BIOTEHNOLOGII AVANSATE DE OBȚINERE A PREPARATULUI BIOLOGIC ÎN SCOPUL COMBATERII DĂUNĂTORILOR

Stingaci A., Volosciuc L.

*Institute of Genetics, Physiology and Plant Protection, 2002, Chisinau, Padurii str.26/1,
e-mail: aurelia.stingaci@gmail.com,*

Abstract Biopesticides have also attracted great interest in the international research community, with a significant increase in the number of publications devoted to the subject. At Institute of Genetics, Physiology and Plant Protection are prepared the bioinsecticides for use in Republic Moldova, mostly for the control. In order to reduce the population of insect it is recommended utilization inoffensive preparations baculoviruses highly-pathogenic for the leaf-champing vermis of the *H.cunea*, were selected from the insect natural populations which is an efficient preparation for combating this pest in agricultural, onamental and forest biocenosis. This study aimed to highlight new agents for biological control of pest..

Key words: *Hyphantria cunea* Drury, biopesticides, baculovirus

Introducere

Actualmente, vânzările de biopesticide pe piața mondială constituie anual circa 396 mil. \$/an, aflându-se în continuă ascensiune. Țările Americii de Nord rămân lideri în producerea și realizarea biopesticidelor pe piața mondială. Țările Europene treptat devin cei mai importante consumatori, ca urmare a exigenței în respectarea regulamentului de utilizare a pesticidelor și sporirea cererii de produse ecologice. Statele Unite ale Americii, China, Rusia, India sunt principalii producători de pesticide microbiene. Din cele 281 de biopesticide disponibile în prezent pe piață mondială, 30 % au la bază diferite tulpini bacteriene, 38,1% – constituie diferite specii de insecte parazite sau prădătoare, 15,7% – nematozi, 4,27% – ciupercile, 2,85% – viruși și 2,14% – protozoarele [4, 3, 2].

Organismele dăunătoare din diferite motive pătrund în ecosistemele agricole și forestiere și se pot extinde vertiginos pe teritorii mari concretizate și prin aceea că populațiile

de insecte dăunătoare depășesc frecvent nivelele de densitate, producând gradații și dezechilibru ecologic. Dintre toate speciile de defoliatori, Omida-păroasă-a-dudului (*Hyphantria cunea* Drury) s-a dovedit a avea cel mai mare potențial de dăunare de-a lungul timpului, producând multe gradații de tip eruptiv-pulsator cu ciclicitate variabilă, în funcție de zona fitogeografică, condițiile și caracteristicile ecosistemelor [1].

Gradul înalt de nocivitate a *H. cunea* în condițiile Republicii Moldova este determinat și de capacitatea de ași forma rezistența un spectru larg de pesticide. Actualitatea și complexitatea problemei, metodele și căile de sporire a eficienței preparatelor ecologice necesită studierea în continuare. Este necesar de a depune efort continuu pentru a satisface cererea mediului de afaceri și a economiei naționale în preparate ecologice de control al insectelor dăunătoare. Controlul biologic reprezintă una din abordările de succes în gestionarea durabilă a insectelor dăunătoare.

Actualitatea și complexitatea problemei, metodele și căile de creștere a eficienței potențialului a preparatelor ecologice trebuie studiate în continuare. Toate acestea aspecte, situații și probleme nesoluționate, luate în ansamblu, au dictat alegerea temei.

Materiale și metode

În experiențele de laborator și câmp au fost aplicate ambele genuri de baculovirusuri (Baculoviridae): *Nucleopolyhedrovirus* și *Granulovirus* [5]. Pentru cercetare au fost folosite atât tulpinile virusul poliedrozei nucleare, cât și cele ale virusului granulozei. Pentru experiențe au fost folosite scheme, bazate pe recomandările metodice existente.

Purificarea incluziunilor virale. În procesul de apreciere a activității biologice a baculovirusurilor este absolut necesară purificarea lor. Procesul de purificare este determinat de proprietățile hidrodinamice și fizico-chimice ale incluziunilor. La fazele inițiale purificarea VPN și VG nu se deosebesc esențial.

Titrarea baculovirusurilor. Pentru determinarea concentrației baculovirusurilor se folosesc diverse metode, îndeosebi, microscopia electronică și optică. Titrarea se efectuează cu ajutorul camerei Goreaiev sau în preparatele fixate și colorate. Titrarea VG s-a efectuat cu ajutorul microscopului electronic EM - 200, EMB – 100, folosind metodele de contrastare negativă sau pozitivă [2,7].

Determinarea activității biologice a preparatului. Au fost elaborate mai multe metode de determinare a activității biologice a baculovirusurilor. La faza inițială, suspensia virală s-a titrat, determinând concentrația ei. Apoi s-a pregătit o serie de diluții succesive cu care s-a infectat larvele de vârstă a doua (e rațional de-a folosi câte 40 larve de aceeași stare fiziologică). În a treia zi s-a determinat mortalitatea larvelor pe variante și s-a întocmit graficul dependenței „doză-efect”. Pentru aceasta s-a aplicat metoda analizei probelor. S-a efectuat calcule suplimentare, care permit transformarea axelor de coordonate pentru a obține dependența „doza – efect” în formă de linie dreaptă, și nu de curbă exponențială. Construirea graficului a permis determinarea logaritmului dozei suspensiei virale care asigură moartea a 50% din larvele experimentale. Cunoscând concentrația virusului și volumul suspensiei virale s-a determinat ușor concentrația letală (CL_{50}).

