

**INSTITUTUL DE GENETICĂ, FIZIOLOGIE ȘI PROTECȚIE A
PLANTELOR**

Cu titlu de manuscris
C.Z.U.: 632.937.16 (043.2)

STÎNGACI AURELIA

**BIOTEHNOLOGIA PRODUCERII ȘI APLICĂRII
BACULOVIRUSURILOR ÎN COMBATEREA
*HYPHANTRIA CUNEA DRURY***

411.09 – Protecția plantelor

Rezumatul tezei de doctor în științe biologice

CHIȘINĂU, 2019

Teza a fost elaborată în laboratorul Fitopatologie și Biotehnologie, Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor

Conducător științific:

CIUHRII Mircea, doctor habilitat în științe biologice, profesor cercetător

Consultant științific:

VOLOȘCIUC Leonid, doctor habilitat în științe biologice, profesor cercetător

Referenți oficiali:

MANIC Gheorghe, doctor habilitat în științe biologice, conferențiar cercetător

CROITORU Nichita, doctor în științe agricole, conferențiar universitar

Componența Consiliului Științific Specializat:

VOINEAC Vasile, doctor habilitat în științe agricole, profesor universitar, *Președinte*

BATCO Mihail, doctor în științe biologice, conferențiar cercetător, *Secretar științific*

TODIRAS Vladimir, doctor habilitat în științe biologice, conferențiar cercetător

DERJANSCHI Valeriu, doctor habilitat în științe biologice, profesor cercetător

NASTAS Tudor, doctor habilitat în științe biologice, conferențiar cercetător

Susținerea va avea loc la **05 noiembrie 2019, ora 10⁰⁰** în cadrul ședinței Consiliului științific specializat **D 411.09-61** din cadrul Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor, str. Pădurii, 20, MD 2002, str. Pădurii 20, Chișinău, Republica Moldova, tel.: (+37322)77 04 47, fax: (+37322)55 61 80, e-mail: institut.gfpp@gmail.com

Teza de doctor și rezumatul pot fi consultate la Biblioteca Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor și pe pagina web a ANACEC. (<http://www.cnaa.md>).

Rezumatul a fost expediat la „_____” _____ 2019

Secretarul științific al Consiliului științific specializat,

BATCO Mihail, doctor în științe biologice,
conferențiar cercetător

Conducător științific,

CIUHRII Mircea, doctor habilitat în științe biologice,
profesor cercetător

Consultant științific,

VOLOȘCIUC Leonid, doctor habilitat în științe biologice,
profesor cercetător

Autor

STÎNGACI Aurelia

(© Stîngaci Aurelia, 2019)

CUPRINS

Repererele conceptuale ale cercetării	4
Conținutul tezei	7
1. Rolul infecțiilor virale în reglarea densității populațiilor de insecte dăunătoare	7
2. Materiale și metode de cercetare	7
2.1. Locul efectuării experimentelor staționare și condițiile climaterice	8
2.2. Obiecte de cercetare în condiții de laborator și câmp	8
2.3. Materiale de cercetare	8
3. Elaborarea mijloacelor baculovirale pentru reducerea densității populațiilor Omizii-păroase-a-dudului (<i>Hyphantria cunea</i> Drury)	10
3.1. Evoluțiile și caracteristicile gradației dăunătorului la culturile decorative, forestiere și agricole	11
3.2. Izolarea, identificarea și determinarea particularităților biologice ale tulpinilor de baculovirusuri la <i>H.cunea</i>	13
3.3. Prognoza dezvoltării Omizii-păroase-a-dudului pe teritoriul Republicii Moldova	14
3.4. Elaborarea procedeele tehnologice de producere a <i>H. cunea</i> în condiții controlate	14
3.5. Elaborarea procedeele biotehnologice de obținere a biomasei virale și constituirea preparatelor biologice de combatere <i>H. cunea</i>	17
3.6. Particularitățile identificării VPN și VG a <i>H. cunea</i> prin aplicarea microscopiei optice și electronice	17
4. Estimarea eficacității preparatului viral Virin-ABB-3 în combaterea Omizii-păroase-a-dudului (<i>Hyphantria cunea</i> Drury)	19
4.1. Determinarea calității și perfecționarea preparatului viral Virin-ABB-3	19
4.2. Evidențierea legităților de declanșare a epizotiilor baculovirale la <i>H. cunea</i>	20
4.3. Testarea preparatului viral în condiții de câmp pentru limitarea densității populației de <i>H. cunea</i>	21
4.4. Evaluarea și perfecționarea metodelor de determinare a calității biomasei baculovirale și a preparatelor biologice	24
5. Concluzii generale și recomandări	25
6. Bibliografie	27

REPERELE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII

Actualitatea temei. Zona temperată oferă condiții favorabile producerii unui spectru larg de culturi, o bogată diversitate de insecte sunt trofic atașate de aceste plante, provocând din punct de vedere economic daune considerabile. Pierderile cauzate de insecte variază în funcție de planta cultivată, zona geografică și metodele de management utilizate. Noile cerințe ale pieței mondiale, orientate spre agricultura ecologică necesită menținerea biodiversității, și crearea agriculturi durabile prin reducerea sau substituirea completă a produselor chimice [3,4].

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 importanți 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 [7, p. 19864-19873], [14]. Din cele 281 de biopesticide disponibile în prezent pe piața 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 [15, 8].

În majoritatea statelor, inclusiv în Republica Moldova insecticidele chimice sunt pe larg utilizate în reglarea efectivului insectelor dăunătoare. Însă, utilizarea acestor preparate este adesea periculoasă din punct de vedere ecologic, sau chiar interzisă (cum ar fi în cazul piretroizilor). Datorită aplicării pe scară largă a insecticidelor, în special a piretroizilor cu spectru larg de acțiune insectele au obținut deja un anumit nivel de rezistență. De asemenea, utilizarea frecventă a piretroizilor și neonicotinoizilor poate provoca efecte negative organismelor benefice ecosistemelor, inclusiv responsabili de polenizarea și controlul natural al dăunătorilor. 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 și substituirea lor cu metode biotehnologice și biologice [16].

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 [2].

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. Toate aceste aspecte, situații și probleme nesoluționate, luate în ansamblu, au determinat domeniul de investigație. Bioinsecticidul nou elaborat – Virin-ABB-3 are efecte ecologice, care se transmit din generație în generație mai mulți ani, reglând densitatea insectelor și, totodată, este absolut inofensiv pentru sănătatea omului.

Cercetările actuale privind patologia insectelor, efectuate pe plan mondial sunt direcționate spre cunoașterea potențialului germenilor entomopatogeni, îndeosebi, a baculovirusurilor. Un criteriu de bază în combaterea virologică constituie capacitatea de conservare a baculovirusurilor care își mențin viabilitatea în natură o perioadă destul de îndelungată și care rezistă mai bine în condiții de păstrare înainte de utilizare. Baculovirusurile, ca agenți naturali, pătrunzând în componența entomocenozelor și fiind transmiși pe cale verticală și orizontală, participă la reglarea densității populațiilor de insecte dăunătoare. Principalul avantaj al baculovirusurilor este că, față de alte mijloace de combatere a dăunătorilor constă în faptul că sunt componente naturale ale ecosistemelor, astfel încât acestea pot fi folosite pentru prevenirea și limitarea dezvoltării diferitor dăunători [5]

Într-un șir de țări se desfășoară cercetări ample în direcția elaborării și implementării largi a mijloacelor de combatere biologică (Canada, S.U.A., China, Japonia, Ungaria, Turcia, România, Italia, Spania, Germania, Rusia, Ucraina, etc.), printre care un loc deosebit revine virusurilor, care urmăresc elucidarea aspectelor de epizootologie a virusurilor poliedrozei nucleare pentru cunoașterea factorilor care favorizează apariția și dezvoltarea epizootiilor virale și activității biologice înalte stau la baza elaborării preparatelor virale.

În rezultatul cercetărilor anterioare s-a elaborat și înregistrat preparatul Virin ABB-3, dar din mai multe considerente, având o formă preparativă imperfectă s-a propus optimizarea acestui preparat. Este necesar ca biopreparatul să corespundă la o serie de condiții: să includă în formulația preparatului substanțe aderente, să fie protector în câmp la acțiunea razelor ultraviolete, să conțină particule ce nu depășesc mărimea dozelor aparatelor de stropit și să formeze o suspensie stabilă.

Au fost optimizate procedeele tehnologice de producere și aplicare a unui ingredient nou, 5% de cărbune activat pentru perfecționarea matricei preparatului și sporirea rezistenței la acțiunea razelor ultraviolete. De asemenea, au fost determinate efectele epizootice a acestui agent biologic, și unele elemente foarte importante, ca evidențierea, izolarea și identificarea a trei sușe de baculovirusuri noi, care sunt mai virulente. Acestea ulterior au fost utilizate în calitate de

mixtura preparatului atât *Virusul Granulozei*, precum și *Virusul Poliedrozei Nucleare* a acestui dăunător, lucru care s-a soldat cu obținerea unui efect sinergetic. Drept rezultat, formele noi obținute se deosebesc în comparație cu prototipul cu depășiri considerabile a indicilor descrise mai sus. Ulterior în baza cercetărilor efectuate au fost determinate răspândirea baculovirusului și întocmirea fișei tehnologice pentru combaterea *H. cunea* la aplicarea pe teritoriul Republicii Moldova a biopreparatului baculoviral la culturile agricole, silvice și decorative în condițiile agroclimaterice. Biopreparatul elaborat este păstrat în pungi vidate, ce oferă termen de păstrare până la 4 ani și mai mult.

Ținând cont de cele expuse **scopul lucrării** a constat în elaborarea, optimizarea unor elemente a procedeele tehnologice de producere și aplicare a preparatelor baculovirale în combaterea *H.cunea*

Pentru realizarea scopului au fost trasate următoarele **obiective**:

1. Izolarea și identificarea tulpinilor de virusuri active în combaterea *H. cunea*;
2. Determinarea relațiilor dintre baculovirusuri (VPN și VG) și insecta-gazdă în vederea elaborării procedeele tehnologice de creștere în masă a larvelor de *H. cunea*;
3. Perfecționarea procedeele biotehnologice de producere a biomasei active în vederea elaborării standardului de calitate a preparatului viral pentru combaterea *H. cunea*;
4. Elucidarea mecanismelor de declanșare a epizootiilor cauzate de către baculovirusuri;
5. Determinarea potențialului baculoviral în limitarea densității populațiilor de *H. cunea* în condiții naturale și controlate.

Ipoteza de cercetare a fost confirmată prin rezultatele obținute, ce constau în optimizarea tehnologiei de producere și aplicare a unui preparat baculoviral, constituit din tulpini noi de virusuri identificate, fiind mai eficient din punct de vedere a activității biologice față de Omida-păroasă-a-dudului (*Hyphantria cunea* Drury).

