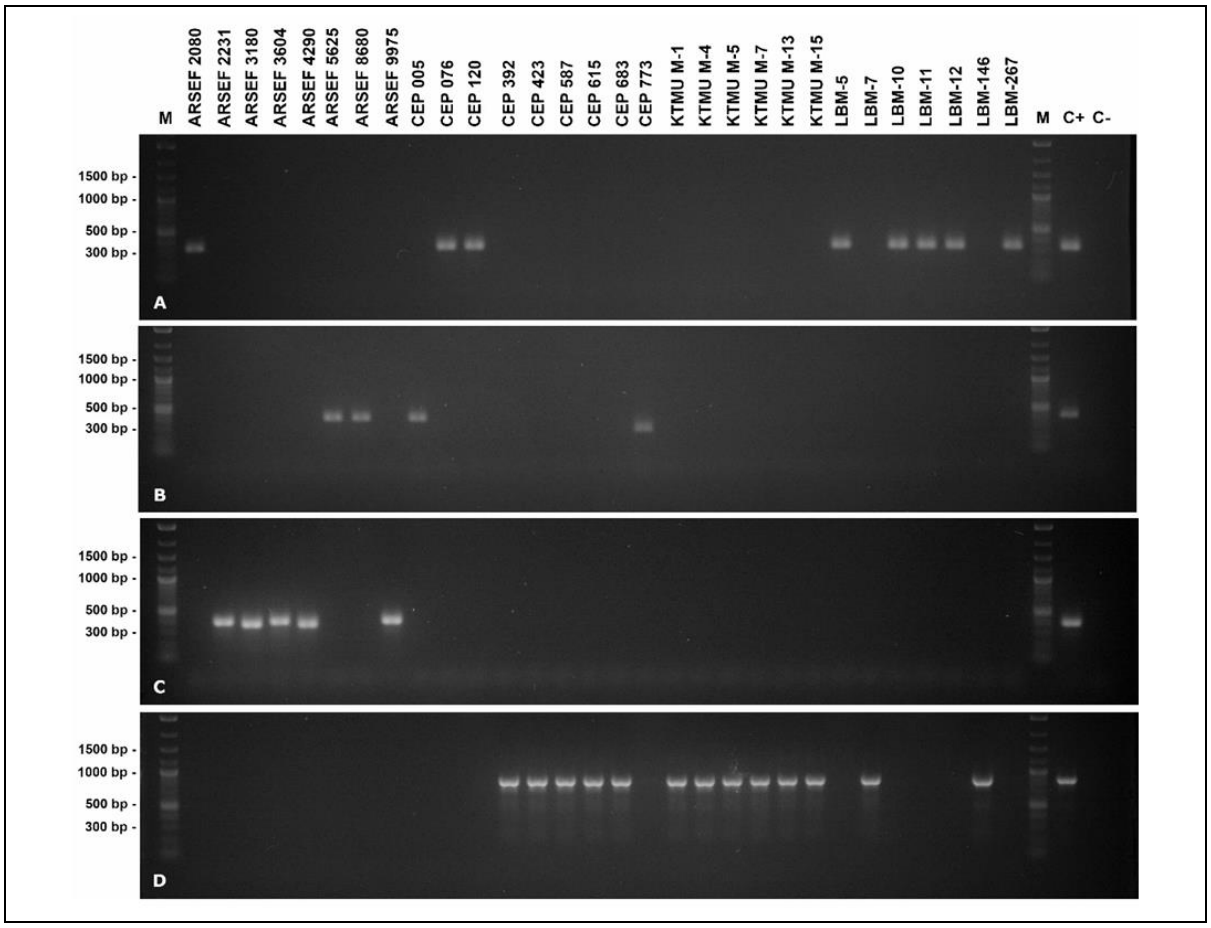
Формула изобретения

Высокоэффективный штамм *Metarhizium robertsii* Met5 (KTMU M-5) для создания биопестицида против сосущих, прямокрылых, жесткокрылых и двукрылых вредителей в

