PARTICULARITĂȚILE IDENTIFICĂRII VPN ȘI VG A HYPHANTRIA CUNEA PRIN APLICAREA MICROSCOPIEI OPTICE ȘI ELECTRONICE

Stingaci Auelia, Volosciuc Leonid

*Institute of Genetics, Physiology and Plant Protection, 2002, Chisinau,
Padurii str.26/1,*

e-mail: aurelia.stingaci@gmail.com

<https://doi.org/10.53937/9789975315975.61>

Abstract. *Biopesticides are mass-produced, biologically based agents used for the control of plant pests. They are an important part of integrated pest management (IPM), which aims to use complementary methods to manage pest populations at low levels, rather than eliminate them entirely. Biopesticides are being used on increasing scales and there is considerable interest in their potential as alternatives to conventional pesticides. 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 of inoffensive preparations baculoviruses highly-pathogenic for the leaf-champing vermis of the Hyphantria 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. The results of the present study revealed the larvicidal potential of baculovirusess isolates found in the larvae of H. cunea, local production of biopesticides, which will reduce the final cost of the product and will more accessible to farmer.*

Key words: *Biopesticides, Hyphantria cunea, insect, pest control*

INTRODUCERE

Noile contexte ale pieței mondiale orientate spre agricultura ecologică necesită menținerea biodiversității, și una din problemele ei este crearea unei agriculturi durabile la reducerea sau substituirea completă a produselor chimice. Activitățile fitotehnice indispensabil sunt legate de acțiunea

organismelor dăunătoare (agenți patogeni ai bolilor, insecte și acarieni dăunători, buruieni). Pierderile provocate agriculturii pe plan mondial de diferitele organisme dăunătoare se ridică anual la 35% din recolte, ceea ce corespunde cu aproximativ 100 miliarde de dolari. Din aceste pierderi, insectelor le revin 13,8%, ciupercilor 11,6%, buruienilor 9,5% și altor organisme 0.1%. În mare măsură pierderile reflectă și posibilitățile de a controla mărimea producției agricole pe diferite teritorii [2, 4].

Actualmente vânzările de biopesticide pe piața mondială constituie circa 396 mil. \$ pe an, aflându-se în continuă ascensiune. Țările Americii de Nord rămân lideri ai producerii și realizării biopesticidelor pe piața mondială. Țările Europene treptat devin cei mai mari consumatori ca urmare a stricteții 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 [1,5].

În majoritatea statelor, inclusiv Republica Moldova insecticidele chimice sunt pe larg utilizate pentru reglementarea actuală a insectelor dăunătoare. Dar utilizarea lor este adesea periculoasă sau chiar interzisă cum ar fi peretroizile din punct de vedere ecologic. Dar datorită aplicării pe scară largă a insecticidelor mai ales a peretroizilor cu spectru larg de consum insectele au obținut deja un anumit nivel de rezistență. În plus la aceasta utilizarea frecventă a peretroizilor și a neonicotinoizilor poate provoca efecte negative severe asupra organismelor care furnizează servicii ecosistemice, inclusiv polenizarea și controlul natural al dăunătorilor [3]. Temeiul juridic pentru protecția plantelor în Republica Moldova și Europa se concentrează asupra unei strategii integrate de gestionare a dăunătorilor (IPM), care ar trebui să limiteze aplicarea preparatelor chimice sintetice într-o măsură necesară și substituirea metodelor biotehnice și biologice [6].

Identificarea baculovirusurilor este indispensabil legată de acumularea informației privind particularitățile structurale și ultrastructurale ale virionilor. Informația cea mai completă și cea mai veridică despre structura lor poate fi obținută la aplicarea metodelor microscopiei optice și electronice. Luând în considerație importanța acestor cercetări în diverse domenii de investigație și ținând cont de diversitatea baculovirusuri-

lor care afectează *H.cunea*, noi am aplicat mai multe elaborări metodice, care necesită efectuarea diferitor lucrări prealabile de pregătire a materialului biologic, a grilelor, soluțiilor și peliculelor.

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

MATERIAL ȘI METODE

Pentru purificarea VPN au fost folosite mai multe tehnici, dintre care noi am utilizat modificarea noastră, care constă din etapele următoare. Suspensia virotică filtrată se centrifuga timp de 30 min la 1000 tur/min a centrifugei ȚLN-2. Precipitatul obținut se spală de 3 ori cu apă. Suspensia obținută se centrifuga în gradientul concentrației de zaharoză (70-20%) și se centrifuga la 3000 tur/min în decurs de 10 min. Zonele cu concentrația de 40-50% se adunau și se stratificau în gradientul de 50-60% și după 15 min de centrifugare se obțineau fracții practic pure de SPVC.

Pentru purificarea VG au fost verificate mai multe metode, care prevăd aplicarea procedeelor de centrifugare diferențială, diverse concentrații a gradientului de zaharoză precum și alternarea lor. Rezultate mai bune au fost obținute la centrifugarea timp de 45 min în gradientul densității zaharozei la 13200 g. Stratul de granule după fracționare se spală pentru eliberarea de zaharoză.

Pentru cercetarea particularităților morfologice și biochimice a virionilor încapsulați în cadrul SVC sau SPVC se aplică diverse metode, care se bazează pe proprietățile proteinelor din componența matricei baculovirale (poliedrină și granulină) de a se solubiliza în soluțiile tampon cu pH titrat pentru anumite specii de virus. În acest scop se aplică centrifugarea fracționară, care permite sedimentarea proteinelor la accelerarea de 2000 g, iar a virionilor – la 20 000 g.

