CZU:573.6.086+632.95

<https://doi.org/10.53040/gppb7.2021.91>

ISOLATE LOCALE ALE BACULOVIRULUI ENTOMOPATOGENIC CA O TEHNOLOGIE DE FORMULARE INOVATOARE, CARE PROTEJEAZĂ BIOPESTICIDUL DIN DEGRADARE A RADIAȚIEI ULTRAVIOLETE

Stingaci Aurelia, Voloșciuc Leonid

Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor, Chișinău, Republica Moldova

e-mail: aurelia.stingaci@igfpp.md

Abstract

This paper presents the conceptual vision a formulation technology for biopesticides in which the active ingredient (baculovirus) is an active coal. Importantly, this ingredient protects the sensitive viral DNA from degrading in sunlight, but dissolves in the alkaline insect gut to release the virus, which then infects and kills the pest. We show, using this ingredient, in both laboratory bioassays and field tests, that this can extend the efficacy of the biopesticide well beyond the few hours of existing virus formulations, potentially increasing the spray interval and reducing the need for high application rates. Are presented both theoretical foundations and practical applications and described the results oriented for implementation and functionality of organic agriculture in Republic of Moldova.

Key words: baculovirus, biopesticides, virus, viral DNA, organic agriculture, ingredient.

Introducere

Biopesticidele sunt agenți biologici de combatere a dăunătorilor fitofagi care sunt priviți ca alternative mai sigure față de cele chimice ce domină piața globală a insecticidelor. Conform datelor FAO, la nivel global culturile agricole sunt atacate în mod negativ de 18.400 de organisme patogene dintre care 8.000 - insecte fitofage și 9.600- agenți patogeni. În Republica Moldova, numărul total din ultimii ani sunt circa 610 specii de organisme dăunătoare (140 de dăunători și 420 de agenți patogeni), iar daunele cauzate ajung la 2,0-2,5 miliarde lei (Chandler et al., 2011; EGAN P.A., et al., 2020).

Actualmente, este greu de conceput obținerea producției ecologice fără utilizarea biopreparatelor pentru protecția plantelor. Conform cercetărilor creșterea randamentului culturilor agricole în viitorul apropiat se va obține în principal prin utilizarea biopesticidelor (Hewson et al., 2011). Au fost identificați o serie de factori, care restricționează utilizarea biopesticidelor baculovirale. O problemă primordială în ultimii 40 de ani persistă la adoptarea mai largă a biopesticidelor față de deteriorarea radiațiilor ultraviolete (UV: 290-400 nm), ceea ce limitează persistența și eficacitatea acestora. Se cunosc o serie de materiale care protejează în mod eficient eficacitatea unui biopesticid baculovirus protejând ADN-ul viral sensibil de la deteriorarea radiațiilor UV inclusiv coloranți specializați, substanțe chimice și substanțe naturale precum și ceai verde, antioxidanți, oxid de fier ș.a au fost testate pentru a îmbunătăți protecția baculovirusurilor entomopatogeni (Arthurs et al., 2008; Shapiro, M., S, 2012)

În prezenta lucrare, se descrie o tehnologie de formulare pentru biopesticide în care ingredientul activ este un cărbune activ. Important, acest ingredient protejează ADN-ul viral sensibil de degradarea la razele ultraviolete, dar patrunde în intestinul alcalin al insectelor pentru a elibera virusul, care apoi infectează și ucide dăunătorul. Acest ingredient activ, atât în testele de laborator cât și în testele de teren, poate extinde eficacitatea biopesticidului reducând necesitatea unor rate de aplicari ridicate. Noua formulare are o durată de valabilitate la 30 °C de cel puțin 2 ani, care este comparabilă cu biopesticidele comerciale standard și nu are nici un efect fitotoxic asupra plantei - gazdă.

Materiale și metode

În experiențele de laborator și câmp au fost aplicate ambele genuri de baculovirusuri (Baculoviridae): *Nucleopolyhedrovirus* și *Granulovirus* [11]. 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.

Experiențe au fost efectuate pe ponte de ouă, larve și adulți de *H. cunea*, (Lepidoptera: Arctiidae). Efectivul de adulți a fost obținut din larve colectate din zona municipiul Chișinău, din diferite localități

ale Republicii Moldova și din fâșiile forestiere, precum și livada Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor.

Nivelul infestărilor (pe grade de intensitate), precum și faza gradației în ecosistemele agricole și silvice infestate de *H.cunea* au fost stabilite în funcție de caracteristicile cantitative (densitatea depunerilor pe unitatea amenajistică) și calitative ale gradației (fecunditatea, rata de parazitare și de sterilitate la ouă, faza gradației) obținute prin efectuarea unor analize de laborator.

Pentru obținerea materialului viral și infectarea larvelor cu suspensie virală e necesară pregătirea prealabilă a suspensiei virale. Se pot folosi suspensii purificate sau suspensii inițiale. Pentru titrarea virusurilor se aplică infectarea dozată a insectelor în conformitate cu tehnica Vago și diverse modificări ale ei [3].