Obținerea biomasei virale. Dezvoltarea unor tehnologii viabile necesită selecția unei tulpini virulente a baculovirusurilor la specia *H. cunea*, fiind foarte important să fie selecționată tulpina cea mai activă pentru multiplicare, înregistrare și folosire. A fost aleasă această metodă datorită aproprierii de condițiile de câmp, ingerarea de frunze cu baculovirusuri fiind calea obișnuită de infestare a larvelor în natură. Baculovirusurile au fost izolate din cadavrele larvelor afectate și puse în evidență cu ajutorul tehnicilor de microscopie electronică. În cercetările realizate s-au folosit baculovirusuri din trei surse: 1. VG izolat din larve de *H.*

cunea colectate în România, Ocolul silvic Snagov; 2.VG izolat din larve de *H. cunea* provenite din Republica Moldova, Rezervația științifică „Codrii”; 3.VPN izolat din larve de *H. cunea* provenite din Republica Moldova, Hrușova (Criuleni). S-a obținut forma vastă a preparatelor baculovirale. Datele estimate au fost procesate în conformitate cu pachetul Software Microsoft [6].

Rezultate și discuții

Considerăm util a prezenta înainte de a trece la expunerea rezultatelor cercetărilor care au stat la baza elaborării schemei tehnologice de obținere a preparatului viral, rezultatele unor cercetări, în cadrul cărora a fost studiată selecția unor tulpini virulente a baculovirusurilor la specia *H. cunea*, fiind foarte important să devină selecționarea pentru reproducerea activă, înregistrarea și folosirea, în calitate de agent biologic activ. În cercetările noastre am folosit baculovirusuri din trei surse (Tabelul 1).

Tabelul 1. Izolarea și identificarea a tulpinilor de baculovirusuri la *H. cunea*

Nr.	Specia dăunătorului	Locul colectării	Agenți patogeni identificați				Aplicarea
			Baculo-virusuri	Bac-terii	Ciu-perci	Micro-sporidii	
1	<i>Hyphantria cunea</i> <i>Drury</i>	Romania	VG	+	+	-	Virin-ABB-3, Cercetare, schimb
2	<i>Hyphantria cunea</i> <i>Drury</i>	Republica Moldova	VG	+	+	-	Virin-ABB-3, Cercetare, schimb
3	<i>Hyphantria cunea</i> <i>Drury</i>	Republica Moldova	VPN	+	+	-	Virin-ABB-3, Cercetare, schimb

Materialul biologic obținut a fost analizat la microscopul optic pentru depistarea baculovirusurilor. Femelele moarte de baculovirusuri, bănuite că moartea s-au datorat unui proces patologic, s-au tratat pe suprafața corpului cu alcool etilic (70%) și ulterior au fost selectate pentru analiza histologică. Apoi s-a luat o porțiune din țesut care și s-a decupat cu ajutorul bisturiului steril din țesutul bolnav, care s-a fărâmițat într-un major steril și s-a introdus în 2-3 ml apă sterilă, obținând suspensia cu care a fost utilizată pentru infectarea larvelor.

Dăunătorul atacă în Europa Centrală mai mult de 234 specii de arbori și arbuști, plante erbacee și pomi fructiferi. În țara de origine, America de Nord, *H. cunea* frecvent atacă nucul american (*Nuta*) și arțarul (*Acer negundo*). În Republica Moldova aceste specii sunt considerate ca plante indicatoare pentru semnalarea acestui dăunător. Au fost evidențiate 124 specii de plante gazdă, care pot servi ca bază nutritivă pentru larvele de *H. cunea* în condițiile agroclimaterice ale Republicii Moldova. Totodată s-a constatat, că speciile de arțar (*Acer negundo*) și dud (*Morus nigra*) sunt cele mai preferabile în calitate de substrat trofic pentru obținerea biomasei baculovirale [1].

S-a constatat că numărul adulților ai speciei *H. cunea*, capturați în capcana feromonală cu lumină, colectați în decursul anilor 2010-2013, a atins 187 de exemplare, zborul pentru adulți a fost înregistrat la 21 exemplare în 2013 și 54 exemplare în 2012 (Figura 1).

Fig. 1. Dinamica numărului de adulți ai speciei *H. cunea*, capturați în capcana feromonală cu lumină, 2010-2013

Ca urmare a studiului acțiunii prolificității și modului de depunere a pondei de oua a *H. cunea* au fost efectuate observații zilnice asupra depunerii pondei, locul și modul de depunere a pondei, numărul de ponde depuse. Cercetările efectuate au demonstrat, că populația adulților poate avea loc imediat după emergența din crisalidă. Starea diapauzei facultative este cunoscută pentru multe specii de insecte, inclusiv și pentru *H. cunea*. Cauzele diapauzei doar a unor indivizi din aceeași populație nu au fost încă elucidate (Figura 2, 3).

