

**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

Teză de doctor în științe biologice

Conducător științific:

CIUHRII Mircea,

doctor habilitat în științe biologice,
profesor cercetător

Consultant științific:

VOLOȘCIUC Leonid,

doctor habilitat în științe biologice,
profesor cercetător

Autorul:

STÎNGACI Aurelia

CHIȘINĂU, 2019

© Stîngaci Aurelia, 2019

CUPRINS

ADNOTARE (română, rusă, engleză).....	5
LISTA TABELELOR.....	8
LISTA FIGURILOR.....	10
LISTA ABREVIERILOR.....	12
INTRODUCERE.....	13
1. ROLUL INFECȚIILOR VIRALE ÎN REGLAREA DENSITĂȚII POPULAȚIILOR DE INSECTE DĂUNĂTOARE.....	22-47
1.1. Particularitățile de dezvoltare a Omizii-păroase-a-dudului (<i>Hyphantria cunea</i> Drury) și impactul ei asupra plantelor de cultură.....	22
1.2. Strategiile de control a populației <i>H. cunea</i>	25
1.3. Controlul biologic asupra dăunătorului <i>H. cunea</i>	26
1.4. Virusurile entomopatogene – reglatori naturali ai densității populațiilor de insecte	30
1.5. Particularitățile baculovirusurilor – ca agenți biologici de protecție a plantelor.....	34
1.6. Perspectivile înregistrate în domeniul utilizării virusurilor entomopatogene.....	40
1.7. Producerea și aplicarea preparatelor virale comerciale.....	43
1.8. Tehnologia de producere și formularea preparatelor baculovirale.....	47
2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE.....	53-61
2.1. Locul efectuării experiențelor staționare și condițiile climaterice.....	53
2.2. Obiecte de cercetare în condiții de laborator și câmp.....	53
2.3. Metode de cercetare.....	54
2.4. Determinarea numărului de poliedre.....	60
2.5. Obținerea biomasei virale.....	61
3. ELABORAREA MIJLOACELOR BACULOVIRALE PENTRU REDUCEREA DENSITĂȚII POPULAȚIILOR OMIZII-PĂROASE-A-DUDULUI (<i>Hyphantria cunea</i> Drury).....	64-102
3.1. Evoluțiile și caracteristicile gradației dăunătorului la culturile decorative, forestiere și agricole.....	64
3.2. Izolarea, identificarea și determinarea particularităților biologice a tulpinilor de baculovirusuri la <i>H. cunea</i>	69
3.3. Prognoza dezvoltării Omizii-păroase-a-dudului pe teritoriul Republicii Moldova..	72
3.4. Elaborarea procedeelor tehnologice de producere a <i>H. cunea</i> în condiții controlate.....	74

3.5. Elaborarea procedeelor biotehnologice de obținere a biomasei virale și constituirea preparatelor biologice de combatere <i>H. cunea</i>	95
3.6. Particularitățile identificării VPN și VG a <i>H. cunea</i> prin aplicarea microscopiei optice și electronice.....	97
3.7. Concluzii la capitolul 3.....	102
4. ESTIMAREA EFICACITĂȚII PREPARATULUI VIRAL VIRIN-ABB-3 ÎN COMBATEREA OMIZII-PĂROASE-A-DUDULUI (<i>HYPHANTRIA CUNEA</i> DRURY).....	104-128
4.1. Determinarea calității și perfecționarea preparatului viral Virin-ABB-3.....	104
4.2. Evidențierea legităților de declanșare a epizotilor baculovirale la <i>H. cunea</i>	115
4.3. Testarea preparatului viral în condiții de câmp pentru limitarea densității populației de <i>H. cunea</i>	121
4.4. Evaluarea și perfecționarea metodelor de determinare a calității biomasei baculovirale și a preparatelor biologice.....	125
4.5. Concluzii la capitolul 4.....	128
CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI.....	128
BIBLIOGRAFIE.....	131
ANEXE.....	154
Anexa 1. Spectrul culturilor atacate de <i>H. cunea</i> în diferite țări.....	154
Anexa 2. Specii de insecte controlate cu ajutorul virusurilor.....	156
Anexa 3. Specii de plante atacate în condiții naturale de <i>H. cunea</i> sau acceptate experimental în laborator ca gazde pentru creșterea larvelor de <i>H. cunea</i>	159
Anexa 4. Familiile și alte unități taxonomice ale virusurilor entomopatogene.....	162
Anexa 5. Siturile de colectare a Omizii-păroase-a-dudului (<i>H. cunea</i>) în Republica Moldova.....	163
Anexa 6. Acte de implementare.....	164
DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII.....	166
CURRICULUM VITAE.....	167

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, 130 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 procedeele 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 procedeele tehnologice de creștere în masă a larvelor de *H.cunea*; perfecționarea procedeele 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 primieră s-a identificat un număr de 124 specii de plante ca substrat trofic pentru creșterea larvelor *H.cunea* în laborator. A fost elaborată fișă tehnologică pentru combaterea *H. cunea* cu ajutorul preparatului baculoviral pe teritoriul Republicii Moldova. S-a determinat perioada optimă de păstrare a larvelor infectate cu baculovirusuri în pungi 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 trăsmiterii 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 și aplicării.

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, 130 страниц основного текста, 6 приложений, 39 таблиц, 54 рисунков, библиографии из 230 источников. Результаты опубликованы в 36 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-АВВ-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 130 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.