Prin observații directe din natură și prin administrarea de hrană în condiții de laborator a fost stabilit spectrul trofic al speciei în zonele de atac. S-a constatat o predilecție a *H. cunea* față de *Acer negundo* și *Morus alba*. Întrucât aceste specii de plante sunt citate și în literatura de specialitate, ca fiind preferate de larvele dăunătorului, ele au fost folosite în cadrul cercetărilor pentru creșterea cu hrană naturală. Larvele colectate erau crescute în condiții de laborator pe hrană naturală (frunze de arțar și dud). Pentru creșterea larvelor, insectele erau transferate în vase de sticlă (cristalizatoare, borcane). Acestea au fost puse în voliere pe fragmente de ramuri de dud, arțar, nuc, vișin, sorb ș.a cu reânoirea sușelor de VG și VPN. Insectele coloniale se infectează, de regulă, prin stropirea buchetelor plantei-gazdă [1], [2].

Pe întreaga durată a dezvoltării, temperatura menținută în camera de creștere a constituit de $24 \pm 1^\circ\text{C}$, umiditatea relativă de $85 \pm 5^\circ\text{C}$ și fotofaza de 16 ore. Selecția de imago, utilizați în experiențele ulterioare, a fost realizată pe baza diferitor indicatori morfofiziologici, în primul rând, dimensiunea și aspectul general al larvelor. Lungimea corpului și anvergura aripilor au fost măsurate la adulții fixați. Prolificitatea și fertilitatea femelelor crescute în condiții controlate au fost determinate în conformitate cu metodologia cercetărilor entomologice.

Microscopia electronică cu transmisie și baliaj. Informația cea mai completă și mai veridică, privind particularitățile structurale ale baculovirusurilor, poate fi obținută la aplicarea metodelor electrono-microscopice. În funcție de domeniul de investigație se cunosc mai multe indicații metodice, cum ar fi cele elaborate de către dr.hab. Ciuhrii M.

Cercetările electrono-microscopice necesită lucrări prealabile ample, care includ pregătirea materialului biologic al grilelor, a soluțiilor și peliculelor. Ele au fost efectuate în conformitate cu prevederile tehnicii elaborate de savantul Adams.

La această etapă a cercetărilor testele au fost realizate prin metoda de încorporare a virusului în mediul de creștere, această metodă fiind folosită și pentru a determina CL 50, dozajul pentru formulările de testare, precum și pentru testele de evaluare a produsului final. Zilnic s-au efectuat observații privind comportamentul larvar și mortalitatea. Larvele afectate de baculovirus au fost procesate prin: 1. mixare (omogenizare) în apă distilată; 2. filtrare prin evelină; 3. centrifugare 25 minute la 7000 g; 4. uscare în hotă la temperatura camerei; 5. măcinare la fracția pulbere fină.

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 forme vaste de preparate baculovirale. Datele estimate au fost procesate în conformitate cu pachetul Software Microsoft

Rezultate și discuții

Cele trei baculovirusuri au fost izolate, purificate și utilizate în teste de laborator pe larve crescute în condiții controlate, câte 3 repetiții a câte 100 de larve în fiecare variantă. Administrarea baculovirusurilor s-a făcut prin stropirea frunzelor care au servit drept hrană larvelor de vârstă a doua proaspăt năpărlite. A fost aleasă această metodă datorită aproprierii de condițiile de câmp, ingerarea de frunze cu baculovirusuri fiind calea obișnuită de infectare a larvelor în natură. Temperatura din camera de

creștere a avut valori de 24-25°C, fotoperioada constituind 16 ore lumină și 8 întuneric. Hrana administrată a fost constituită din frunze naturale, analogic cu varianta martor. Baculovirusurile au fost izolate din cadavrele larvelor afectate și puse în evidență cu ajutorul tehnicilor de microscopie optică și electronica.

Investigarea și determinarea mecanismelor dintre organismele utile și cele dăunătoare a devenit posibilă doar prin aplicarea metodelor contemporane de cercetare, inclusiv a celor biogeocenotice, care s-au stabilit pe parcursul evoluției multimilenare și sunt bazate pe interacțiunea elementelor structurale și funcționale ale interacțiunii lor. Aplicând diverse abordări electrono-microscopice (microscopia electronică cu transmisie, microscopia electronică cu baleiaj), sa stabilit particularitățile structurale și ultrastructurale ale baculovirusurilor, care stau la baza reglării densității populațiilor de insecte dăunătoare [5-7, 21].

Pentru identificarea expres a baculovirusurilor *H.cunea* a fost aplicată microscopia optică și electronică a Virusului Poliedrozei Nucleare, care prezintă rezultate suficiente pentru diagnosticarea, titrarea și determinarea calității biomasei și preparatelor baculovirale (figura 1).