Sinteza metodologiei de cercetare și justificarea metodelor de cercetare alese a avut la bază realizarea investigațiilor științifice, în condiții de laborator și câmp. Ca metode de cercetare s-au folosit observația și experimentul. Izolarea, identificarea și determinarea particularităților biologice ale izolatelor baculovirale au fost efectuate conform metodelor general acceptate. Pentru izolarea și identificarea agenților biologici au fost utilizate metodele ce se aplică în cercetările entomologice ce vizează protecția plantelor și adaptate la obiectele utilizate în elaborarea mijloacelor alternative de protecție a plantelor [12, 9]. Perfecționarea procedeele tehnologice de producere propuse de către cercetătorii M. Ciuhrii și L. Voloșciuc, a fost efectuată cu aplicarea cultivării *in vivo*, utilizând producerea agenților biologici. S-au utilizat metode de determinare a particularităților morfologice și ultrastructurale ale VG și VPN *H. cunea*, relațiile acestora în celulele insectei-gazdă, optimizarea celei mai avantajoase modalități

de creștere, controlul calității preparatului, omogenizarea materialului biologic, purificarea incluziunilor virale, determinarea concentrației baculovirusurilor în suspensia virală, condiționarea preparatului, aprecierea activității biologice a preparatului. Eficiența tulpinilor de baculovirusuri și a altor produse de uz fitosanitar în combaterea *H. cunea* în condiții de câmp, a fost evaluată conform recomandărilor din literatura de specialitate [6]. Abordările metodologice dezvoltate au permis utilizarea unui set de metode și tehnici de cercetare microbiologică pentru a identifica și izola tulpini de baculovirusuri active în combaterea *H. cunea* și optimizarea metodelor de îmbunătățire a calității preparatelor baculovirale și controlului insectelor dăunătoare, folosind metode statistice și analitice. Ele se bazează pe principiile de optimizare a producerii baculovirusurilor, pe metodele de optimizare și aplicare a modalităților de perfecționare a măsurilor de protecție a plantelor agricole, forestiere și decorative în Republica Moldova. Datele estimate au fost procesate în conformitate cu pachetul Software Microsoft.

CONȚINUTUL TEZEI

În **Introducerea** lucrării se argumentează actualitatea, importanța și necesitatea realizării cercetărilor științifice efectuate, se descrie noutatea științifică a rezultatelor obținute, este reflectată situația actuală în domeniu, sunt formulate scopul, obiectivele studiului, ipoteza de cercetare, sinteza metodologiei de cercetare și justificarea metodelor de cercetare alese.

1.ROLUL INFECȚIILOR VIRALE ÎN REGLAREA DENSITĂȚII POPULAȚIILOR DE INSECTE DĂUNĂTOARE

Compartimentul include sinteza informației expuse în literatură de specialitate, privind acțiunea baculovirusurilor entomopatogene în vederea reglării densității populației *H. cunea*. Succint este caracterizată Omida-păroasă-a-dudului, metodele de diminuare a densității populației și distribuirea geografică acestei specii. Succint sunt redată informații ample referitor analiza situației în domeniul de cercetare, precum istoria, primele cercetări științifice și sinteza cunoștințelor acumulate în domeniul studierii și utilizării baculovirusurilor atât în cadrul programelor de management integrat al dăunătorilor, cât și în agricultura sustenabilă în diferite țări, aspecte istorice și economice ale preparatelor entomopatogene în Republica Moldova.

2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE

Lucrarea include rezultatele științifice în perioada studiilor de doctorat, cât și programului individual de cercetare în cadrul proiectelor instituționale 06.40.22 F “Elaborarea mijloacelor ecologic inofensive în baza microorganismelor utile și a substanțelor biologice active pentru combaterea organismelor dăunătoare în agrocenoze”(2006-2010), 10.04.038 F “Biotehnologia producerii și aplicării preparatelor biologice pentru combaterea organismelor dăunătoare” (2011-2014), precum și în cadrul Grantului pentru tineri cercetători 07.40.29 ”Elaborarea procedeeleor

biotehnologice de producere a metodelor virale și aplicării preparatului baculoviral în combaterea Omizii-păroase-a-dudului (*Hyphantria cunea* Drury) (2007–2008), Bursa de cercetare în memoriam "Mircea Ciuhrii", "Cercetări novatoare privind transmiterea vectorială a baculovirusurilor entomopatogene în combaterea insectelor dăunătoare cu capcanele de lumină și feromonale" (2017). Cercetările au fost efectuate în decursul anilor 2003-2017.

2.1. Locul efectuării experimentelor staționare și condițiile climaterice

Experimentele de câmp s-au desfășurat pe teritoriul Rezervației științifice "Codrii", la Întreprinderea silvo-cinegetică Strășeni, în livada experimentală a Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor, Gospodăria Țaraneasca "Oleg Timciu" (s. Petrunia, r-n Glodeni), livezile de măr la S. C. "Frutex" S.A. Bacău, România, Centrul Științific aplicativ „Insect Farm”, România, Ocolul silvic Snagov, România. Condițiile climaterice din anii incluși în studiu au fost diferite de la an la an și au influențat la răspândirea dăunătorului pe teritoriul Republicii Moldova.

2.2. Obiecte de cercetare în condiții de laborator și de câmp

În experiențele de laborator și câmp au fost aplicate ambele genuri de baculovirusuri (Baculoviridae): *Nucleopolyhedrovirus* și *Granulovirus* [17]. 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 mun. Chișinău, din diferite localități ale Republicii Moldova și din fâșiile forestiere, precum și livada Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor.

2.3. Metode de cercetare

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, procentele 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 modificații ale ei [3,12].

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 reînnoirea sușelor de VG și VPN. Insectele coloniale se infectează, de regulă, prin stropirea buchetelor plantei-gazdă [1, p. 217-227], [2, p. 167-175].

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.

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 [3, 2, 12].

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 produse de către Ciuhrii [2, 12].

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 Adams [13, p. 1837-1850].

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.

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 [11].

3. ELABORAREA MIJLOACELOR BACULOVIRALE PENTRU REDUCEREA DENSITĂȚII POPULAȚIILOR *H.CUNEA*

Tehnologia optimizată de obținere a preparatului baculoviral Virin-ABB-3, utilizat în reducerea populațiilor de *H. cunea*, include mai multe etape, principalele fiind: selectarea materiei prime, care corespunde scopului și destinației de producere și utilizare a preparatului; colectarea biomasei infestate și a ingredientelor preparatului; fabricarea formelor preparative corespunzătoare destinației bioinsecticidului.

Rezultatele expuse oferă soluții pentru unele dintre sarcinile enumerate mai sus. A fost selectată specia de insecte din larvele căreia se obține materia primă pentru preparat, aceasta fiind *H. cunea*, care și reprezintă obiectul cercetărilor. Faza optimă de dezvoltare a insectei, pentru obținerea preparatului baculoviral, a înmulțirii în masa acestuia, este cea a larvelor de vârstă I și a II.

3.1. Evoluțiile și caracteristicile gradației dăunătorului la culturile decorative, forestiere și agricole

În diferite zone ale țării, a fost semnalată *H. cunea*, unde gradațiile au ajuns în faza creșterii numerice, iar infestările au produs înmulțiri în masă a defoliatorului. Studiul a fost realizat în perioada 2006-2017, gradația defoliatorului și-a continuat evoluția ascendentă.

Pentru a urmări evoluția gradațiilor defoliatorului în timp și spațiu, s-au efectuat observații privind caracteristicile calitative și cantitative ale gradațiilor. Analizând starea fitosanitară a masivelor Gospodăriei silvice din raionul Strășeni și liziera de pădure din Rezervația științifică „Codrii” și organizând multiple deplasări în teren în zona de Centru-Chișinău, Grușova, Sângera, Meleșeni, zona de Nord – Corestăuți, raionul Ocnița, Tabani, raionul Briceni, a fost stabilit gradul de răspândire a dăunătorului în Republica Moldova. *H. cunea* a atacat cei mai mulți arbori din zona de Nord, unde gradul de infestare atinge 100%, cum a fost la Brânzei (Edineț) și Glingeni (Fălești) [5].

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 [10].

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 3.1).

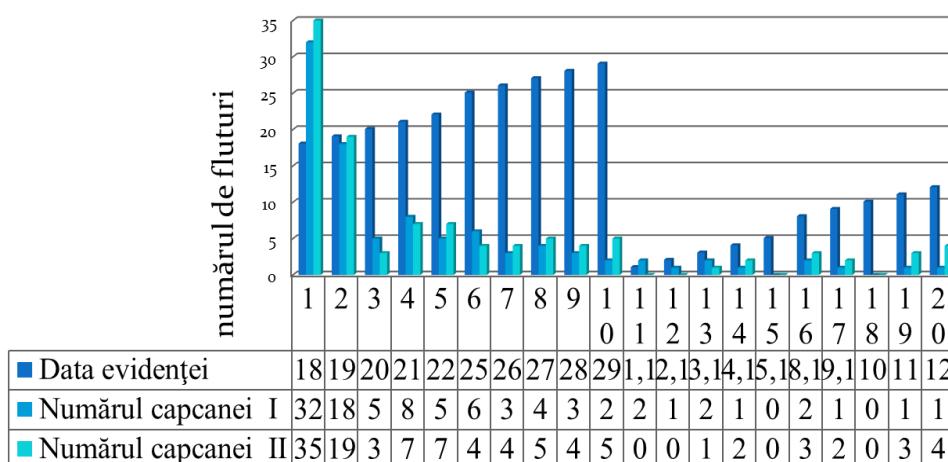


Fig. 3.1. Dinamica numărului de adulți ai speciei *H. cunea*, capturați în capcana feromonală cu lumină, 2010-2013

Rezultatele înregistrate în ultimii ani, cu capturi relativ slabe de fluturi confirmă faptul, că dăunătorul se află la faza de dezvoltare depresivă. Conform rezultatelor obținute, în condițiile Republicii Moldova, în zonele favorabile înmulțirii insectei gradațiile apar, în general, la intervalele mai scurte (4-5 ani) și au o amplitudine mare. În zonele mai puțin favorabile, gradațiile se repetă la intervalele de timp mai mari și, de regulă, sunt de amplitudine mai mică. În arboretele în care apar gradații de *H. cunea*, alături de acumularea în masă a dăunătorului s-a constatat și existența unui complex de factori biotici ai mortalității, printre care un loc deosebit revine microorganismelor entomopatogene [4, 7, 12].

Este adevărat, că de la an la an sau de la o zonă la alta se înregistrează fluctuații ale defoliatorului, fără să se ajungă la densități majore. Perioada atacului a continuat pe tot timpul sezonului de vegetație, fiind mai intens în lunile iunie-august (Figura 3.2).

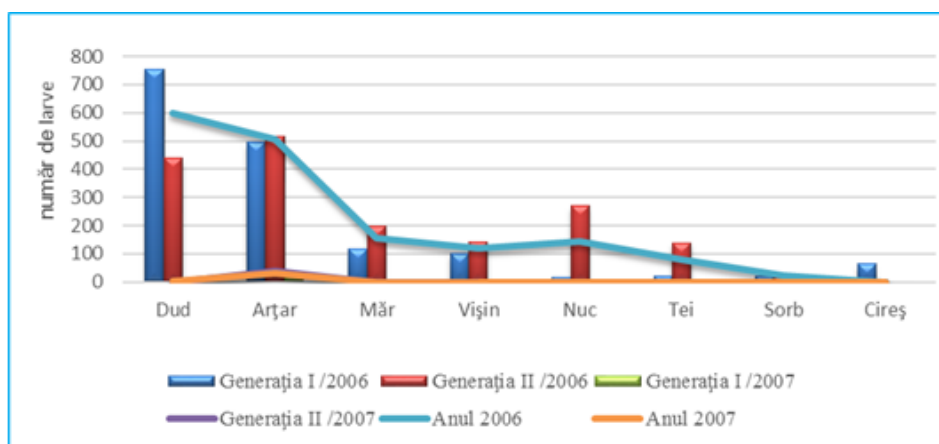


Fig. 3.2. Atacul *H. cunea* pe arbori la diferite specii pe generații/ani

În anii cu primăveri timpurii, în unele zone se remarcă activitatea intensivă a dăunătorilor și în luna aprilie. Dezvoltarea generațiilor prezintă oscilații foarte mari de la an la an și de aceea, nu poate fi considerată unicul criteriu pentru prognozarea apariției primilor fluturi primăvara.