Pentru fixarea materialului biologic a fost folosită soluția de 2% de aldehydă glutarică pregătită pe soluția de tampon cacodilat. Spălarea probelor se efectua în soluție tampon cu conținutul următor: 50% tampon cacodilat, 50% apă bidistilată și 5g de zaharoză. Postfixarea probelor s-a

efectuat în soluție de 4% de OsO_4 . Materialul fixat în așa mod se dehidrata în serii de acetonă (20% - 100%), iar apoi se turna în capsule în amestecul de rășini cu componența următoare: amestecul A - 15 g, amestecul B - 15 g și DMP de 2% - 600 mg.

Secțiunile ultrafine au fost obținute la ultramicrotomul Reichert-lung (Austria). Secțiunile ultrafine au fost contrastate cu soluție acvatică de 2% de uranil-acetat timp de 30 min, iar apoi contrastate cu citrat de plumb după Reynolds.

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 tulpinilor de baculovirusuri la *H. cunea*

Nr.	Specia dăunătoare	Locul colectării	Agenți patogeni identificați				Aplicarea
			Baculovirusuri	Bacterii	Ciuperci	Microsporidii	
1	<i>Hyphantria cunea</i> Drury	Romania	VG	+	+	-	Virin-ABB-3, Cercetare, schimb
2	<i>Hyphantria cunea</i> Drury	Republica Moldova	VG	+	+	-	Virin-ABB-3, Cercetare, schimb
3	<i>Hyphantria cunea</i> Drury	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-a 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 aju-

torul 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.

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 năpârlite. 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.

Pentru identificarea expres a baculovirusurilor *H. cunea* a fost aplicată microscopia optică a Virusului Poliedrozei Nucleare, care prezintă rezultate suficiente pentru diagnosticarea, titrarea și determinarea calității biomasei și preparatelor baculovirale (Figura 1-6).

Fig. 1. Aspectul Virusului Poliedrozei Nucleare a *H. cunea* în frotiuri colorate cu fuxina și cercetate la microscopul optic (1800^x)

Fig. 2. Particularitățile Virusului Granulozei *H. cunea* la cercetarea în microscopul cu contrast de fază (2000X)

Fig. 3. Particularitățile morfologice a granulelor *H.cunea* cercetate la contrastarea pozitivă cu uranilacetat (21500X).

Fig. 4. Particularitățile morfologice a granulelor *H. cunea* cercetate în secțiunile ultrafine la microscopul electronic cu transmisie (20000X).

Fig. 5. Ultrastructura larvelor de *H. Cunea* infectate cu Virusul Poliedrozei Nucleare și Virusul Granulozei în infecția mixtă la această insectă.

Analiza morfometrică a incluziunilor baculovirusurilor *H. cunea*, demonstrează că poliedrele VPN a acestei insecte au dimensiuni medii ($11,2-13,1 \times 0,7-0,8 \mu\text{m}$), ceea ce se încadrează în rezultatele înregistrate în cercetările altor savanți [10].

CONCLUZII

Bioinsectecidele 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.

Dimensiunile nucleocapsizilor încadrați în componența suprapoliviriocapsizilor extrași din larvele moarte de *H. cunea* se caracterizează cu valori medii ($215-222 \times 35-38 \text{ nm}$) și se înscriu în masivele informaționale înregistrate în alte cercetări științifice. Supraviriocapsizii (granulele) *H. cunea* reprezintă incluziuni oval-alungite cu dimensiuni de $0,35-0,5 \times 0,25-$

0,3 mcm, în capsida cărora sunt înglobați câte un nucleocapsid, dimensiunile cărora constituie $270-275 \times 25-27$ nm.

Fig. 6. Particularitățile morfologice a infecției baculovirale mixte (Granule și Poliedre) a *H. cunea* cercetate la microscopia electronică cu baleiaj.

BIBLIOGRAFIE

1. **Airenne K.J. et al.** In vivo application and tracking of baculovirus. In: Current Gene Therapy, 2010, vol. 10, p. 1-8.
2. **Dwijenda S.** Advances in Plant Biopesticides. In: Springer, India, 2014. 407 p
3. EASAC (2015). European Academies Science Advisory Council. Policy report 26: Ecosystem services, agriculture and neoniconinoids. German National Academy of Sciences Leopoldina 2015. URL <http://www.interacademies.net/File.aspx?id=27071> (vizitat 02.08.2018)
4. Facts and figures on organic agriculture in the European Union. Comisia Europeană, 2013. http://epp.eurostat.ec.europa.eu/portal/page/portal/statistics/search_database (vizitat 22.04.2014).
5. **Lacey L. A., H. L. Headrick and S. P. Arthurs.** Effect of temperature on long-term storage of codling moth granulovirus formulations. In: Journal Economic Entomology, 2008, vol. 101, p. 288-294.
6. PflSchG (2012). Plant Protection Act of 6 February 2012 (Federal Law Gazette I, p. 148, 1281), which was last amended by Article 4, paragraph 84 of the Act of 18 July 2016 (Federal Law Gazette I, p. 1666). URL https://www.gesetze-im-internet.de/bundesrecht/pflschg_2012/gesamt.pdf