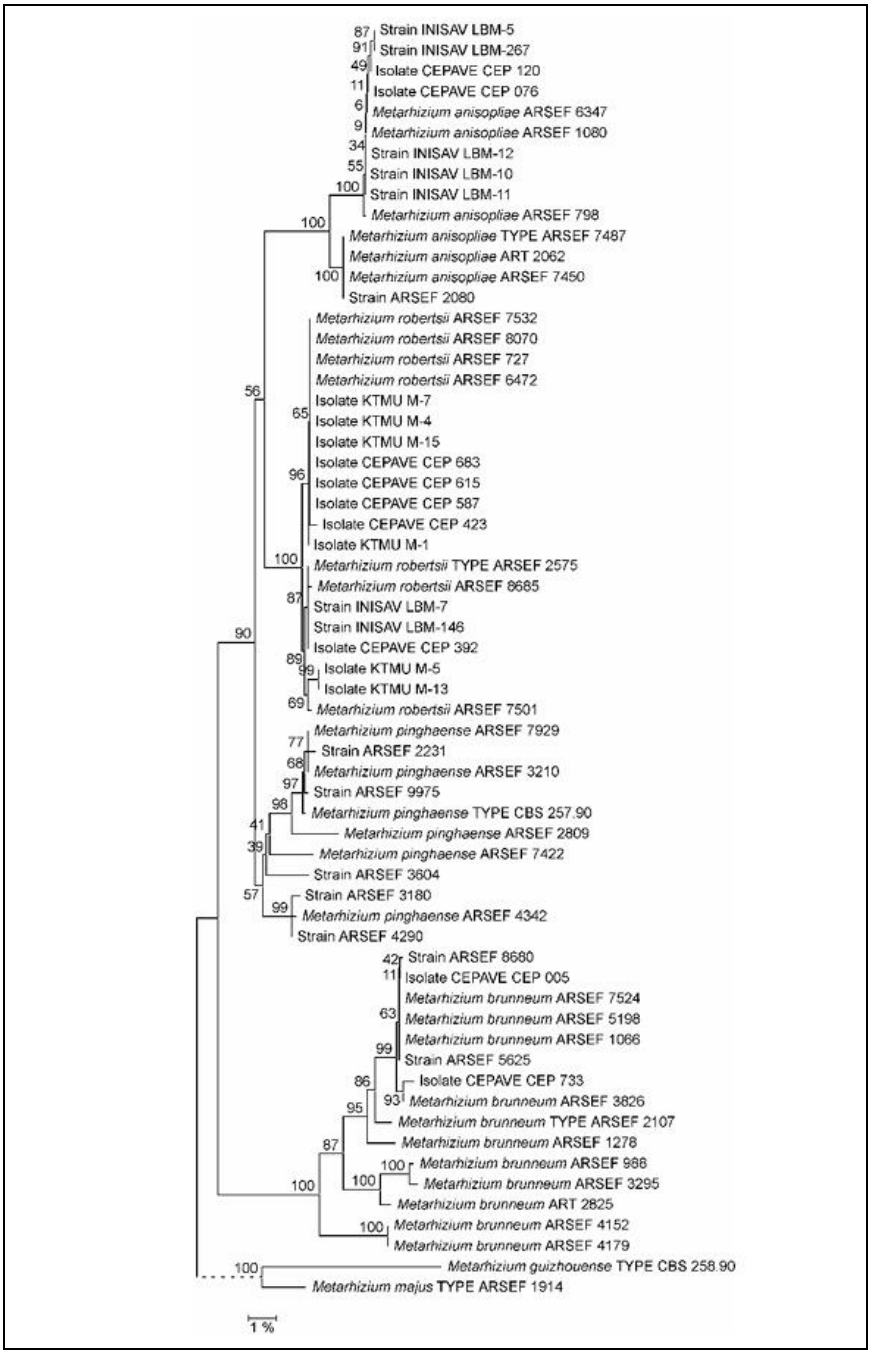
12

защите растений и характеризуется высокой биоинсектицидной активностью, устойчивостью к стрессовым условиям окружающей среды и высокой способностью к спорообразованию.

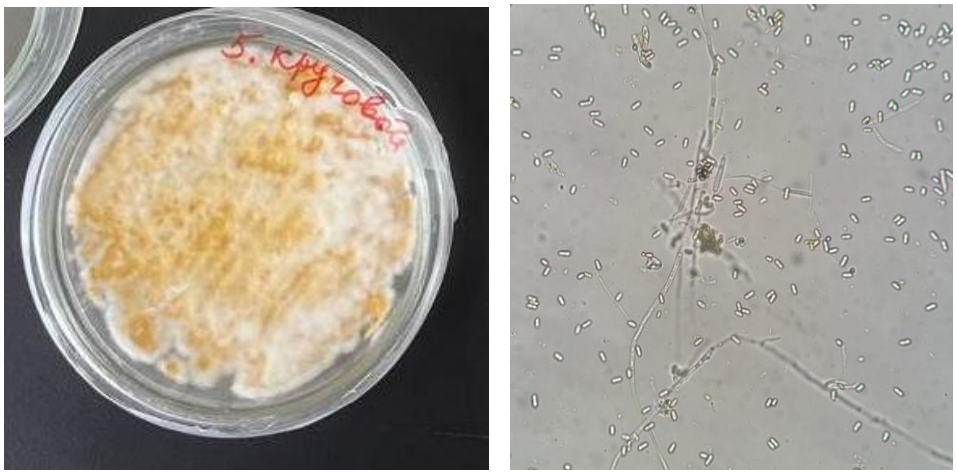
Высокоэффективный штамм Metarhizium robertsii Met5 (KTMU M-5)
для создания биопестицида против сосущих, прямокрылых,
жесткокрылых и двукрылых вредителей в защите растений