Pronosticul apariției primelor insecte adulte poate fi efectuat numai în mod orientativ și în corelație cu alți factori ai mediului ambiant: umiditatea, fluctuațiile bruste de temperatură, înghețurile, insolația, factorul trofic. În Figura 3.6 perioadele de gradație larvele pot provoca defolieri de diferite intensități, în ambele generații a căror amplitudine depinde de regiunea în care are loc înmulțirea în masă. Conform rezultatelor obținute ambele generații *H.cunea* în anii 2006-2007 cele mai preferate plante erau dudul și arțarul.

3.2. Izolarea, identificarea și determinarea particularităților biologice ale tulpinilor de baculovirusuri la *H.cunea*

În diferite localități ale Republicii Moldova, fâșii forestiere, livezi pomicole experimentale și industriale, precum și în plantațiile decorative de pe teritoriul municipiului Chișinău în anii 2000-2017, s-a efectuat colectarea materialului biologic cu simptome specifice,

virusurile entomopatogene au fost identificate și izolate pe calea sondajelor și monitorizării. Pentru realizarea preparatului viral, predestinat combaterii *H. cunea* s-au realizat investigații orientate spre identificarea unor sușe cu caractere respective din condițiile naturale. Au fost utilizate tulpini atât de VPN, cât și de VG.

Testele de identificare a baculovirusurilor au fost efectuate pentru confirmarea identității agentului patogen din probele prelevate. Ele au stat la baza elaborării schemei tehnologice de obținere a preparatului baculoviral, rezultatele cercetărilor, în cadrul cărora a fost cercetată selecția unor tulpini virulente a baculovirusurilor la specia *H. cunea*, fiind foarte important selecționarea pentru reproducerea activă, înregistrarea și folosirea, în calitate de agent biologic activ. În cercetările noastre am folosit baculovirusuri din trei localități (Tabelul 3.4).

Tabelul 3.4. Izolarea și identificarea tulpinilor de baculovirusuri la *H. cunea*

Nr.	Locul colectării	Agenți patogeni identificați				Aplicarea
		baculo-virusuri	bac-terii	siu-perci	micro-sporidii	
1	Romania, Ocolul silvic Snagov, Romania.	VG	+	+	-	Virin-ABB-3, cercetare,
2	Republica Moldova, Rezervația științifică „Codrii”.	VG	+	+	-	Virin-ABB-3, cercetare,
3	Republica Moldova, Hrușova (Criuleni).	VPN	+	+	-	Virin-ABB-3, cercetare

Au fost identificate la larvele atacate de baculovirusuri simptomele, exprimate printr-o culoare brună-gălbuie. În perioada sondajelor s-a colectat materialul biologic natural pentru izolarea baculovirusurilor din masivele Gospodăriei silvice Strășeni și liziera de pădure din Rezervația științifică „Codrii”, Ocolul silvic Snagov, Romania. De asemenea, au fost întreprinse deplasări în teren, din zona de Centru: Chișinău, Hrușova (Criuleni). Materialul biologic obținut a fost analizat prin aplicarea metodelor microscopiei optice și electronice pentru depistarea baculovirusurilor. În rezultatul aprecierii eficacității biologice al acestor trei sușe de baculovirusuri asupra larvelor dăunătorului *H. cunea* a contribuit la evidențierea și evaluarea tulpinilor noi de virusuri, care ulterior a servit ca suport metodologic în perfecționarea elementelor tehnologice de producere a preparatului viral [9].

Dimensiunile nucleocapsizilor din componența suprapoliviriocapsizilor extrași din larvele moarte de *H. cunea* se caracterizează prin valori medii (215-222×35-38 nm) și coincid cu datele altor investigații științifice.

3. 3. Prognoza dezvoltării Omizii-păroase-a-dudului pe teritoriul Republicii Moldova

În baza acestor studii am întocmit calendarul fenologic de dezvoltare a *H. cunea* pe teritoriul Republicii Moldova. Calendarele fenologice sunt necesare pentru depistarea timpurie a

Omizii-păroase-a-dudului, lichidarea focarelor și prevenirea răspândirii, ceea ce permite de a soluționa unele probleme ecologice, cum ar fi prognozarea relațiilor dintre speciile dăunătorilor și a entomofagilor precum și precizarea termenelor de tratament și a numărului de generații în zonă. Utilizând acest calendar putem anticipa tratamentele de protecție, ceea ce permite nu numai de a pregăti din timp echipamentul necesar, dar și semnalizarea apariției populației locale privind efectuarea tratamentelor. La înlăturarea cuiburilor împăienjenite din coroana arborelor înainte de acest termen, larvele eclozate cu întârziere nu vor fi observate și nu vor fi distruse. Calendarul fenologic oferă posibilitatea de a folosi cele mai adecvate mijloace de protecție împotriva Omizii-păroase-a-dudului, precum și de a efectua combaterea mecanică prin tăierea cuiburilor, înaintea răspândirii larvelor de vârste mari.

3.4. Elaborarea procedeeelor tehnologice de producere a *H.cunea* în condiții controlate

Dezvoltarea bazelor științifice pentru controlul numeric al insectelor, trebuia să se bazeze pe cunoașterea mecanismelor de menținere a homeostaziei populației. Acest lucru este deosebit de important în condițiile reproducerii artificiale, când devine în prim-plan necesitatea de a obține o cantitate mare de material biologic de înaltă calitate. În interiorul populației *H.cunea* există întotdeauna un grup de indivizi care răspund la efectul anumitor factori specifici cu intensitate diferită. Adesea factorii stimulatori ne oferă posibilitatea de adaptare a insectelor la modificările condițiilor de mediu (Tabelul 3.5).

Tabelul 3.5. Dependența manifestării intensității stimulatorilor față de viabilitatea *H.cunea* în dependență de gradația dăunătorului

Gradația dăunătorului	Viabilitatea larvelor, %	Intensitatea manifestării viabilității la diferiți factori, %		
		factorul trofic	factorul termic	factorul fonic
Faza critică a populației	5,6 ± 4, 3	9 ± 3,0	14 ± 3, 3	10 ± 3,1
Faza creșterii populației	71,3 ± 2,8	87 ± 2,0	93,3 ± 1,8	76 ± 2,1

Rezultatele denotă, că indivizii mai sensibili sunt cei ce determină supraviețuirea populației. Pentru a explica manifestarea factorilor specifici la *H. cunea* au fost luate larve la începutul gradației și în faza critică a populației ce au avut diferiți indicatori biologici. Rezultatele au relevat semnificația ($p < 0,001$), viabilității lor în diferite populații. Datele obținute prezentate în Tabelul 3.5 demonstrează viabilitatea larvelor la începutul gradației populației, care a fost 71,3% mai mare comparativ cu larvele din faza de criză. Dependența stabilită are importanță practică, deoarece se știe, că numai larvele de *H. cunea* cu o viabilitate înaltă determină creșterea semnificativă a populației, provocând focare de înmulțire în masă a acestui

dăunător. Astfel, determinând intensitatea excitanților asupra pontelor depuse de *H. cunea*, este posibilă prognozarea dezvoltării populației. Experiențele au fost realizate pe larvele de *H. cunea* colectate din natură. Pentru testarea ipotezelor invocate au fost realizate o serie de sondaje pe baza dependenței stabilite anterior în funcție de viabilitatea larvelor la faza gradației dăunătorului. A fost determinată intensitatea factorului trofic, chimic și fonic al insectelor. În rezultatul studiului, determinând intensitatea excitanților asupra pontelor de *H. cunea* putem prognoza dezvoltarea populației. Au fost colectate insecte de *H. cunea* din populații naturale, având indicatori diferiți în funcție de fazele de gradație a focarului acestui dăunător. S-a demonstrat eficiența înaltă aplicării metodei rapide de selecție a materialului inițial prin determinarea intensității factorului trofic al larvelor pentru crearea unei culturi viabile (Tabelul 3.6).

Tabelul 3.6. Dependența indicilor biologici ai larvelor de *H. cunea* față de intensitatea factorului trofic

Originea populației, faza de dezvoltare a focarului	Intensitatea factorului trofic, % timp de 30 de minute.	Viabilitatea larvelor, %	Greutatea medie a pupei, mg	Prolificatitate medie a femelelor, buc.	Mortalitatea din cauza bolii, %
ÎS Strășeni, faza critică a populației	89±2,8	86,3±1,9	1126±18	420±21	1,2
Rezervația științifică "Codrii", faza creșterii populației	4,8±2,0	2,2±2,4	651±23	29±12	26,2

Ca urmare a studiului acțiunii prolificității și modului de depunere a pontei de oua a *H. cunea* au fost efectuate observații zilnice asupra depunerii pontei, locul și modul de depunere a pontei, numărul de ponte depuse. Cercetările efectuate au demonstrat, că copulația 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 3.3, 3.4).

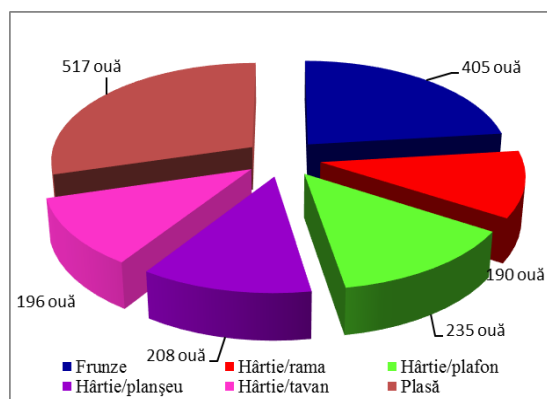


Fig. 3.3. Prolificatitatea medie în funcție de ovipoziție a unei femele colectate în natură și comportamentul de ovipoziție în condiții de laborator

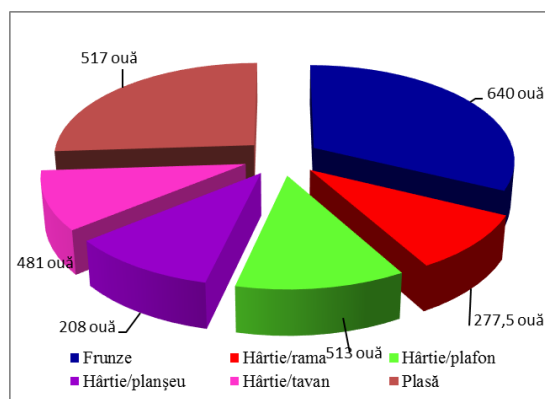


Fig. 3.4. Prolificatitatea medie în funcție de ovipoziție la femelele speciei *H. cunea* crescute pe mediu artificial în condiții de laborator

S-a demonstrat, că aceasta este o adaptare la condițiile nefavorabile. Ouăle sterile se disting prin culoarea galben-portocalie. Ponte 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 ponte 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 ponte 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 înmulțire a insectelor. 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.

3.5. Elaborarea procedurilor biotehnologice de obținere a biomasei virale și constituirea preparatelor biologice de combatere H.cunea

S-a demonstrat, că în componența preparatului viral este necesar să se conțină circa 6×10^9 poliedre. Aceasta a contribuit la obținerea preparatului baculoviral. Tot odată s-a constatat, că pentru obținerea cantității necesare de preparat baculoviral la tratarea unui hectar împotriva larvelor de *H.cunea* sunt necesare circa 5000 de larve virusate. Rezultatele prezentate în figura 3.5 demonstrează, că larvele sunt cu atât mai sensibile la infecție, cu cât stadiul expus este mai mic. Dacă larvele sunt infestate la vârste mici se înregistrează (97,3% la prima vârstă și 94,1% la vârsta a doua) (Figura 3.5).