LISTA TABELELOR

Denumirea tabelelor	Pag.
Tabelul 1.1. Distribuția geografică a dăunătorului <i>H. cunea</i> în spațiul European și Asiatic	23
Tabelul 1.2. Preparatele bacteriene utilizate anterior în Republica Moldova	30
Tabelul 1.3. Tipuri de virusuri la insecte	31
Tabelul 1.4. Cota vânzărilor estimate la nivel mondial pentru agenții de control pe bază biologică, anul 2016	43
Tabelul 1.5. Biopreparate virale produse pe scară largă, folosind sistemul de producere in vivo	45
Tabelul 1.6. Testarea a virusurilor patogene în combaterea <i>H. cunea</i>	46
Tabelul 3.1. Gradul de infestare a speciilor de arbori cu larvele de <i>H. cunea</i>	65
Tabelul 3.2. Izolarea și identificarea tulpinilor de baculovirusuri la <i>H. cunea</i>	69
Tabelul 3.3. Calendarul fenologic al eclozării pontelor începutului incubăției larvelor de <i>H. cunea</i> și data recomandată de efectuare a tratamentelor cu Virin ABB-3 în funcție de datele reale a ovipoziției și de condițiile climatice	73
Tabelul 3.4. Dependența manifestării intensității stimulatorilor față de viabilitatea <i>H. cunea</i>	75
Tabelul 3.5. Dependența manifestării intensității stimulatorilor față de viabilitatea <i>H. cunea</i> în funcție de gradația dăunătorului	76
Tabelul 3.6. Dependența indicilor biologici ai larvelor de <i>H. cunea</i> față de intensitatea factorului trofic	77
Tabelul 3.7. Variabilitatea lungimii corpului la fluturii de <i>H. cunea</i> în funcție de factorul trofic (generația I-a)	79
Tabelul 3.8. Indicatorii morfometrici ai adulților de <i>H. cunea</i> crescuți pe diferite substraturi nutritive	80
Tabelul 3.9. Efectul temperaturii și umidității asupra dezvoltării pontelor	82
Tabelul 3.10. Influența umidității asupra duratei de dezvoltare a stadiului de crisalidă	82
Tabelul 3.11. Dependența duratei incubăției ouălor de <i>H. cunea</i> de valorile temperaturii din camera de incubăție	84
Tabelul 3.12. Viabilitatea pontelor depuse de femelele de <i>H. cunea</i> colectate în condiții de laborator	85
Tabelul 3.13. Viabilitatea pontelor depuse de femelele de <i>H. cunea</i> colectate în condiții de câmp	86
Tabelul 3.14. Influența hranei asupra longevității adulților de <i>H. cunea</i> crescuți în condiții controlate	87
Tabelul 3.15. Indicii biologici ai <i>H. cunea</i> în funcție de preferințele împupării	94
Tabelul 3.16. Timpul necesar pentru obținerea a 1000 de adulți de <i>H. cunea</i> în cele două variante, în condiții de laborator	94
Tabelul 3.17. Dependența viabilității descendenților larvelor de <i>H. cunea</i> de densitatea lor în generația parentală	95
Tabelul 3.18. Durata de păstrare a larvelor de <i>H. cunea</i> virusate în funcție de metoda utilizată la păstrare	97
Tabelul 4.1. Componentele matricei preparatului viral Virin-ABB-3	112
Tabelul 4.2. Determinarea principalilor indici tehnologici ai componentelor matricei preparatului viral	112
Tabelul 4.3. Indicii principali ai preparatului Virin-ABB-3	117

Tabelul 4.4. Activitatea biologică a baculovirusurilor în diferite forme preparative	113
Tabelul 4.5. Dimensiunile supraviriocapsidelor virale izolate din larvele de <i>H. cunea</i> infectate cu virusul granulozei	114
Tabelul 4.6. Determinarea valorilor TL50 la diferitele vârste ale larvelor în rezultatul tratamentului cu preparatul viral	119
Tabelul 4.7. Activitatea biologică a biopreparatului Virin-ABB-3 asupra <i>H. cunea</i> pe diferite specii de plante	120
Tabelul 4.8. Activitatea biologică a baculovirusului nou asupra <i>H. cunea</i> la aplicarea frunzelor de dud	120
Tabelul 4.9. Eficacitatea tratamentelor cu preparat viral în combaterea omizilor de <i>H. cunea</i> în arboret, stabilită la ultimul control al mortalității	121
Tabelul 4.10. Eficacitatea tratamentelor cu preparat viral stabilită în funcție de densitatea pontelor de ouă	122
Tabelul 4.11. Eficacitatea biologică a preparatului Virin-ABB-3 în diminuarea populației de <i>H. cunea</i> , generația I, II	122
Tabelul 4.12. Eficacitatea biologică a preparatului viral în combaterea <i>H. cunea</i> la măr, soiul <i>Golden Deliciosus</i>	123
Tabelul 4.13. Activitatea biologică a suspensiei virale obținute din larvele moarte la diferite zile de la infectarea cu baculovirusuri	123
Tabelul 4.14. Fișa tehnologică pentru combaterea <i>H. cunea</i> cu preparatul viral Virin-ABB-3 pe teritoriul Republicii Moldova	124