Fig. 2. Prolificitatea medie în funcție de ovipoziție a unei femele colectate în natură și comportamentul de ovipoziție în condiții de laborator

Fig. 3. Prolificitatea medie în funcție de ovipoziție la femelele speciei *H. cunea* crescute pe mediu artificial în condiții de laborator

S-a demonstrat, că aceasta este o adaptare la condițiile nefavorabile. Ouăle sterile se disting prin culoarea galben-portocalie. Pondele depuse în condiții de laborator de femelele *H. cunea*, colectate în natură, conțin de la 208 până la 1661 ouă, media fiind – 544,3. Numărul de ponde depuse variază de la 1 până la maximum 2. Ovipoziția a avut o perioadă cuprinsă între două și șase zile, cu media de 2,1 zile. În condiții naturale copularea se desfășoară numai în

zorii zilei, la răsăritul soarelui. Femelele capturate își depun pontele în perioada depusă între 2-6 zile. Dacă aceste femele ulterior sunt fecundate, acestea pot depune ouă fertile. Ovipoziția urmează imediat după fecundare și poate să dureze între 8 ore și 5 zile, iar mai mult de 50% din ouă sunt depuse în prima zi. Femela depune ponta de ouă pe suprafața inferioară a frunzelor de dimensiuni mici într-un singur strat. Oul rotund, galben-verzui sau galben-auriu, cu nuanță albastră cu diametrul de 0,5-0,7 mm, pe măsură ce embrionul se dezvoltă, devine gri murdar. Femelele plasează ouăle prin grămezi de un singur strat cu dimensiunea de 1-2 cm², câte 100-600 bucăți fiecare. Prolificitatea medie a unei femele în laborator este de 720,7 de ouă.

Păstrarea numărului optim reprezintă unul dintre mecanismele necesare pentru menținerea homeostaziei populației. În entomologie numărul indivizilor în primul rând are o valoare economică, ca un indice care corespunde obiectivelor programului de creștere. Și acest lucru este valabil atât pentru programele de creștere ale producătorilor de materie primă și produse alimentare, cât și pentru programele de înmulțirea a insectelor.

Concluzii

Bioinsecticidele constituie aproximativ 5% din cantitatea de pesticide vândute pe plan mondial. Obiectivele principale ale agriculturii mondiale constituie elaborarea unor soluții alternative de control a dăunătorilor așa cum ar fi bioinsecticidele pe bază de baculovirusuri. În acest context este foarte actuală problema elaborării unor mijloace principale noi de-a integra un Baculovirus apărut în mod natural într-o populație de insecte dăunătoare, într-un biopreparat stabil, sigur și eficient în controlul speciei. Din punct de vedere economic sunt rentabile deoarece pot declanșa epidemii virale, care se mențin timp de mai mulți ani de zile. Baculovirusii reprezintă un interes științific și practic în calitate de mijloace de protecție efective și ecologic inofensive a insectelor dăunătoare. Numărul maxim posibil de generații în condițiile de laborator depinde de menținerea parametrilor optimi de vârstă și sex a populației artificiale. Optimizarea permanentă a populației de insecte poate duce la rezultate imprevizibile și nedorite. Până în prezent aceste întrebări nu sunt pe deplin elucidate.

Bibliografie

1. Stîngaci, A. Biologia și combaterea microbiologică a Omizii-păroase-a-dudului (*H. cunea* în Republica Moldova. In: Simpozionul științific internațional "Horticultura modernă-realizări și perspective" dedicat a 85 de ani de la fondarea Universității Agrare de Stat din Moldova, Chișinău, 2018, pp. 633-637. ISBN 978-9975-64-296-5 (p. 180-186).
2. Voloșciuc, L.T. *Probleme ecologice în agricultură*. În: Chișinău: Bons Offices, 2009. 264 p. ISBN 978-9975-9774-5-6.
3. Agrow Biopesticides. *Biologicals 2018, an analysis of corporate, product and regulatory news*. Agribusiness Intelligence, [online]. Informa UK Ltd., Christchurch Court, London EC1A 7AZ, UK, 2018 [citat 21.01.2019]. ISSN 0268-313X. Disponibil: <http://www.agrow.com>.
4. Biopesticides Market by Active Ingredient (Microbials & Biorationals), by Types (Bioinsecticides, Biofungicides, Bionematicides & Bioherbicides), by Application, by Formulation, by Crop Type & by Geography - Global trends & forecasts to 2019. In: Markets and Markets Inc., 2015 [citat 21.08.2018]. Disponibil: <http://www.marketreportsnub.com>.
5. Theilmann, D.A., Blissard, G.W. Baculoviruses: molecular biology of nucleopolyhedroviruses. In: *Encyclopedia of Virology*, 3rd edn, Oxford, Academic Press, 2008, pp. 254-265. ISBN 13: 978-0123739353.

6. Чухрий, М.Г. *Биология бакуловирuсов и вирусов цитоплазматического полиедроза*. Кишинёв: Штиинца, 1988. 237 с.