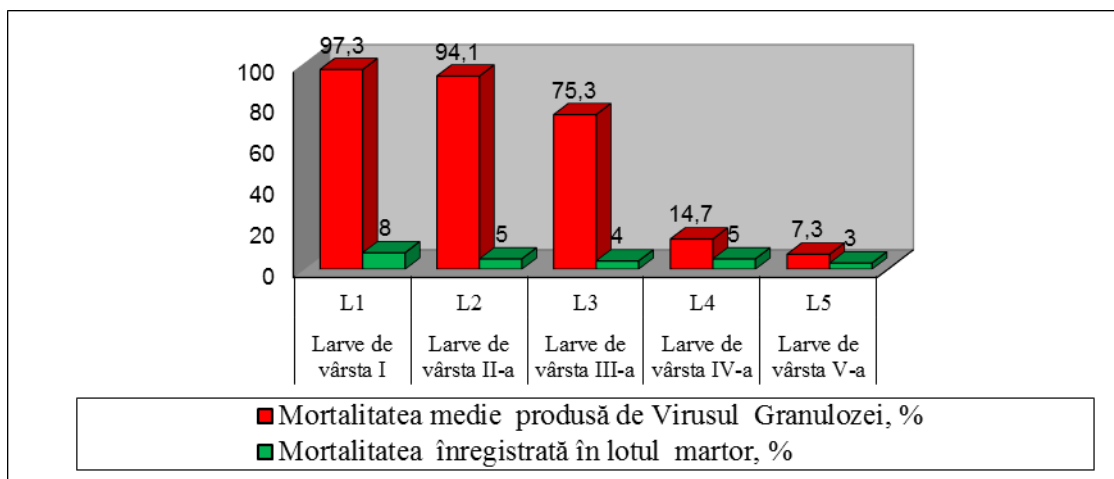


Fig. 3.5. Susceptibilitatea larvelor de *H. cunea* de diferite vârste la infecția cu virusul granulozei în experiență și martor

La vârsta a cincea mortalitatea este foarte redusă (9,3%), apropiată de valoarea mortalității înregistrate în cazul larvelor din varianta martor. Astfel s-a constatat, că mortalitatea la larvele de vârstă mai avansate este foarte redusă, apropiată de cea a larvelor din varianta martor. Acest aspect, are o importanță deosebită când se pune problema utilizării virusului în limitarea densității populațiilor de insecte dăunătoare [5].

3.6. Particularitățile identificării VPN și VG a *H. cunea* prin aplicarea microscopiei optice și electronice

Identificarea baculovirusurilor este indispensabil legată de acumularea informației privind particularitățile structurale și ultrastructurale ale virionilor. Informația cea mai completă și veridică despre structura lor poate fi obținută la aplicarea metodelor microscopiei optice și electronice. Pentru purificarea VPN au fost utilizate mai multe aspecte, printre care și modificarea propusă în cadrul investigațiilor care constă din următoarele etape: Suspensia virală filtrată s-a centrifugat timp de 30 min la 1000 rotații/min în centrifugă ȚLN-2. Precipitatul obținut s-a spălat de 3 ori cu apă. Suspensia obținută a fost supusă centrifugării în gradientul de zaharoză în concentrații de 70-20% la 3000 rotații/min în decurs de 10 min. Zonele cu concentrația de 40-50% s-au acumulat și stratificat în gradientul de 50-60%, iar după 15 min de centrifugare s-au obținut fracții practic pure de SPVC. Pentru identificarea expres a virusului poliedrozei nucleare a dăunătorului *H. cunea* a fost aplicată microscopia optică și electronică, care prezintă rezultate suficiente pentru diagnosticarea, titrarea și determinarea calității biomasei și preparatelor baculovirale (Figura 3.6, 3.7).

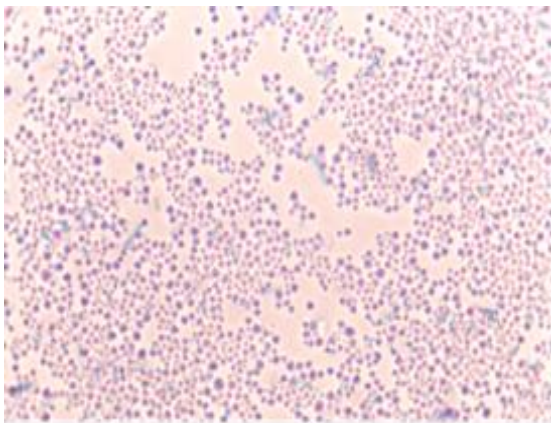


Fig. 3.6. Aspectul Virusului Poliedrozei Nucleare a *H.cunea* în frotiuri colorate cu fuxina și cercetate la microscopul optic (1800^X)

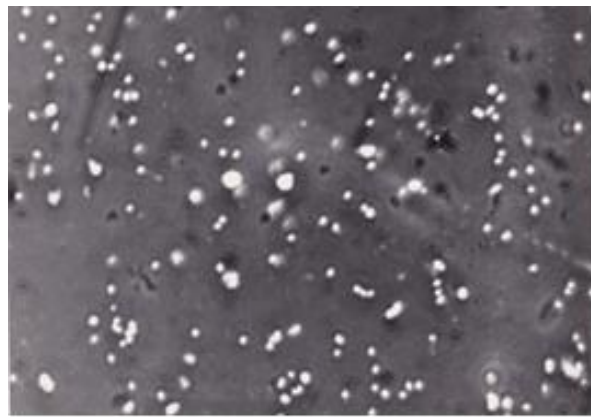


Fig. 3.7. Particularitățile Virusului Granulozei *H.cunea* la vizualizarea la microscopul cu contrast de fază (2000^X)

Pentru purificarea VG au fost verificate un șir de metode, care prevăd aplicarea procedeelelor 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 10-60 % la 13 200 g. Stratul de granule după fracționare s-a spălat pentru eliberarea de zaharoză (Figurile 3.8, 3.9).

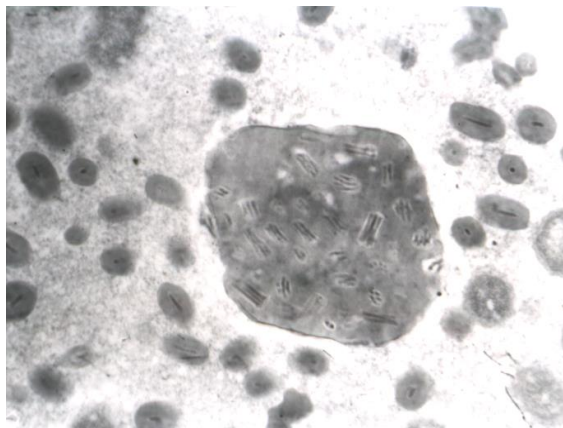


Fig. 3.8. Ultrastructura larvelor de *H.cunea* infectate cu Virusul Poliedrozei Nucleare și Virusul Granulozei în infecția mixtă la această insectă.

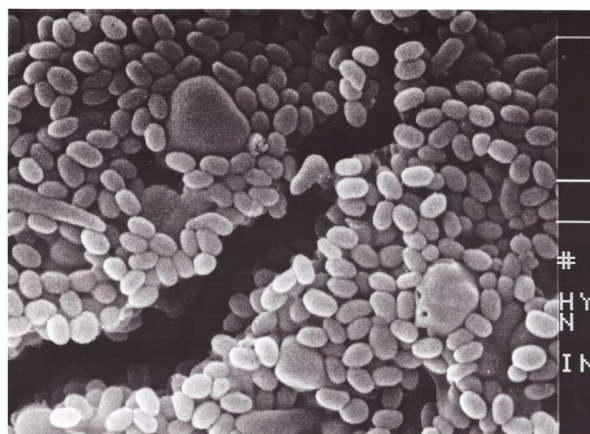


Fig. 3.9. Aspectul morfologic al infecției baculovirale mixte (Granule și Poliedre) la *H.cunea* cercetate la microscopia electronică cu baleiaj

Analiza morfometrică a incluziunilor baculovirusurilor *H.cunea* a demonstrat, că poliedrele VPN caracteristice acestei insecte au dimensiuni medii ($11,2-13,1 \times 0,7-0,8$ mcm), ceea ce corespunde cu rezultatele obținute în cercetările altor savanți [7].

Dimensiunile nucleocapsizilor încadrați în componența suprapoliviriocapsizilor extrași din larvele moarte de *H.cunea* se caracterizează cu valori medii ($215-222 \times 35-38$ 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. Pentru cercetarea particularităților morfologice și biochimice ale 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.

4. ESTIMAREA EFICACITĂȚII PREPARATULUI VIRAL VIRIN-ABB-3 ÎMPOTRIVA OMIZII-PĂROASE-A-DUDULUI (*HYPHANTRIA CUNEA* DRURY)

4.1. Determinarea calității și perfecționarea preparatului viral Virin-ABB-3

Pentru perfecționarea și determinarea calității preparatului viral este foarte important să fie selectată tulpina cea mai activă pentru multiplicare, înregistrare și aplicare. Din larvele moarte a fost reizolat virusul și au fost determinați indicii morfometrici ai granulelor în biomasă și preparatele purificate.

Omogenizarea materialului biologic și izolarea incluziunilor virale. Materia primă biologică pentru realizarea preparatului viral este constituită din larvele de *H. cunea* virozate natural, recoltate din natură în momentul apariției epizootiilor virale. O fază deosebit de importantă în tehnologia de producere a preparatului viral este omogenizarea materialului biologic infectat, din care se realizează extragerea virusului din țesuturile omizilor moarte. A fost obținut material care conține, în anumite proporții, resturi fine din corpul larvelor. Aproximativ un sfert din SVC-urile provenite din țesuturile larvare rămâne în evelina folosită pentru filtrare. Acest material biologic trebuie recuperat, suspendat în apă distilată și filtrat de cel puțin 3 ori.

Purificarea incluziunilor virale. Materialul biologic obținut sub formă de suspensie de poliedre este supus în continuare fie unui proces de purificare, sau filtrare. Cercetările electrono-microscopice a baculovirusurilor din diferite zone, izolate din larvele de *H. cunea*, au permis evidențierea ultrastructurii acestora, și determinarea unui număr de 2-5 nucleocapside/SVC. Secțiunile prin SVC-urile izolate din larvele infectate cu virusul granulozei a pus în evidență faptul că acestea includ o singură nucleocapsidă, mai rar două, în aceeași supraviriocapsidă. A fost perfecționată Schema de obținere a pulberii virale de VPN și VG în stare pură și Schema modificată de purificare a VPN și VG.

Perfecționarea și determinarea calității preparatului viral s-a efectuat pentru asigurarea titrului preparatului la nivel de 6×10^6 poliedre sau granule/ml. Pulberea respectivă s-a amestecat în matricea preparatului, care trebuie să îndeplinească o serie de condiții: să includă substanțe aderente, să asigure rezistentă la acțiunea razelor ultraviolete, particulele să nu depășească

mărimea duzelor aparatelor de stropit, să formeze o suspensie stabilă.

Titrarea baculovirusurilor în suspensia virală. În vederea stabilirii dozelor de preparat viral aplicat în diferite condiții, s-a determinat capacitatea de infestare cu preparatul viral prin metoda titrajului biologic. A fost folosită camera Goreaiev, o tehnică specială de titraj microscopic, utilă în determinarea concentrației de SPVC în materialul uscat.