LISTA FIGURILOR

Denumirea figurilor	Pag.
Figura 1.1. Aria de răspândire a <i>H. cunea</i> pe Terra	22
Figura 1.2. Aspectul general al poliedrilor examinate la microscopul electronic cu baliaj (Hughes și Adison, 1986)	33
Figura 1.3. Proportia de specii pentru familia Baculoviridae	34
Figura 1.4. Dendrograma evoluției familiei Baculoviridae	35
Figura 1.5. Fenotipuri de baculovirusuri	37
Figura 1.6. Structura schematică a baculovirusurilor (VG și VPN)	37
Figura 1.7. Schema procesului de infecție a unui baculovirus după pătrunderea în epiteliul intestinului mediu al larvei infectate	42
Figura 3.1. Dinamica numărului de adulți ai speciei <i>H. cunea</i> , capturați în capcana feromonală cu lumină, 2010-2015	66
Figura 3.2. Adulții de <i>H. cunea</i> cu aripile de tonalitate albă (♂, ♀)(a, b), 2013	67
Figura 3.3. Aspectul general al diferitor ponte (a,b) de <i>H. cunea</i> , 2013	67
Figura 3.4. Aspectul general al larvelor (a) și eclozarea ponteii de <i>H. cunea</i> (b), 2014	67
Figura 3.5. Capcane feromonale cu lumină (a, b) pentru capturarea <i>H. cunea</i>	68
Figura 3.6. Atacul <i>H. cunea</i> pe arbori la diferite specii pe generații/ani	68
Figura 3.7. Raportul dintre sexe la <i>H. cunea</i> , crescute pe diferite specii de plante pe parcursul sezonului 2007	78
Figura 3.8. Indicele sexual la pupele de <i>H. cunea</i> în funcție de factorul trofic	80
Figura 3.9. Adulții (♀) în timpul înmulțirii <i>H. cunea</i> (a, b), 2014	80
Figura 3.10. Depunerea ponteii de către femela <i>H. cunea</i> , (a, b), 2013	81
Figura 3.11. Prolificitatea medie a unei femele colectate din câmp și comportamentul de oviposiție în condiții de laborator	83
Figura 3.12. Prolificitatea în funcție de oviposiție la femelele speciei <i>H. cunea</i> crescute în condiții de laborator pe mediu artificial	84
Figura 3.13. Aspect privind atacul larvelor de <i>H. cunea</i> pe plop (a, b) 2007-2008	88
Figura 3.14. Aspect privind atacul larvelor de <i>H. cunea</i> pe viță-de-vie (c, d) 2012	88
Figura 3.15. Particularitățile atacului larvelor de <i>H. cunea</i> pe gutui (e) și salcie (f), 2012	88
Figura 3.16. Aspect privind atacul larvelor de <i>H. cunea</i> pe măr (j, h) 2007-2008	89
Figura 3.17. Aspect privind atacul larvelor de <i>H. cunea</i> pe vișin (l) și prun (m) 2007-2008	89
Figura 3.18. Scheletarea aparatului foliar la atacul larvelor de <i>H. cunea</i> pe arțar (n,o), 2012	89
Figura 3.19. Particularitățile scheletării cauzate de larvele <i>H. cunea</i> pe arțar (p, r), 2014	90
Figura 3.20. Atacul larvelor de <i>H. cunea</i> pe lemn cânesc (<i>Ligustrum vulgare</i>) (s, t)	90
Figura 3.21. Atacul larvelor de <i>H. cunea</i> pe stejar brumariu (<i>Quercus pedunculiflora</i>) (g, h)	90
Figura 3.22. Atacul larvelor de <i>H. cunea</i> pe platan (<i>Platanus</i> sp.), (i, j)	91
Figura 3.23. Atacul larvelor de <i>H. cunea</i> pe nuc (k) și pe tei (l)	91
Figura 3.24. Atacul larvelor de <i>H. cunea</i> pe dud (m, n)	91
Figura 3.25. Aplicarea biopreparatului baculoviral contra larvelor <i>H. cunea</i> (a) aflate pe frunze de dud (b)	92
Figura 3.26. Aspectul exterior al viivierei și larvelor (c, d) pentru acumularea biomasei baculovirale de <i>H. cunea</i> , 2014.	93
Figura 3.27. Creșterea în condiții dirijate (a, b, c) a larvelor de <i>H. cunea</i> ca sursă de obținerea preparatelor virale, 2012	93

Figura 3.28. Susceptibilitatea larvelor de <i>H. cunea</i> de diferite vârste la infecția cu virusul granulozei în lotul experimental (a) și în lotul martor (b)	96
Figura 3.29. Aspectul virusului poliedrozei nucleare la <i>H. cunea</i> în frotiuri colorate cu fuxina și cercetate la microscopul optic (1800X)	99
Figura 3.30. Particularitățile virusului granulozei la <i>H. cunea</i> la microscopul cu contrast de fază (2000X)	100
Figura 3.31. Particularitățile morfologice ale granulelor la <i>H. cunea</i> cercetate la contrastarea pozitivă cu uranil acetat (21500X)	100
Figura 3.32. Particularitățile morfologice ale granulelor la <i>H. cunea</i> cercetate în secțiunile ultrafine la microscopul electronic cu transmisie (20000X)	101
Figura 3.33. Ultrastructura larvelor de <i>H. cunea</i> infectate cu virusul poliedrozei nucleare și virusul granulozei în infecția mixtă la această insectă	101
Figura 3.34. Particularitățile morfologice ale infecției baculovirale mixte (Granule și Poliedre) la <i>H. cunea</i> cercetate la microscopul electronic cu baleaj	102
Figura 4.1. Schema de obținere a pulberii virale de VPN și VG în stare pură	105
Figura 4.2. Schema modificată de purificare a VPN și VG	106
Figura 4.3. Schema tehnologică a variantei I de producere a preparatului Virin-ABB-3	108
Figura 4.4. Schema tehnologică a variantei II de producere a preparatului Virin-ABB-3	109
Figura 4.5. Schema tehnologică a variantei III de producere a preparatului Virin-ABB-3	110
Figura 4.6. Particularitățile larvei virusate (a) și colectate pentru cercetări (b)	111
Figura 4.7. Acumularea larvelor virusate (c) în timpul experimentelor și colectate pentru cercetări (d)	111
Figura 4.8. Pregătirea preparatului viral Virin-ABB-3 pentru titrare (e) și conservare (f)	111
Figura 4.9. Trasmiterea pe orizontală și verticală a virusului granulozei și poliedrozei la <i>H. cunea</i>	117
Figura 4.10. Dinamica mortalității larvelor infectate cu VPN în funcție de modelele de transmitere a patogenului	118
Figura 4.11. Evidențierea potențialului de infecție a baculovirusurilor cu ajutorul microscopiei electronice. VPN la <i>H. cunea</i> care în microscopul optic par a fi normali, iar la examinarea elecrono-microscopică a unii nucleocapsizi lipsesc	127
Figura 4.12. Particularitățile ultrastructurale ale unui poliedru a VPN <i>H. cunea</i> din structura preparatului păstrat incorect, la care se înregistrează distrugerea nucleocapsizilor și supraviriocapsizilor	128