Фиг. 1

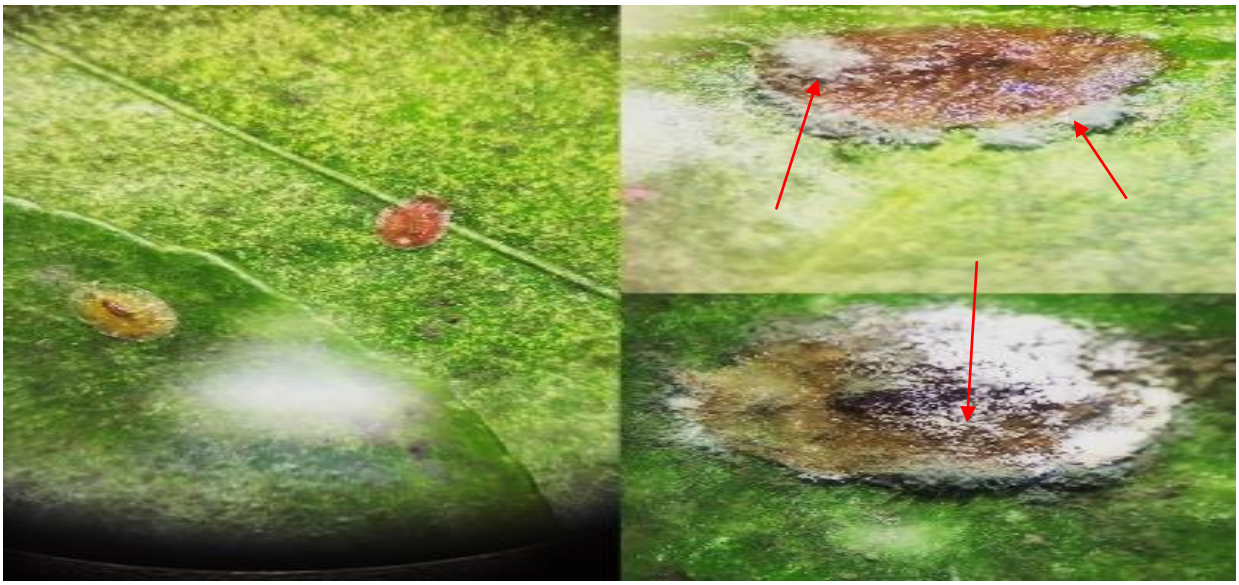

Strain INISAV LBM-5
Strain INISAV LBM-267
Isolate CEPAVE CEP 120
Isolate CEPAVE CEP 076
Metarhizium anisopliae ARSEF 6347
Metarhizium anisopliae ARSEF 1080
Strain INISAV LBM-12
Strain INISAV LBM-10
Strain INISAV LBM-11
Metarhizium anisopliae ARSEF 798
Metarhizium anisopliae TYPE ARSEF 7487
Metarhizium anisopliae ART 2062
Metarhizium anisopliae ARSEF 7450
Strain ARSEF 2080
Metarhizium robertsii ARSEF 7532
Metarhizium robertsii ARSEF 8070
Metarhizium robertsii ARSEF 727
Metarhizium robertsii ARSEF 6472
Isolate KTMU M-7
Isolate KTMU M-4
Isolate KTMU M-15
Isolate CEPAVE CEP 683
Isolate CEPAVE CEP 615
Isolate CEPAVE CEP 587
Isolate CEPAVE CEP 423
Isolate KTMU M-1
Metarhizium robertsii TYPE ARSEF 2575
Metarhizium robertsii ARSEF 8685
Strain INISAV LBM-7
Strain INISAV LBM-146
Isolate CEPAVE CEP 392
Isolate KTMU M-5
Isolate KTMU M-13
Metarhizium robertsii ARSEF 7501
Metarhizium pinghaense ARSEF 7929
Strain ARSEF 2231
Metarhizium pinghaense ARSEF 3210
Strain ARSEF 9975
Metarhizium pinghaense TYPE CBS 257.90
Metarhizium pinghaense ARSEF 2809
Metarhizium pinghaense ARSEF 7422
Strain ARSEF 3604
Strain ARSEF 3180
Metarhizium pinghaense ARSEF 4342
Strain ARSEF 4290
Strain ARSEF 8680
Isolate CEPAVE CEP 005
Metarhizium brunneum ARSEF 7524
Metarhizium brunneum ARSEF 5198
Metarhizium brunneum ARSEF 1066
Strain ARSEF 5625
Isolate CEPAVE CEP 733
Metarhizium brunneum ARSEF 3826
Metarhizium brunneum TYPE ARSEF 2107
Metarhizium brunneum ARSEF 1278
Metarhizium brunneum ARSEF 986
Metarhizium brunneum ARSEF 3295
Metarhizium brunneum ART 2825
Metarhizium brunneum ARSEF 4152
Metarhizium brunneum ARSEF 4179
Metarhizium guizhouense TYPE CBS 258.90
Metarhizium majus TYPE ARSEF 1914
1 %