Determinarea calității finale a agentului activ. În cadrul cercetărilor efectuate privind modul de păstrare a agentului activ într-o formă care să-i mențină intact calitățile inițiale, au fost utilizate trei modalități de condiționare a agentului activ: 1. Suspensie în apă distilată; 2. Pulbere obținută prin atomizare; 3. Pulbere obținută prin liofilizare. Pentru transformarea filtratului în pulbere sterilă de poliedre s-a aplicat atomizarea suspensiei virale cu ajutorul atomizorului de tip Niro de capacitate medie în cadrul Institutului „Insect Farm” din București.

4.2. Evidențierea legăturilor de declanșare a epizootiilor baculovirale la *H.cunea*.

O problemă importantă în patologia insectelor o constituie cunoașterea principiilor, care stau la baza dinamicii îmbolnăvirii populațiilor de dăunători, a caracterului epizootic al agenților patogeni ai bolilor insectelor (Figura 4.1.).

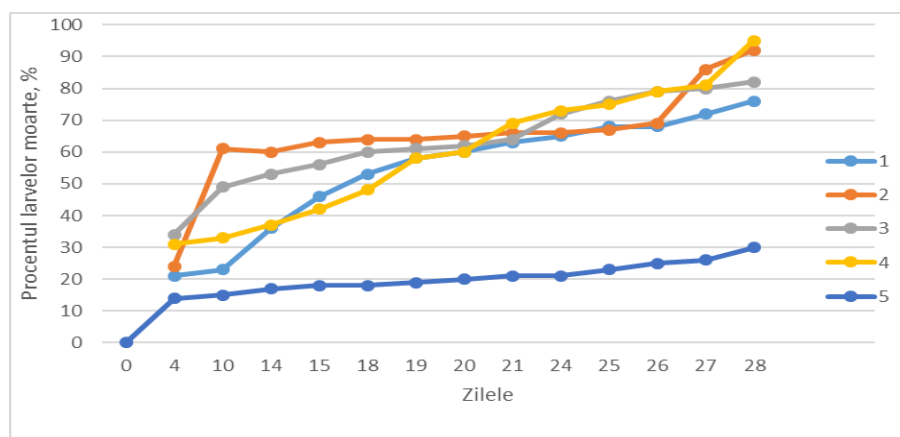


Fig. 4.1. Dinamica mortalității larvelor infectate cu VPN în funcție de modelele de transmitere a patogenului: 1 -varianta 1, modul complex de transmitere a infecției: larve infestate și neinfestate au fost ținute și hrănite împreună; 2 - varianta 2, transmiterea infecției prin cale aeriană: larvele neinfestate s-au păstrat în apropiere, dar fără contact cu larvele infestate; 3 - varianta 3, calea orală de infecție: larvele neinfestate hrănite pe frunze pe care se aflau anterior larve infestate; 4 - martor "+": larve infestate cu virus; 5 - martor "-": larve neinfestate cu virus

Una dintre multiplele cauze care determină stagnarea în domeniul aplicării pe larg a insecticidelor baculovirale este lipsa unor cercetări detaliate în ceea ce privește caracterul epizootic al virusurilor entomopatogeni. Baculovirusurile pot supraviețui numai, dacă acestea sunt protejate de radiația ultravioletă. Astfel, transmiterea pe orizontală din această nișă ecologică, ar putea fi principala cale de transmitere a infecției. Transmiterea pe orizontală este strâns legată de densitatea gazdei și nivelurile de infecție, deși acest lucru poate fi modificat de particularitățile comportamentului insectelor. Densitatea larvelor cu gradație înaltă (în interiorul

populației) este întotdeauna o epizootie. Prezența unor astfel de gradații din cauza agentului patogen se bazează în primul rând pe transmiterea orizontală și persistența virusului [5].

Deosebit de importantă este modelarea căilor de transmitere pe orizontală a infecției virale în populația *H. cunea*, fiind investigate pentru prima dată trei modele posibile de transmitere a virusului de la larvele infestate la cele neinfestate: 1) Larvele infestate și neinfestate au fost ținute și hrănite împreună, asigurând astfel modul complex de transmitere a infecției – prin contact, oral și pe cale aerogenă. 2) Larvele infestate și neinfestate se aflau în nemijlocita apropiere, dar nu se hrăneau împreună, evitând posibilitatea transmiterii infecției prin căile respiratorii. 3) Larvele neinfestate au fost hrănite cu frunzele pe care anterior au fost aflate larvele infestate, accentul fiind pus pe transmiterea orală. Acest lucru denotă faptul, că transmiterea pe orizontală într-o singură generație poate evolua, iar aplicarea unei strategii concrete de transmitere este importantă pentru gestionarea epizootiilor, precum și pentru utilizarea ca agenți de combatere a dăunătorului. Transmiterea pe orizontală evoluează în funcție de condițiile de mediu și de persistența dăunătorului.

4.3. Testarea preparatului viral în condiții de câmp pentru limitarea densității populației de *H.cunea*.

Introducerea virusului pe suprafețe mici se practică cu scopul de a crea focare de infecție virală în păduri, în care dăunătorii nu sunt infectați pe cale naturală. În cazul acestui procedeu, se folosesc cantități reduse de virusuri, deoarece în cazul inducerii proceselor epizootice în populația unui dăunător neafectată de viroză, nu este necesar să se trateze întreaga suprafață infestată. După introducerea virusului pe câteva suprafețe silvice infestate s-au dezvoltat epizootii virale pe o perioadă de 3 ani, care provoacă mortalitatea sporită a larvelor a fost demonstrat, că în anii următori virusul s-a răspândit în natură pe suprafețe mari, păstrându-și capacitatea de infecție și devenind un factor important de reglare a densității populației dăunătorului.

La *H. cunea* manifestarea epizootică a bolii se constată în cazul densității înalte, medii, iar uneori chiar și mici a populației dăunătorului. Aceasta cauzează pieirea în masă a insectei-gazdă în cea mai mare parte a arealului. În cazul constituirii patogenezei baculovirale stabile s-a înregistrat erupția și dezvoltarea epizootică a infecției, care a asigurat reglarea naturală a densității populațiilor dăunătorilor *H. cunea* la un nivel destul de redus. Metoda de introducere a virusului în focare limitate, în scopul declanșării de epizootii, prezintă avantajul din considerentele aplicării cantităților reduse de preparat viral, ce pot fi realizate în laborator, fără

cheltuieli prea mari. Această metodă nu necesită producerea industrială de preparate virale, fiind avantajoasă sub aspect economic (Tabelul 4.1).

Tabelul 4.1. Activitatea biologică a biopreparatului Virin-ABB-3 asupra *H. cunea* pe diferite specii de plante

Cultura	Nr. larve	Concetrat.	Numărul larvelor moarte, zile					Procentul mortalității, zile			Eficacitatea biologică, %
			3	5	7	10	15	5 zi	10 zi	15 zi	
Dud (<i>Morus</i> L.)	40	10 ⁶	0	12	19	34	39	30,0	85,0	97,5	97,3
Arțar (<i>Acer negundo</i> L.)	40	10 ⁶	0	8	16	29	38	20,0	72,0	95,5	95,2
Nuc (<i>Juglans regia</i> L.)	40	10 ⁶	0	6	9	28	38	15,0	70,0	85,0	84,2
Cireș (<i>Cerasus avium</i> L.)	40	10 ⁶	0	5	10	27	32	12,0	65,0	80,0	78,9
Salcâmul (<i>Robinia pseudoacacia</i> L.)	40	10 ⁶	0	2	5	16	30	5,0	40,0	75,0	73,8
Martor	40	10 ⁶	0	0	2	4	4	0	5,0	5,0	-
DEM _{0,05}											3,6

Rezultatele obținute în laborator s-au materializat cu următoarele date. S-a demonstrat, că cea mai ridicată rată de mortalitate a omizilor o are dudul - 97,3%, cea mai scăzută rată de mortalitate o are salcâmul - 73,8%. În baza rezultatelor obținute se poate concluziona, că în cazul acestei metode de combatere, pe lângă dozele de preparat viral, o importanță deosebită o are și alegerea celor mai favorabile momente de tratare, referitor la dezvoltarea larvară și înfrunzirea arborilor. Tratamentele trebuie aplicate numai în perioada, când larvele sunt în primele două vârste de dezvoltare, iar arborii sunt înfrunziți (Tabelul 4.2).

Tabelul 4.2. Eficacitatea biologică a biopreparatului Virin-ABB-3 în diminuarea populației de *H.cunea*, generația I, II

Nr d/r	Variantele	Suprafața, ha	Norma de consum, kg/ha	Generația	Larve în colonii		Eficacitatea biologică, %
					până la 10 zile	după 10 zile	
1	Virin ABB-3 din 2013	6	0,1	I	740	112	84,86
2	Virin ABB-3 din 2014	6	0,1	II	650	231	87,23
3	Lepidocid	4	1,0	I	683	87	87,26
4	Lepidocid	4	1,0	II	518	62	88,0
5	Martor	-		I	620	598	-
6	Martor			II	645	621	-
	DEM _{0,05}						2,9

Datele prezentate în tabelul 4.2 ne demonstrează că, preparatul folosit asigură un efect înalt de 87,23% în combaterea *H. cunea*. Virin ABB-3 stopează creșterea numărului de cuiburi la un arbore și asigură gradul înalt de protecție a culturilor pomicele. Astfel putem concluziona, că în

cazul acestei metode de combatere, pe lângă dozele de preparat viral, o importanță deosebită o are și alegerea celor mai favorabile perioade de tratare, referitor la dezvoltarea larvară și înfrunzirea arborilor. Aplicarea mai tardivă a tratamentelor virologice necesită sporirea cantității preparatului viral, fapt care poate influența negativ eficiența acestor tratamente din punct de vedere economic (Tabelul 4.3).

Tabelul 4.3. Gradul de infectare a *H. cunea* cu baculovirus. Hrană naturală frunze de dud

Varianta	Repetițiile	No. de larve	Virsta larveor	Concetrația poliedre/ml	Ziua mortalității			
					7		15	
					larve moarte	%	larve moarte	%
VG 2011	I	50	II-III	10 ⁵	24	48.0	39	78.0
VG 2012	II	50	II-III	10 ⁵	25	50.0	41	82.0
VPN 2011	I	50	II-III	10 ⁵	26	52.0	37	74.0
VPN2012	II	50	II-III	10 ⁵	27	54.0	40	80.0
VPN±VG (1:1)	I	50	II-III	10 ⁵	28	56.0	46	92.0
VPN±VG (1:1)	II	50	II-III	10 ⁵	28	56.0	44	88.0
CONTROL	I	50	II-III	10 ⁵	0	-	1	4.0
CONTROL	II	50	II-III	10 ⁵	0	-	2	6.6
DEM _{0,05}								3,7

Experiențele de combatere pe scară largă a larvelor defoliatoare cu ajutorul biopreparatului Virin-ABB-3 cu larve contaminate de *H. cunea* pe diferite specii de plante cu aceeași concentrație și același număr de omizi, precum și eficacitatea biologică a devenit o necesitate pentru determinarea eficienței acestuia. În ceea ce privește mortalitatea omizilor pe VG 2011-2012 la a 15 zi a fost de 78-82%, iar la VPN 74-80 %. Dar, la utilizarea ambelor virusuri VG și VPN (1:1), mortalitatea a crescut de la 88% până la 92,0 %. Analizând eficiența biologică a sușelor era la nivelul de 75-92%. Cercetările subliniază faza critică a *H. cunea* și va fi foarte util pentru gestionarea tratamentelor cu baculovirusuri. Menționăm că, tratamentele de protecție trebuie efectuate în timpul eclozării larvelor din ponte. În această perioadă, o parte mică a larvelor este în vârstă a treia, majoritatea populației fiind la vârstă a doua (Tabelul 4.4).