Fig. 1. Particularitățile ultrastructurale ale Virusului Poliedrozei Nucleare. a) Particularitățile morfologice a infecției baculovirale mixte (Granule și Poliedre) a *H.cunea* cercetate la microscopia electronică cu baleiaj, b) Ultrastructura larvelor de *H.cunea* infectate cu Virusul Poliedrozei Nucleare și Virusul Granulozei în infecția mixtă la această insectă.

Păstrarea larvelor virozate în condiții de temperatură ridicată, o perioadă mai îndelungată poate duce la inactivarea virusului și apariția proceselor de fermentație și putrifacție, care pot compromite materialul biologic. Perfecționarea și determinarea calității preparatului viral se efectuează pentru asigurarea titrului preparatului la nivel de 6×10^6 poliedre sau granule/ml. Pulberea respectivă se amestecă în matricea preparatului, care trebuie să îndeplinească o serie de condiții: să includă substanțe aderente; să asigure rezistență la acțiunea razelor ultraviolete particulele să nu depășească mărimea duzelor aparatelor de stropit; să formeze o suspensie stabilă. În Tabelul 1 sunt prezentate principalii parametri a preparatului viral.

Tabelul 1. Determinarea principalilor indici tehnologici ai componentelor matricei preparatului baculoviral

Varianta componentei matricei	Viteza de înmuiere, sec.	pH-ul suspensiei	Rezistența la acțiunea radiației UV, ore	Aderența preparatului la substrat, %	Rezistența la spălare, %
1	17	7-7,5	>60	82-90	63,4
2	18	6,1-6,5	42-60	82-92	50,8
3	30	6,2	33-49	81-85	35,6
4	15	6,7	31-48	75-80	48,0
Martor	1,8	6,9	4-24	60	2,3

Indicii principali ai preparatului Virin-ABB-3 se caracterizează cu pH cuprinse în intervalul 6,5-7,5, fiind optime pentru conservarea virusurilor. O aderență sporită s-a înregistrat în variantele, în

care componentele majoritare au fost zaharoza și melasa atomizată. Rezistența la spălare, de asemenea a fost în primele două variante, iar rezistența la acțiunea radiației ultraviolete s-a înregistrat în varianta, în care zaharoza constituie componentul majoritar al matricei.

Concluzii

Utilizarea Baculovirusurilor ca Biopesticide virale reprezintă un instrument relativ ieftin, practic, ecologic și eficient pentru biocontrolul insectelor dăunătoare de importanță agricolă a culturilor. A fost elaborată o nouă tehnologie de formulare care protejează în mod eficient eficacitatea unui biopesticid baculovirus protejând ADN-ul viral sensibil de la deteriorarea radiațiilor UV. Această tehnologie este o formulare extrem de promițătoare, a cărei adoptare în baculovirus și alte formulări de biopesticide crește foarte mult persistența și eficacitatea biopesticidelor reducând în același timp costurile. De asemenea, ar putea fi un mijloc eficient a utilizării mai sigure, mai acceptabile din punct de vedere ecologic de combatere a dăunătorilor pentru a înlocui pesticidele chimice.

Cercetările au fost realizate în cadrul Proiectului de Stat 20.80009.7007.16 „Sinergismul dintre factorii naturali și mijloacele microbiologice, ecologice, de reglementare a densității populației de organisme dăunătoare pentru protecția culturilor în agricultura convențională și organică”, finanțat de Agenția Națională pentru Cercetare și Dezvoltare.

Bibliografie

1. ARTHURS, S. P., LACEY, L. A. & BEHLE, R. W. Evaluation of lignins and particle films as solar protectants for the granulovirus of the codling moth, *Cydia pomonella*. *Biocontrol Sci. Technol.* 2008, vol.18, nr. 8, p. 829–839.
2. *Biopesticides: Pest management and regulation*, by D.Chandler et al. CABI, 2010. 256 p.
3. CHANDLER, D. The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. In: *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Biological Sciences, Series B*, 2011, vol. 366, pp. 1987-1998. ISSN 1471-2970
4. EGAN P.A, DICKS L.V, HOKKANEN H.M, Stenberg JA. Delivering Integrated Pest and Pollinator Management (IPPM). *Trends Plant Sci*, 2020, nr.2, p. 577–589. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.01.006>
5. SHAPIRO, M., S. EL SALAMOUNY, D. M. JACKSON, AND B. M. SHEPARD. Field evaluation of a kudzu/cottonseed oil formulation on the persistence of the beet armyworm nucleopolyhedrovirus. 2012.,vol. 47, p.1–11.
6. VOLOSCIUC, L.T. *Biotehnologia producerii și aplicării preparatelor baculovirale în protecția plantelor*. Chișinău: Mediul ambiant, 2009. 262 p.
7. ЧУХРИЙ, М.Г. *Биология бакуловирусов и вирусов цитоплазматического полиедроза*. Кишинёв: Штиинца, 1988. 237 с.