LISTA ABREVIERILOR

ABB	<i>H. cunea</i>
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
CL ₅₀	concentrația letală ce asigură 50% de mortalitate
DL ₅₀	doza ce asigură moartea a 50% de insecte
MN	mediu de hrană
MNN	mediu nutritiv natural
NC	nucleocapsid
SPVC	suprapoliviriocapsid
SVC	supraviriocapsid
TL ₅₀	timpul ce asigură moartea a 50% de insecte
V	virion
Virin	preparat viral cu proprietăți insecticide
VG	virusul granulozei
VPN	virusul poliedrozei nucleare
Virin-ABB	insecticid contra Omizii-păroase-a-dudului
CSI	Comunitatea Statelor Independente

INTRODUCERE

Actualitatea și importanța cercetărilor. Zona temperată oferă condiții favorabile producerii unui spectru larg de culturi, ceea ce determină ca insectele, într-o diversitate vastă, să fie trofic atașate de aceste plante, provocând daune considerabile din punct de vedere economic. Pierderile provocate agriculturii în plan mondial de diferite organisme dăunătoare constituie anual 35% din recolte, ceea ce se elucidează cu aproximativ 100 miliarde de dolari. Din aceste pierderi 13,8% revine insectelor, 11,6%, – ciupercilor, 9,5% – buruienilor și 0,1% – altor organisme. Pagubele cauzate de insecte variază în funcție de planta cultivată, zona geografică și de metodele de management utilizate [92, 98].

Actualmente culturile agricole sunt atacate de circa 8 mii specii de organisme dăunătoare, dintre care peste de 140 specii sunt insecte fitofage, numeroase specii de organisme patogene și dăunători ai stocurilor alimentare, ceea ce se răsfrânge substanțial asupra recoltei obținute. E necesar de menționat, că în condițiile dezvoltării epifitotice ale bolilor și invaziei vertiginoase a dăunătorilor și buruienilor, pierderile recoltei depășesc nivelul de 50-60%, și constituie circa 1,5-2 mlrd. lei [21, p. 96-106], [243, p. 280-290], [217, 218].

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 [170].

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 piață 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 [147, p. 19864-19873], [61]. Din cele 281 de biopesticide disponibile în prezent pe piața mondială, 30,0% au la bază diferite tulpini

bacteriene, 38,1% – constituie diferite specii de insecte parazite sau prădătoare, 15,7% – nematozi, 4,27% – ciuperci, 2,85% – viruși și 2,14% – protozoare [80, 70].

Bioinsecticidele constituie aproximativ 5% din cantitatea de pesticide vândute în 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 principial 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 aceste preparate sunt rentabile, deoarece pot declanșa epidemii virale, care se mențin timp de mai mulți ani. Baculovirusurile reprezintă interes științific și practic ca mijloace de protecție efective și ecologic inofensive.

Complexitatea problemei, metodele și căile de sporire a eficienței preparatelor ecologice necesită un studiu profund în continuare. Este necesar de a depune efort continuu pentru a satisface cererea pieței de desfacere în preparate ecologice de control contra 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 posedă efecte ecologice, care se transmit din generație în generație o perioadă îndelungată, reglând densitatea insectelor și, totodată, fiind absolut inofensiv pentru sănătatea omului.

Succesul combaterii microbiologice a dăunătorilor forestieri și ai culturilor agricole este condiționat de existența germenilor patogeni cu anumite caracteristici cum ar fi virulența, specificitatea, rezistența, conservarea, transmisibilitatea. 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 [204].

Într-un șir de țări și diverse centre științifice se desfășoară cercetări ample în direcția elaborării și implementării largi a baculovirusurilor (Canada, SUA., China, Japonia, Ungaria, Turcia, România, Italia, Spania, Germania, Rusia, Ucraina, etc.), și care au drept scop elucidarea

aspectelor de epizootologie a virusurilor poliedrozei nucleare, în vederea elucidării factorilor, care favorizează apariția și dezvoltarea epizootiilor virale și activității biologice înalte, care la rândul său stau la baza elaborării preparatelor baculovirale. Pe larg au fost discutate rezultatele cercetărilor privind utilizarea agenților patogeni în controlul biologic obținute de către savanții Tanada (1955), Vago (1953), Thomson (1966) Burges (1981), Burges & Hussey (1971), DeBach (1964), Franz (1980), Huffaker & Messenger (1976), Kurstak (1982, 1977), Summers (1954), cât și cele realizate în condiții tropicale de către Federici (1995, 1999) și Weiser (1984). În spațiul CSI cercetări în această direcție au fost realizate de către Швецова (1954) Сикюра, (1971), Жимерикин (1989), Орловская (1961) ș.a.