Tabelul 4.4. Eficacitatea biologică a preparatului viral în combaterea *H.cunea*, la mărsoiul *Golden Deliciosus*

Produsul utilizat	Norma de consum, kg/ha	Numărul total de larve	Numărul de larve moarte			Eficacitatea biologică, %
Virin-ABB-3	0,1	418	34	244	140	91,8
Zolone 35 EC	0,2	354	8	276	98	98,0
Decis 2,5 CE	0,03	148	28	34	86	97,3
Martor	-	369	3	271	93	-
DEM _{0,05}						3,6

Rezultatele prezentate în tabelul 4.12 ne denotă, că preparatele aplicate cauzează mortalitatea înaltă a larvelor de *H. cunea*. Eficiența biologică a preparatului Virin-ABB-3 constituie 91,8%. Este evident, că preparatul viral în comparație cu produsele organofosforice (Zolone) și piretroidul Decis asigură o eficiență biologică înaltă. Studiarea detaliată a mecanismelor ce determină caracterul epizootic al baculovirusurilor a permis elucidarea căilor de transmitere pe orizontală și verticală a virusurilor entomopatogene, ceea ce determină lărgirea volumului de producere și a ariilor de aplicare a acestora (Tabelul 4.5).

Tabelul 4.5. Activitatea biologică a suspensiei virale obținute din larvele moarte la diferite zile de la infestarea cu baculovirusuri

Varianta	Concentrația, poliedre/ml	Numărul larvelor	Eficacitatea biologică %
Ziua 3	10^7	100	91,4
Ziua 4	10^7	100	92,8
Ziua 5	10^7	100	96,4
Ziua 6	10^7	100	92,4
Ziua 7	10^7	100	100,0
Ziua 8	10^7	100	93,5
Ziua 9	10^7	100	97,2
Ziua 10	10^7	100	98,3
DEM _{0,05}			1,02

Rezultatele demonstrează diferența dintre indicii activității biologice a biomasei obținute la diferite zile de la infestarea cu baculovirusuri. Deosebiri semnificative ale activității biologice nu s-au observat în cazul aplicării suspensiei virale de aceeași concentrație am obținut eficacitate biologică se află în limitele 91,4%-100% [9].

4.4. Evaluarea și perfecționarea metodelor de determinare a calității biomasei baculovirale și a preparatelor biologice

Pentru determinarea concentrației baculovirusurilor în componența biomasei și a calității preparatelor obținute au fost folosite mai multe metode. Luând în considerare dimensiunile mici ale granulelor (0,1-0,2 mcm), ceea ce se află la limita capacității de rezoluție a celor mai desăvârșite microscopie fotonice, pentru titrarea lor a fost propusă aplicarea microscopiei electronice. E necesar de accentuat, că asupra rezultatelor mai influențează și tipul peliculelor de suport și dimensiunile ecranului sau a plăcilor fotografice. În acest scop a fost aplicată metoda de determinare a potențialului de infecție cu ajutorul microscopiei electronice.

Avantajul metodelor electrono-microscopice constă în posibilitatea determinării stării nucleocapsizilor în masa baculovirală. În numeroase cazuri de aplicare practică a preparatelor virale cu titrul înalt de poliedre, determinat cu ajutorul microscopiei optice, au fost înregistrate rezultate foarte reduse. Analiza ulterioară a secțiunilor ultrafine a demonstrat, că deși titrul

poliedrilor în preparat corespunde prevederilor standardului, totuși în componența lor nucleocapsizii lipsesc (Figura 4.2, 4.3).

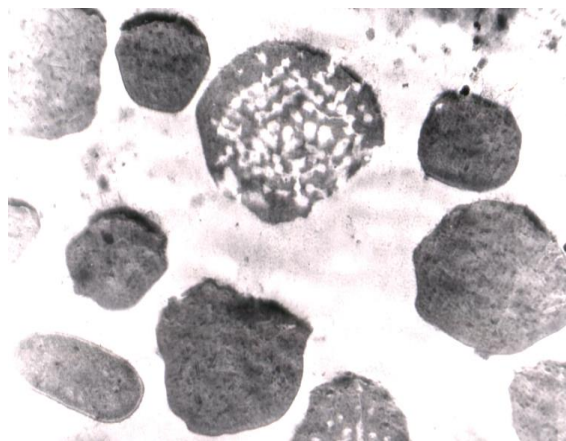


Fig. 4.2. Evidențierea potențialului de infecție a baculovirusurilor cu ajutorul microscopiei electronice. VPN a *H.cunea*, la care se înregistrează distrugerea nucleocapsizilor și supraviriocapsizilor

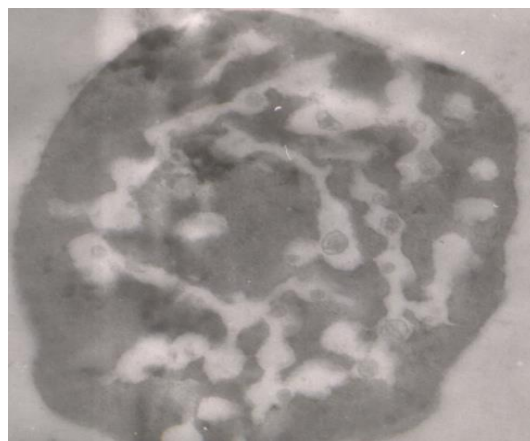


Fig. 4.3. Particularitățile ultrastructurale ale unui poliedru a VPN *H.cunea* din structura preparatului păstrat incorect, iar la examinarea electrono-microscopică unii nucleocapsizi lipsesc.

Aceasta demonstrează, că doar aplicând metodele microscopiei electronice poate fi determinat potențialul de infecție a VPN exprimat în numărul de nucleocapsizi conținuți într-o unitate de volum sau de masă virală. Sub acțiunea condițiilor nefavorabile (fluctuarea nivelului termic și a umidității preparatului, prezența fermenților hidrolitici) pentru păstrarea activității biologice a baculovirusurilor în structura suprapoliviriocapsizilor au fost înregistrate urmări destructive, manifestate prin lipsa elementelor genomice ale virusurilor și prezența unor goluri în locul supraviriocapsizilor înglobați în matricea poliedrilor. Astfel a fost demonstrat, că preparatele, la care au fost prezente asemenea schimbări structurale ale poliedrilor, se caracterizează printr-o activitate biologică redusă în comparație cu preparatele păstrate în condiții optime [7].

CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI PRACTICE

Concluzii generale

1. Au fost izolate, identificate și determinate particularitățile a trei sușe de baculovirusuri, care infectează larvele de *H. cunea* în condițiile Republicii Moldova. Aprecierea eficacității biologice al acestor trei sușe de baculovirusuri asupra larvelor dăunătorului *H. cunea* a contribuit la evidențierea și evaluarea tulpinilor noi de virusuri, care ulterior au servit ca suport metodologic în perfecționarea elementelor tehnologice de producere a preparatului viral (3.2).

2. Au fost evidențiate 124 specii de plante–gază, 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 (3.1).

3. S-a demonstrat, că în componența preparatului viral este necesar s-ă se conțină circa 6×10^9 poliedre. Aceasta a contribuit la obținerea preparatului baculoviral. În același timp s-a constatat, că pentru obținerea cantității de preparat baculoviral necesar la tratarea unui hectar împotriva larvelor de *H.cunea* sunt necesare circa 5000 de larve virusate (3.5).

4. A fost modificată schema tehnologică existentă de obținere a preparatului baculoviral Virin-ABB-3, care este mai optimală în aplicare, iar preparatul obținut este mai eficient în diminuarea densității populației dăunătorului *H.cunea* (4.1, 4.2).

5. Au fost identificate căile principale de transmitere complexă a infecției baculovirale în ecosistemele naturale și stabilit modul de apariție a mecanismelor epizootice al baculovirusurilor în combaterea larvelor de *H. cunea*. Aceasta a contribuit la optimizarea tehnologiilor de aplicare a preparatului baculoviral și determinării locului lui în sistemele integrate de protecție a culturilor agricole, silvice și decorative (4.2).

6. S-a elaborat forma preparativă a preparatului viral Virin-ABB-3 în care matricea componentului principal o constituie zahărul pudră, iar substanța purtătoare – 5% cărbune activ, care atribuie poliedrelor o rezistență mai mare la acțiunea razelor ultraviolete. Astfel, elaborarea corespunzătoare a contribuit la o majorare esențială (până la 4 ani și mai mult) a duratei de păstrare a formei preparative virale (4.1).

7. A fost optimizată tehnologia de multiplicare a larvelor *H.cunea* prin aplicarea metodei influenței selective la diferite niveluri spațiale asupra indicilor biologici a descendențelor, care contribuie la selectarea unor indivizi mai viabili și productivi pentru obținerea materialului calitativ de reproducere (3.4).

8. A fost optimizată tehnologia producerii preparatului baculoviral Virin-ABB-3 prin utilizarea microscopiei electronice în studiul baculovirusurilor, izolați din larvele de *H. cunea*. Astfel a fost elaborată metoda de determinare a potențialului de infecție a VPN și de apreciere a calității preparatului viral (3.6, 4.4).

9. A fost determinat rolul și locul preparatelor baculovirale în sistemul de protecție integrată a plantelor. S-a demonstrat, că aplicarea preparatului viral elaborat, asigură diminuarea populației dăunătorului *H. cunea* cu circa 84,0%-91,8%. Rezultatele obținute au fost implimentate în Rezervația științifică ”Codrii”, gospodăria țărănească ”Oleg Timciu” – pe suprafața de 16 ha [Anexa 6], (4.3, 4.4).

Recomandări practice

1. Promovarea și utilizarea pe scară largă în protecția integrată a culturilor agricole, forestiere și decorative a preparatelor baculovirale pentru reglarea densității speciei dăunătorului *H. cunea*, care pot servi ca bază aplicativă în argumentarea lor ca metodă alternativă celor chimice.

2. Biotehnologia complexă de obținere a preparatului baculoviral Virin-ABB-3 poate fi recomandată pentru producerea industrială a preparatelor biologice în scopul diminuării densității populațiilor de *H. cunea* în cenozele naturale și antropizate.

3. Aplicarea diferențiată a măsurilor de combatere integrată în funcție de faza gradației dăunătorului *H. cunea*, prin utilizarea complexelor (schemelor) cu caracter preventiv în focarele incipiente de înmulțire și a complexelor cu caracter respectiv în focarele în erupție și criză. Se recomandă ca aplicarea preparatului să se realizeze împotriva larvelor de vârste mici, iar doza preparatului la hectar să fie de 9×10^{11} particole/g. Eficacitatea biologică a preparatului baculoviral Virin-ABB-3 pentru diminuarea populației de *H. cunea* se află în limitele de 84-91,8%. Se recomandă efectuarea în perioada de vegetație a 1-2 tratamente împotriva dăunătorului.