Фиг. 2

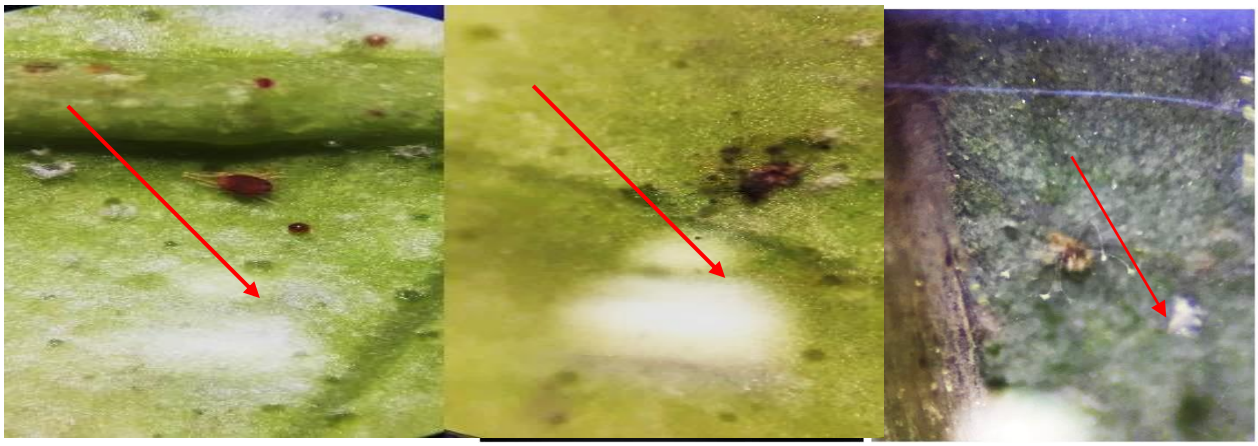


a b

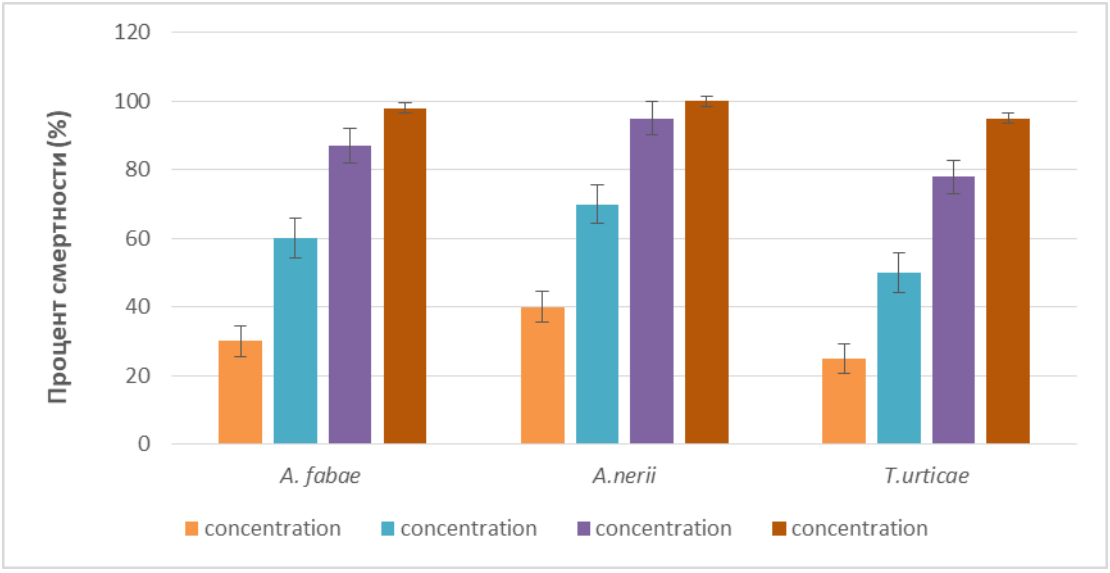
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5


120
100
80
60
40
20
0
Процент смертности (%)
A. fabae
A.nerii
T.urticae
concentration
concentration
concentration
concentration

Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8

Выпущено отделом подготовки официальных изданий