În Republica Moldova cercetările privind utilizarea baculovirusurilor au demarat în anul 1960, când au fost efectuate primele experimente de combatere a dăunătorilor cu preparate virale (Tarasevici L.M, Râbina S, Gulii V.V, Chitic V.S, Ciuhrii M.G, Voloșciuc L.F ș.a). Ulterior, au fost descrise numeroase epizootii printre populațiile din ordinul *Lepidoptera* și *Hymenoptera* și editate lucrări, unde a fost descris efectul epizootic al baculovirusurilor. La infectarea artificială și naturală a insectelor au fost elucidate cazuri de transmitere pe orizontală și pe verticală a baculovirusurilor, care pe parcursul mai multor generații rețin dezvoltarea în masă a insectelor dăunătoare. Rezultatele preliminare obținute ale cercetărilor efectuate au determinat perspectivele de elaborare a preparatelor baculovirale. În cadrul Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecție Plantelor au fost elaborate și se implementează preparate microbiologice de protecție a culturilor agricole, silvice și decorative, care se bazează pe principiile biogeocenotice de reglare a populațiilor de insecte. Interesul cu referire la problemele de combatere microbiologică de către Comunitatea Europeană favorizează aplicarea preparatelor baculovirale pentru majoritatea statelor, asigurând cadrul legislativ de obținere a culturilor ecologice. În anul 1985 Parlamentul Republicii Moldova a aprobat Hotărârea nr. 807 „Cu privire la dezvoltarea direcțiilor noi în biologie și biotehnologie”. În respectiva hotărâre au fost stipulate direcțiile principale de elaborare a biotehnologiilor de producere și aplicare a preparatelor biologice în protecția plantelor.

O problemă importantă în patologia insectelor constituie ceea ce vizează cunoașterea principiilor care stau la baza dinamicii îmbolnăvirii populațiilor de dăunători și a epizootologiei bolilor insectelor. Recunoașterea necesității aplicării virusurilor entomopatogene și a insecticidelor baculovirale, elaborate în baza lor, este determinată de particularitățile calitative ale agenților patogeni, printre care specificitatea de acțiune și caracterul epizootic, care constituie avantajele principale față de insecticidele chimice. Manifestarea caracterului epizootic al

baculovirusurilor, fiind o determinantă polifactorială, are loc periodic și este condiționată de un șir de factori biotici și abiotici.

În scopul utilizării raționale a acestor pârghii eficiente, este necesară cunoașterea profundă a mecanismelor și legităților ce determină reglarea densității populațiilor de insecte dăunătoare la acțiunea baculovirusurilor. Avantajele enumerate mai sus determină în mare măsură necesitatea aplicării în condițiile de producere a preparatelor virale, însă, este necesar de menționat, că deocamdată volumul de folosire a lor rămâne redus. Una dintre multiplele cauze care determină aplicarea limitată a insecticidelor virotice este lipsa unor cercetări aprofundate, în ceea ce privește caracterul epizootic al virusurilor entomopatogene. Paralel cu efectul protector al baculovirusurilor este necesar de menționat și specificul biocenotic de reglare acestora.

Mecanismele de declanșare și dezvoltare a epizootiilor cauzate de baculovirusuri la momentul actual sunt insuficient cercetate. Într-un complex biocenotic, populația insectei-gazdă reprezintă unul din elementele ecosistemului, alături de care se găsesc dispersate într-un număr mai mare sau mai mic și microorganisme entomopatogene. Transmiterea pe orizontală a infecției depinde în mare măsură de rezistența agenților patogeni și de gradul de acțiune a factorilor mediului înconjurător. Aceasta confirmă perspectivele dezvoltării metodelor microbiologice de protecție în viitorul apropiat. Investigațiile virusurilor la insectele dăunătoare, au necesitat cercetări detaliate ale relațiilor dintre agentul patogen și celulă-gazdă, precum și elaborarea metodelor de identificare a virusurilor și au fost direcționate pe parcursul mai multor ani spre producerea preparatului viral. Au fost elaborate metode de sporire a activității biologice, de producere și bioconservare a biomasei virale, precum și obținere a formelor preparative eficiente și tehnologice.

Intensificarea cercetărilor în direcția identificării baculovirusurilor și geneticii acestora a fost determinată de necesitatea elaborării și aplicării preparatelor baculovirale în sistemele de protecție integrată a plantelor și agricultura ecologică. Deja au fost înregistrate succese remarcabile în cercetarea particularităților biologice ale virusurilor entomopatogene, cât și utilizarea preparatelor virale entomopatogene pentru combaterea biologică a insectelor dăunătoare. Deși, în scopul identificării baculovirusurilor au fost propuse diverse metode, care se referă la toate caracterele speciei, începând cu cel morfologic și terminând cu cel geografic și ecologic, totuși rămâne nesoluționată, problema identificării baculovirusurilor, îndeosebi a virusului poliedrozei nucleare (VPN).

Specia *Hyphantria cunea* s-a răspândit din America în Europa și rapid a devenit un dăunător periculos al plantelor agricole, forestiere și decorative. Formarea arealului secundar al acestui dăunător nu este finalizat nici până în prezent. Fitofagul se răspândește treptat și ocupă

teritorii noi, ajungând în țările din Asia Centrală și în Iran (2003), iar apoi în Noua Zeelandă (2005). Arealul acestei specii continuă să se extindă și în alte regiuni ale Europei [139, p. 279-285], [140]. Până la momentul actual combaterea acestei insecte periculoase se efectua, în special, cu ajutorul mijloacelor chimice, care având un spectru larg de acțiune, atacă și dezvoltarea Viermelui-de-mătase (*Bombyx mori* L.). Mai mult ca atât, aplicarea acestor preparate este interzisă în zonele urbane și de agrement [56, 3].