BIBLIOGRAFIE

1. BOGULEANU, G., NICA, F., PETRESCU, E., BERATLIEF, C. Influența factorului trofic asupra dezvoltării Omizii-păroase-a-dudului (*Hyphantria cunea Drury*). În: *Analele I.C.P.P.*, 1973, vol. 11, pp. 167-175. ISBN 978-973-703-402-1.
2. CIUHRIL, M., ARMENESCU-CIUHRIL, E. *Virusul spaimă și speranța omenirii*. București: Mirabilis, 2008. 248 p. ISBN 978-973-85972-2-8.
3. VOLOȘCIUC, L.T. *Probleme ecologice în agricultură*. În: Chișinău: Bons Offices, 2009. 264 p. ISBN 978-9975-9774-5-6.
4. VOLOȘCIUC, L.T., JOSU, V., VOLOȘCIUC, E. Agricultura ecologică: realizări, probleme și perspective. In: *International scientific conference "Plant Protection in Conventional and Ecological Agriculture"*, Chișinău, 2018, pp. 135-140.
5. STINGACI, A., CIUHRIL, M. **Cercetări privind evidențierea legităților de declanșare a epizootiilor baculovirale la *Hyphantria cunea Drury***. În: *Genetica, Fiziologia și Ameliorarea Plantelor. Materialele conferinței științifice internaționale*, 9-10 octombrie 2017, Chișinău, 2017, pp. 369-372. ISBN 978-9975-56-463-2.
6. STINGACI, A., CIUHRIL, M. **Abordări noi privitor la controlul calității populațiilor de insecte dăunătoare *Hyphantria cunea Drury* în condiții controlate**. In: *Actual problems of zoology and parasitology: achievements and prospects. Proceedings of the International simpoziu, dedicated to the 100th anniversary from the birth of academician Alexei Spassky, one of the founders of the Academy of sciences of Moldova and of the Parasitological school of the Republic of Moldova*, 13 octombrie. Chișinău, 2017, pp. 334-338. ISBN 978-9975-66-590-2.

7. STÎNGACI A., VOLOȘCIUC, L. **Particularitățile identificării VPN și VG a *Hyphantria cunea* prin aplicarea microscopiei optice și electronice.** In: *International scientific conference "Plant Protection in Conventional and Ecological Agriculture"*, 10-12 decembrie, 2018, Chișinău, 2018, pp. 119-123. ISBN 978-9975-108-52-2.
8. STÎNGACI, A. **Polifagia și combaterea microbiologică a Omizii-păroase-a-dudului (*Hyphantria cunea* Drury) în Republica Moldova.** In: *International scientific conference "Plant Protection in Conventional and Ecological Agriculture"*, 10-12 decembrie, 2018, Chișinău, pp. 69-72. ISBN 978-9975-108-52-2.
9. STÎNGACI, A., VOLOȘCIUC, L. **Evaluarea și perfecționarea metodelor de determinare a calității biomasei baculovirale și a preparatelor biologice.** 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. 596-599. ISBN 978-9975-64-296.
10. 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).
11. ДОСПЕХОВ, Б.А. *Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований)*. Москва: Агропромиздат, 1985. 351 с.
12. ЧУХРИЙ, М.Г. *Биология бакуловирусов и вирусов цитоплазматического полиедроза*. Кишинёв: Штиинца, 1988. 237 с.
13. ADAMS, M. J., et al. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. In: *Archives of Virology*, Springer Science, 2016, vol. 161, pp. 2921-2949. ISSN 0304-8608
14. 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>.
15. *Biopesticides Market by Active Ingredient (Microbials & Biorationals), by Types (Bioinsecticides, Biofungicides, Bioherbicides & 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.marketreportshub.com>.
16. PAPARISTO, A., et. al. Identification of invasive insects in Albania and the assessment of their potential impact to the country biodiversity. In: *Journal of Environmental Protection and Ecology*, Balkan Environmental Association, 2010, vol. 11, nr. 1, pp. 95-111. ISSN 1311-5065.

17. 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.
18. WILLER, H., KILCHER, L (EDS.). The World of Organic Agriculture – Statistics and Emerging Trends, 2017. (citat 5.11.17). ISBN 978-3-03736-040-8. <https://www.organic-world.net/index.html>

Lista publicațiilor la tema tezei

Articole științifice în reviste din străinătate recunoscute

1. STÎNGACI, A. Virin-ABB-3- an efficient lever for agriculture. In: *Universitatea „Al. Ion Cuza” din Iași*, Editure “Ion Ionescu de la Brad” seria Agronomie Iasi, 2008, vol. 51, pp. 1187-1191. ISSN 1454-7376(**Categoria B+**), (p. 1-8).
2. STÎNGACI, A. Some biological, ecological and microbiological control data regarding the attack of the agricultural, ornamental and forest plantations in the republic of Moldova. In: *Oltenia studii și comunicări științele naturii.*, Editure “Oltenia Journal for Studies in Natural Sciences”, România, Craiova, 2012, vol. XXVIII, nr.2, pp. 93-98. ISSN 1454-6914. (**Categoria B+**), (p. 9-16).
3. STÎNGACI, A. Improvng baculoviral preparation for control of the webworm moth (*Hyphantria cunea* Drury). In: *Oltenia studii și comunicări științele naturii.*, Editure “Oltenia Journal for Studies in Natural Sciences”, România, Craiova, 2013, vol. 29, nr. 2, pp. 161-165. ISSN 1454-6914. (**Categoria B+**), (p. 17-24).
4. STÎNGACI, A., VOLOSCHIUC, L., ZAVTONY, P., CLINCIU RADU, ROXANA ALEXANDRINA. Using baculovirus to restore and construct stable natural and antropinated ecosistem for control of the *Hyphantria cunea* Drury. In: *Universitatea „Al. Ion Cuza” din Iași*, Editure „Ion Ionescu de la Brad” seria Agronomie Iasi, 2015, vol.58, nr.1, pp. 69-73 PRINT ISSN: 1454-7414; ELECTRONIC ISSN: 2069-6727. (**Categoria B+**), (p. 25-30).
5. ZAVTONY, P., VOLOSCHIUC, L., STÎNGACI, A., CLINCIU RADU, ROXANA ALEXANDRINA. Baculoviruses in noctuids combatting in organic forming. In: *Universitatea „Al. Ion Cuza” din Iași*, Editure „Ion Ionescu de la Brad”, seria Agronomie Iasi, 2015, vol. 58, nr.1, pp. 79-82 PRINT ISSN: 1454-7414; ELECTRONIC ISSN: 2069-6727. (**Categoria B+**), (p. 31-35).

Articole științifice în reviste din Registrul Național al revistelor de profil, cu indicarea categoriei

1. STÎNGACI, A. Ravagiile cauzate de Omida păroasă dudului (*Hyphantria cunea* Drury) în Moldova și combaterea cu preparatul ecologic pur Virin-ABB-3. In: *Universitatea de Stat din*

Moldova, Editure Studia Universitas Moldviae, Chisinău,, nr.6 (36), 2010, pp. 87-93, ISSN 1857-1735 (**Categoria B+**), (p. 36-43).

2. **STÎNGACI, A.** Virin-ABB-3- O pârghie eficientă agriculturii ecologice. In: *Universitatea de Stat din Moldova*, Editure Studia Universitas Moldviae, Chisinău, n.6 (36), 2010, pp. 82-86, ISSN 1857-1735. (**Categoria B+**), (p. 43-48).
3. **STÎNGACI, A.** Procedeele biotehnologice de producere a preparatelor virale pentru combaterea defoliatorului *H.cunea*. Editure Studia Universitas. In: *Universitatea de Stat din Moldova*, Editure Studia Universitas Moldviae, Chisinău, n.6 (66), 2013, pp. 98-104, ISSN 1814-3237 (**Categoria B+**), (p. 50-57).
4. **STÎNGACI, A.** Using virus to restore and construct stable forest ecosystem for control of the species *Hyphantria cunea* Drury. In: *Journal of Botany*, Chişinău, 2015, VII, nr. 10, pp. 121-125, ISSN 1857-095X. (**Categoria C+**), (p. 57-63).

Articole în lucrările conferințelor științifice internaționale (peste hotare)

1. **СТЫНГАЧ, А.Н.** Бакуловиральный препарат против американской белой бабочки (*Hyphantria cunea* Drury) в республике Молдова). В: *Международная научно-практическая конференция «фитосанитарная безопасность и контроль сельскохозяйственной продукции» бюллетень ВПРС МОББ*, nr. 44, Черновцы, Бояны, 2013, с. 317-322. ISBN-978-617-652-058-0. (p. 68-72).
2. **STINGACI, A. VOLOȘCHIUC, L., ZAVTONI, P.** Bioinsecticides for Ecological control of lepidoptera. Материалы докладов. В: *Международной научно-практической конференции «Биотехнологические системы производства и применения средств биологизации земледелия», посвящённой 45-летию со дня создания ИТИ «Биотехника», Одесса, 3-7 октября 2016, с. 223-225. УДК 632.937ББК 44.1с. ISBN 978-5-903151-54-7. (p. 73-76).*
3. **STINGACI, A., CHIUHRIL, M., VOLOSCHYUK, L., ZAVTONY, P.** Possibilities of bioinsecticides application to restore and construct stable natural and antropinated ecosystem for control of the *Hyphantria cunea* Drury in the Republic of Moldova. В: *Материалы Международной научной конференции, посвященной 85-летию Агрофизического НИИ «Тенденции развития агрофизики: от актуальных проблем земледелия и растениеводства к технологиям будущего», Санкт-Петербург, 27–29 сентября 2017 г, с. 103-107. ISBN 978-5-905200-34-2. (p. 82-87).*

Articole în lucrările conferințelor științifice internaționale (Republica Moldova)

1. **VOLOȘCHIUC, L., ZAVTONI, P., STÎNGACI, A., MAGHER, M., BUȘMACHIU, G., NISTREANU, V., PASCARI, A., CALDARI, V., VOLOȘCHIUC, E.** In: *Biogeocoenotic*

approaches to promote biological protection of plants in Mircea Ciuhrii reserches. International simpozium „Actual problems of zoology and parasitology: achievements adn prospects,, dedicated to the 100th anniversary from the birth of academician Alexei Spassky, one of the founders of the Academy of sciences of Moldova and of the Parasitological school of the Republic of Moldova, Chişinău, 13 octombrie 2017, pp. 63-73. ISBN 978-9975-66-590-2. (p. 149-162).

2. **STÎNGACI, A.;** **CHIUHRII, M.** Evaluarea estimării eficacității insecticide a baculovirusului în combaterea omizii-păroase-a-dudului. In: *Materialele conferinței științifice internaționale: “Agricultura durabilă în Republica Moldova: Provocări și perspective”*, Indigo Color, Bałți, 2017, pp. 352-356. ISBN 978-9975-3156-2-3. (p. 163-166).
3. **STÎNGACI, A.** Particularitățile identificării VPN și VG a *Hyphantria cunea* Drury prin aplicarea microscopiei optice și electronice. In: *Conferința științifică Internațională “Protecția Plantelor în Agricultura Convențională și Ecologică”*, 10-12 decembrie, 2018, pp. 69-72. ISBN 978-9975-108-52-2. (p. 174-179).
4. **STÎNGACI, A.** Polifagia și combaterea microbiologică a Omizii păroase a dudului (*Hyphantria cunea* Drury) în Republica Moldova. In: *Conferința științifică Internațională “Protecția Plantelor în Agricultura Convențională și Ecologică”*, 10-12 decembrie, 2018, pp.119-123. ISBN 978-9975-108-52-2. (p. 167-173).
5. **STÎNGACI, A., VOLOȘCIUC, L.** Evaluarea și perfecționarea metodelor de determinare a calității biomasei baculovirale și a preparatelor biologice. In: *Simpozionul științific internațional ”Horticultura modernă-realizări și perspective” dedicat a 85 de ani de la fondarea Universității Agrare de Stat din Moldova*, Chişinău, 2018, pp. 596-599. ISBN 978-9975-64-296-5. (p. 174-179).
6. **STÎNGACI, A..** Biologia și combaterea microbiologică a Omizii păroase a dudului (*Hyphantria cunea* Drury) 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*, Chişinău, 2018, pp. 633-637. ISBN 978-9975-64-296-5. (p. 180-186).

ADNOTARE

STÎNGACI Aurelia „Biotehnologia producerii și aplicării baculovirusurilor în combaterea *Hyphantria cunea* Drury”. Teza de doctor în științe biologice, Chișinău, 2019.

Teza constă din introducere, patru capitole, concluzii și recomandări, bibliografie din 230 titluri, 6 anexe, 129 pagini de text de bază, 39 tabele, 54 figuri. Rezultatele sunt publicate în 36 lucrări științifice.

Cuvinte-cheie: Omida-păroasă-a-dudului, *Hyphantria cunea* Drury, “Virin ABB-3”, baculovirusuri, VPN, VG, eficacitatea biologică, protecția plantelor, tehnologia de aplicare.

Domeniul de studiu: științe biologice.

Scopul lucrării constă în elaborarea, optimizarea unor elemente a procedeelelor tehnologice de producere și aplicare a preparatelor baculovirale în combaterea *H.cunea*.

Obiectivele lucrării constau în izolarea și identificarea tulpinilor de virusuri active în combaterea *H.cunea*; determinarea relațiilor dintre baculovirusuri (VPN și VG) și insecta-gazdă în vederea elaborării procedeelelor tehnologice de creștere în masă a larvelor de *H.cunea*; perfecționarea procedeelelor biotehnologice de producere a biomasei active în vederea elaborării standardului de calitate a preparatului viral pentru combaterea *H.cunea*; determinarea potențialului baculoviral în limitarea densității populațiilor de *H.cunea* în condiții naturale și controlate; elucidarea mecanismelor de declanșare a epizootiilor cauzate de către baculovirusuri;

Noutatea și originalitatea științifică. Pentru prima dată în Republica Moldova au fost identificate, izolate și caracterizate 3 tulpini de virusuri active. A fost asigurată rezistența baculovirusurilor la acțiunea factorilor abiotici; elaborarea unei metode inovative de transmitere epizootică a baculovirusurilor, creșterea larvelor pe mediu artificial nou și elaborarea elementelor tehnologice de aplicare a preparatului baculoviral în sistemele de protecție integrată a plantelor agricole, forestiere și decorative, care asigură o eficacitate biologică nu mai mică de 91,8 %. Au fost optimizate procedeele tehnologice de producere prin aplicarea în premieră a unui ingredient nou 5% de cărbune activat pentru perfecționarea matricei preparatului și sporirea rezistenței la acțiunea razelor ultraviolete. În primă dată s-a identificat un număr de 124 specii de plante ca substrat trofic pentru creșterea larvelor *H.cunea* în laborator. A fost întocmită o fișă tehnologică pentru combaterea *H. cunea* cu ajutorul preparatului baculoviral pe teritoriul Republicii Moldova. S-a determinat perioada optimă de păstrare a larvelor infestate cu baculovirusuri în punși vidate.

Problema științifică importantă soluționată constă în *fundamentarea științifică* a capacităților baculovirusurilor (VG și VPN) a *H. cunea* de a se reproduce în celulele omizii-păroase-a-dudului, ceea ce a condus la *evidențierea și evaluarea* tulpinilor noi de virusuri identificate, fapt care a servit ca suport metodic pentru perfecționarea tehnologiei de producere a preparatului baculoviral, sporirea eficacității biologice, elaborarea strategiei de aplicare a lui.

Semnificația teoretică. Rezultatele obținute constituie baza elaborării unor noi elemente tehnologice de obținere a unui preparat baculoviral, care are o strategie de stopare a răspândirii dăunătorului *H. cunea*, grație transmiterii orizontale și verticale a agentului patogen, servind în calitate de filtre specifice, fără a infecta alte specii de insecte.

Valoarea aplicativă a lucrării constă în perfecționarea tehnologiei de producere a preparatului viral Virin-ABB-3 ceea ce asigură sporirea calității și eficacității agentului biologic în sistemele de protecție integrată care constituie baza obținerii producției ecologice.

Implementarea rezultatelor științifice. Rezultatele cercetărilor științifice au fost implementate în Rezervația științifică „Codrii”, com. Lozova, r-nul Strășeni, gospodăria țărănească „Oleg Timcu”, s. Petrunia, r-nul Glodeni pe suprafața de 16 ha.

АННОТАЦИЯ

СТЫНГАЧ Аурелия «Биотехнология производства и применения бакуловирозов для регулирования плотности популяции *Hyphantria cunea* Drury». Диссертация доктора биологических наук, Кишинэу, 2019, состоит из введения, 4 глав, выводов, 129 страниц основного текста, 6 приложений, 39 таблиц, 54 рисунков, библиографии из 230 источников. Результаты опубликованы в 36 научных работах.

Ключевые слова: Американская белая бабочка, *Hyphantria cunea* Drury, Вирин АБВ-3, бакуловирусы, ВЯП, ВГ, биологическая эффективность, технология производства препарата.

Область исследований: биологические науки

Цель работы: разработка технологии производства и усовершенствование технологических процессов применения препарата на основе бакуловирусов для снижения численности *H.cunea*.

Задачи: Выделение и идентификация штаммов вирусов для борьбы с *H.cunea*; усовершенствование биотехнологических процессов производства активной биомассы против *H. cunea*; определение взаимосвязи между бакуловирусами (ВЯП и ВГ) и насекомыми-хозяевами для разработки технологии массового разведения личинок *H. cunea*; создание механизмов, вызывающих вспышки заболеваний, вызванных бакуловирусами; определение бакуловирусного потенциала в естественных и контролируемых условиях.

Новизна и научная оригинальность. Впервые в Республике Молдова были выделены, идентифицированы и охарактеризованы три новых активных штамма вируса. Обеспечена устойчивость бакуловирусов к действию абиотических факторов; оптимизированы процессы технологии производства и применения вирусов; рост личинок на новой искусственной среде и разработка технологических элементов применения бакуловирусного препарата в интегрированных системах защиты сельскохозяйственных, лесных и декоративных растений, обеспечивающих биологическую эффективность 91,8%, разработка инновационного метода эпизоотической передачи бакуловирусов для снижения плотности *H. cunea*, применение нового ингредиента - 5% активированного угля, разработан протокол применения вирусного препарата против *H. cunea*; идентифицированы 124 вида растений в качестве трофического субстрата для разведения насекомых в лабораторных условиях, установлен оптимальный срок хранения личинок, зараженных бакуловирусами в вакуумных пакетах.

Решенная важная научная проблема состоит в научном обосновании способности бакуловирусов (ВГ и ВЯП), инфицирующих *H. cunea* воспроизводиться в клетках американской белой бабочки, что способствовало к разработке и усовершенствованию технологии производства и применения бакуловирусов с использованием новых штаммов, факт позволяющий повысить биологическую эффективность вирусного препарата и разработать стратегию его применения в борьбе с вредителем.

Теоретическая значимость. Полученные результаты составляют основу разработки технологии получения нового биологического препарата, способного сдерживать распространение *H. cunea* благодаря горизонтальной и вертикальной передаче патогена и подтверждают, что бакуловирусы инфицирующие *H. cunea*, являются специфическими и не заражают другие виды насекомых.

Практическая ценность работы. Улучшенная технология производства вирусного препарата Вирин-АБВ-3, обеспечивает повышение качества биологического продукта и способствует усилению его эффективности и позволяет получать экологически чистую продукцию в интегрированной системе защиты растений.

Внедрение научных результатов. Результаты научных исследований были внедрены в научном заповеднике "Кодрий", ком. Лозовая, Страшенский район, в хозяйстве "Олег Тимчу" с. Петруня, Глоденский район на площади 16 га.

ABSTRACT

STINGACI Aurelia „, Biotechnology of production and use of baculoviruses to regulate the density of the population of *Hyphantria cunea* Drury”: PhD thesis in biology, Chisinau, 2019. The thesis contains 129 pages of main text, introduction, 4 chapters, conclusions and recommendations, bibliography of 230 titles, 6 appendixes, 39 tables, 54 figures. The results are published in 36 scientific works.

Key words: Fall webworm, *Hyphantria cunea* Drury, Virin-ABB-3, viral preparation, VPN, VG, biological efficiency, plant protection, technology for production and application.

Field of study: biological sciences.

Aim of research: Elaboration of production technology and improvement of the technological processes of the preparation on the basis of baculoviruses in the *H. cunea* control.

Objectives: Isolation and identification of viruses strains for *H.cunea* control; improvement of biotechnological procedures of the biomass production, active against *H. cunea*; determination of relations between baculoviruses (VPN and VG) and the insect-host for *H. cunea* larvae mass rearing; creation of the mechanisms causing the virus diseases outbreaks; determination the baculoviruses potential both under natural and artificial conditions.

Scientific novelty and originality: For the first time in the Republic of Moldova, three of active new viruses strains were indentificated, isolated and characterized. The technological procedures for production and the viral products application were optimized and elaboration of the method of epizootic transmission of baculoviruses, optimized processes for the production and use of viruses, the growth of larvae on a new artificial diet and the elaboration of the technological elements of applying the baculoviral preparation in the integrated systems of protection of agricultural, forestry and decorative plants ensuring a biological efficiency of 91,8%. In order to reduce *H. cunea* population density by utilizing a new ingredient (5% of active carbon). The protocol for application of the viruses preparation against *H. cunea* control was elaborated. The indentificated 124 plant species as a trophic in the laboratory condition. The optimal term for preservation in the vacuum bags of larvae, infected with baculoviruses was established.

The important scientific problem solved in the respective domain consists in *scientific substantiation* of the baculoviruses (VPN is VG) capacities of the pest *H. cunea* to reproduce in the cells of the Fall Webworm *which led to* the elaboration and improvement of the technology of production and application of the new strains of baculoviruses and *allowed to increase* the biological efficiency of the viruses preparation and to elaborate the strategy for its application.

Theoretical significance: The results obtained are the basis for the elaboration of the technology for producing of the new biopreparation which possesses a strategy for preventing of *H. cunea* spreading thanks to horizontal and vertical transmission of the pathogen serving as specific filters and do not infect other insects species.

Aplication value of the work: It consist in improvement of producing and application the viral preparation Virin-ABB-3. Increased preparation quality contributes to its efficacy and allows to obtain ecologic pure products and to use it in the integrated systems for plant protection.

Implementation of scientific results: The results of the scientific researches were implemented in the "Codrii" scientific reserve, Lozova com., Straseni district, the peasant farm "Oleg Timcu" s. Petrunia, the Glodeni district on the 16 ha area.

STÎNGACI AURELIA

**BIOTEHNOLOGIA PRODUCERII ȘI APLICĂRII
BACULOVIRUSURILOR ÎN COMBATEREA *HYPHANTRIA*
*CUNEA DRURY***

411.09 – Protecția plantelor

Rezumatul tezei de doctor în științe biologice

Aprobat spre tipar: 17.09.2019

Hirtie offset 80 gr/m²

Coli de tipar: 2,0

Tipografia: „PRINT-STUDIO”

Formatul hîrtiei: 21x30

Tiraj: 50 ex.

Comanda nr. 28384

SRL „PRINT-STUDIO”
mun. Chișinău, str. V. Lupu, 89