Eficacitatea aplicării preparatelor în mare măsură depinde de forma preparativă. Pentru aceasta este necesar de a determina calitatea ingredientelor utilizate în obținerea insecticidelor virale, care trebuie să asigure stabilitatea înaltă față de razele ultraviolete suspensiei formate, dispersia și stabilitatea, adeziunea pe suprafața foliară și menținerea activității biologice a preparatului [206, p. 254-265], [25, p. 69-76].

În acest context s-a propus urmărirea secvențială a tuturor verigilor ce compun tehnologiile de producere ecologice pentru a se evidenția prin metode de cercetare specifică care sunt etapele de acțiune susceptibile de a fi aplicate în scopul optimizării tehnicii organizaționale și funcționale ale gospodăriilor agricole ecologice. Obiectivele principale stabilite în prezenta lucrare au drept scop identificarea și dezvoltarea unei metode alternative, ce prevede integrarea unei sușe de baculovirus apărută în mod natural într-un biopreparat stabil, sigur și eficient în controlul speciei „șintă”.

În ultimul timp în reglarea densității *H. cunea* un rol deosebit aparține baculovirusurilor care de cele mai multe ori pot influența asupra densității populațiilor fără intervenții speciale ale omului. În această ordine de idei a apărut posibilitatea utilizării baculovirusurilor în reglarea densității populației de *H. cunea*. Arealul speciei *H. cunea* actualmente cuprinde partea de nord până la Kiev, partea de vest – majoritatea țărilor europene (Franța, Germania, Italia), iar la sud ajunge până în Nordul Africii și al Chinei. *H. cunea* deja a pătruns în zonele de creștere a dudului, utilizat în calitate de hrană pentru Viermele-de-mătase (*Bombyx mori*), ceea ce prezintă un pericol serios, deoarece larvele de *H. cunea* pot provoca defolieri ale plantațiilor de dud destinate nutriției *B. mori*. Aplicarea altor mijloace biologice elaborate în baza bacteriilor entomopatogene (*Bacillus thuringiensis*), este inadmisibilă, deoarece acestea provoacă moartea larvelor de *B. mori* [52, 53, 56, 57].

Pe de altă parte, rămân nesoluționate multe probleme tehnologice de producere și aplicare a preparatului. Luând în considerare și dependența sporită a eficacității baculovirusurilor de starea patogenetică a populațiilor de insecte, devine oportună investigarea structurii și stării populațiilor de *H. cunea*, precum și a relațiilor dintre baculovirusurile din componența preparatului cu cele din patocenoză naturală.

În rezultatul cercetărilor anterioare s-a elaborat și înregistrat preparatul Virin ABB-3, dar având din mai multe considerente 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 mixtură 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 procedeelor 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 procedeelor tehnologice de creștere în masă a larvelor de *H. cunea*;
3. Perfecționarea procedeelor 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 de câmp. Izolarea, indentificarea 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 [20, 51]. Procedeele tehnologice de producere propuse de către cercetătorii M. Ciuhrii și L. Voloșciuc, a fost efectuată cu aplicarea metodelor 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, determinare a 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 [30]. 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, metode 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.

Sumarul compartimentelor tezei.

În **Introducere** sunt argumentate actualitatea, importanța și necesitatea realizării cercetărilor științifice efectuate, este reflectată situația actuală în domeniu, sunt formulate scopul și obiectivele studiului, ipoteza de cercetare, sinteza metodologiei de cercetare și justificarea metodelor de cercetare alese.

Capitolul 1. „Rolul infecțiilor virale în reglarea densității populațiilor de insecte dăunătoare” include o analiză amplă a literaturii științifice în domeniul de cercetare, precum și

sinteza cunoștințelor acumulate, care au referință la stadiul de cunoaștere și utilizare a virusurilor, preparatelor virale, răspândirii și controlului densității populațiilor de lepidoptere dăunătoare, îndeosebi a *H. cunea*. Este descrisă actualitatea, realizările înregistrate și perspectivele utilizării preparatelor virale în scopul combaterii insectelor dăunătoare, asigurării calității produselor silvice, agroalimentare și ameliorării stării mediului înconjurător.

Sunt generalizate rezultatele cercetărilor mondiale în domeniul utilizării preparatelor virale în calitate de mijloace pentru diminuarea densității populațiilor insectelor dăunătoare, analizând acțiunea lor la diferite faze de dezvoltare ale dăunătorilor, precum și rezultatele cercetărilor privind înregistrarea și utilizarea practică a preparatelor baculovirale, demonstrând actualitatea și perspectivele utilizării acestora în agricultură și silvicultură.

Analiza profundă a situației din domeniul investigat a permis determinarea direcțiilor de soluționare ale problemelor existente: examinarea insectelor în calitate de surse și component ale preparatelor virale, selectarea obiectelor entomologice pentru utilizarea în calitate de materie primă pentru preparatele baculovirale în combaterea *H. cunea*, elaborarea ciclului tehnologic complex de obținere și aplicare a preparatului viral.

Capitolul 2. „Materiale și Metode de cercetare”. Investigațiile au fost efectuate la toate fazele fenologice de dezvoltare a Omizii-păroase-a-dudului punând accent pe stabilirea parametrilor de bază necesari pentru selecția adulților, optimizarea celei mai avantajoase modalități de creștere, controlul calității materialului biologic, stabilirea spectrului trofic, estimarea randamentului de creștere a larvelor, omogenizarea materialului biologic, determinarea particularităților morfologice și ultrastructurale ale VG și VPN *H. cunea*, relațiile acestora în celulele insectei-gazdă, purificarea incluziunilor virale, determinarea concentrației baculovirusurilor în suspensia virală, condiționarea preparatului, aprecierea, activității biologice a preparatului.

Abordarea sistemică a metodologiei cercetărilor științifice a permis aprecierea clară nu numai a valorii fundamentale a cercetărilor, dar și efectul tehnologic scontat la fiecare etapă ulterioară de cercetare. Prelucrarea matematică a rezultatelor obținute, calcularea parametrilor statistici, prezentarea grafică a materialelor a fost executată cu utilizarea softului Excel 2007 din Microsoft Office.

Capitolul 3. „Elaborarea mijloacelor baculovirale pentru reducerea densității populației *H. cunea*”. Sunt prezentate rezultatele cercetărilor privind elaborarea, perfecționarea, înregistrarea și utilizarea practică a preparatului viral Virin-ABB-3.

Conține informația privind particularitățile dezvoltării *H. cunea*, arealul acesteia și impactul dăunătorului asupra diferitor grupe de plante, precum și rolul factorilor naturali, inclusiv a celor biologici în reglarea naturală a densității populațiilor.

Pentru elaborarea mijloacelor de control al dezvoltării *H. cunea* au fost descriși factorii primordiali care stau la bază reglării densității populațiilor dăunătorului: factorii abiotici și biotici, punând accent pe funcționalitatea mecanismelor de patogeneză virală, îndeosebi a baculovirusurilor (VG și VPN). Capitolul conține o informație amplă privind particularitățile baculovirusurilor și elementele tehnologice de producere a biomasei baculovirale.

Schema tehnologică include mai multe etape, principalele dintre care sunt: selectarea materiei prime care corespunde destinației preparatului; colectarea sau cultivarea în condiții controlate a biomasei virale; elaborarea formelor preparative corespunzătoare destinației preparatului viral Virin-ABB-3, condiționarea preparatului viral; controlul calității preparatului viral.

Capitolul 4. „Estimarea eficacității preparatului viral contra *H. cunea*”. Pentru aprecierea acțiunii preparatului Virin-ABB-3 a fost evaluată activitatea biologică specifică a insecticidului baculoviral asupra dăunătorului, monitorizând eficiența biologică și ecologică a preparatului și stabilind caracterul ecologic inofensiv atât asupra sănătății omului, cât și a mediului înconjurător.

În capitol este descrisă informația privind elaborarea procedeeelor tehnologice de producere și aplicare a unui preparat viral, evaluarea tuturor etapelor procesului tehnologic, precum și a efectelor economice și ecologice în producerea preparatelor pe bază de baculovirusuri, ceea ce a permis afirmării, că în condițiile actuale, producerea *in vivo*, în bază biomasei virale, rămâne calea reală, care asigură controlul natural ecologic inofensiv al insectelor lepidoptere defoliatoare deosebit de dăunătoare, printre care și *H. cunea*.

În compartimentul **„Concluzii generale și recomandări practice”** sunt generalizate rezultatele științifice principale noi ale tezei, expuse în 9 concluzii.

În compartimentul **„Recomandări practice”** sunt prezentate 3 recomandări practice privind elementele biotehnologice de producere a biomasei baculovirale, elaborare a formei preparative și aplicare în combaterea dăunătorului.

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

1.1. Particularitățile de dezvoltare a Omizii-păroase-a-dudului (*Hyphantria cunea* Drury) și impactul ei asupra plantelor de cultură

Omida-păroasă-a-dudului sau Fluturele alb american (*Hyphantria cunea* Drury), (Lepidoptera: Arctiidae) este răspândită pe larg în Republica Moldova. Arborii izolați cu coroana bine aerisită și iluminată sau din lizieră sunt cei mai des atacați de această insectă. Deși este considerată o insectă de carantină, se întâlnește pe o mare parte a teritoriului republicii. Omida-păroasă-a-dudului se dezvoltă în două generații complete, iar în condiții favorabile poate apărea și a treia generație facultativă [35 c. 493-494], [38], [8, p. 286-288].

Țara de origine este America de Nord (Canada, Mexic, SUA). Arealul acestei specii în America de Nord este: de la Vest la Est – de la Oceanul Pacific până la Oceanul Atlantic și de la Nord la Sud – de la hotarul pădurilor de conifere din Canada, intersectând meridianul 54° și 58°, până la regiunile de Nord ale Mexicului [36], [204, p.4560-4568], [1, p. 217-227] (Figura.1.1).

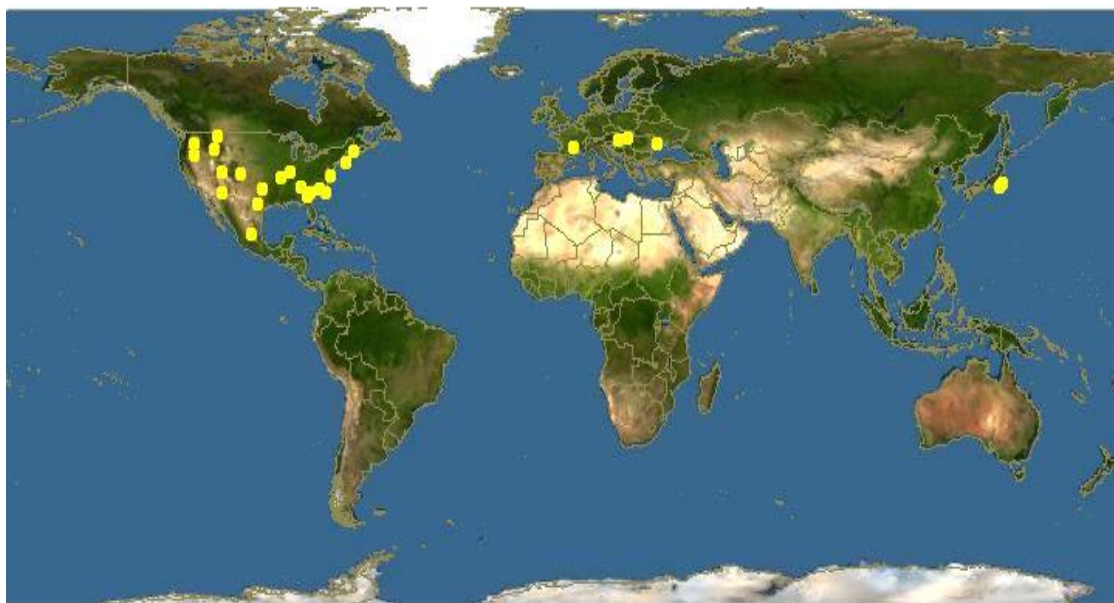


Fig. 1.1. Aria de răspândire a *H. cunea* pe Terra

Pe continentul european *H. cunea* a fost semnalată pentru prima dată în Ungaria, în anul 1940, după care s-a răspândit cu pași rapizi în țările vecine și în Asia (Tabelul 1.1). Insecta atacă mai mult de 600 specii de arbori, arbuști și plante erbacee. În America sunt înregistrate 166 specii de plante care sunt afectate de omizi din această specie, în Europa Centrală – 234 specii (30 specii de plante fructifere, 100 specii de arbori și arbuști și 100 specii de plante erbacee), 300 specii de plante în Asia [242, p. 457-483], [2, p. 167-175], [248].

Tabelul 1.1. Distribuția geografică a dăunătorului *H. cunea* în spațiul European și Asiatic

Țara	Începutul răspândirii	Sursa
EUROPA		
Albania	1952	Paparisto et al., 2010
Ungaria	1940	Waren & Tadic 1970; Ripka, 2005
Austria	1951	Krehan & Steyrer, 2009
UK	2004	
Bulgaria	1961	Smith <i>et al.</i> 1992; Tschorsnig & Herting, 1994
Franța	1975	Jermini <i>et al.</i> , 1995; www.lepinet.fr, 2015
Germania	1953	Braasch, 1976;
Italia	1980	Mazzon & Martini, 2000
Serbia	1979	Vajgand, 2009; 2010
Croația	1949	Zúbrik <i>et al.</i> 2006
Slovénia	1990	Juric <i>et al.</i> , 2016
R.Moldova	1952	Чураев, 1962; Стапец, 1968; Stingaci, 2015; 2017
Romania	1949	Iamandei, 2004; Brudea ș.a., 2012
Ucraina	1952	Кривошеев, 2009; Гольдин Е.Б., 2013
Rusia	1978	Ижевский, 2002; Шамилов, 2008; Гниненко и др., 2005; 2011
Polonia	1962	Buszko, Nowacki, 2000
Lituania	1986	Ostrauskas, 2004
Slovacia	1947	Krištín, 2001
Suisse	1991	Jermini, 1995
ASIA		
Iran	2005	Rezaei <i>et al.</i> , 2003; Ajamhassani, 2013
Korea	1979	Chung et al. 1995; Jang, 2015
Turcia	1995	Toper, 1995; Sullivan 2011
China	1979	Du Juan.ș.a.; 2010; Tang, 2012; Chao Chen, 2014; Xu et al., 2015
Japonia	1945	Gomi, 2006, 2007; Yamanaka <i>et. al.</i> , 2008
Georgia	1955	Loladze, 2003
Azerbaidjan	1971	Кулиева, 2006
Kazahstan	2000	Исин, Шанимов, Копжасаров, 2008
Kârgâzstan	2000	Морковкина, Милько, 2006
OCEANIA		
Nouă Zeelandă	2003-2005	Kean, 2008

În Republica Moldova *H. cunea* atacă peste 250 specii de plante: dudul (*Morus* sp.), mărul (*Malus domestica* L.), cireșul (*Cerasus avium*), prunul (*Prunus domestica* L.), vița-de-vie (*Vitis vinifera* L.), căpșunul (*Fragaria moschata* DUCH.), trandafirul (*Rosa damascena* MILL.), teiul (*Tilia cordata* Mil.), nucul (*Iuglans regia* L.), caisul (*Armeniaca vulgaris* L.) ș.a. Deoarece *H. cunea* este o insectă polifagă, poate ataca culturile agricole, forestiere și decorative (tabelul A

1.1.), în zonele geografice ale Europei de Nord, din cauza condițiilor climatice deosebite [13, p. 87-93], [20], [23, p. 96-106].

Imago reprezintă un fluture de culoare albă, deseori cu puncte cafenii sau negre pe aripi și cu antenele de nuanță albie. Abdomenul este acoperit cu puf alb, iar la femelele ce n-au depus ouă abdomenul este de culoare verzuie. Anvergura aripilor atinge 25-35 mm, lungimea corpului 10-16 mm. Adulții încep să zboare peste 10-12 zile după apariția condițiilor favorabile la temperatura de 14°C și încetează la temperaturi minime de 11-13°C. Perioada de zbor primăvara poate fi 24-28 de zile, vara nu mai mult 6 zile. Durata vieții femelelor până la depunerea ouălor primăvara este de 2-11 zile, vara depășește de 6 zile. Durata vieții masculilor variază de la 1 până la 3 zile. Temperatura optimă pentru viabilitatea fluturilor este de 23-24°C, iar umiditatea aerului de 75% [132, p.120-130].

Zborul adulților generației de primăvară durează din luna mai până în luna iunie, iar a generației de vară de regulă, din luna iulie până în luna august și are loc în orele de seară și noapte: pentru prima generație de la ora 23⁰⁰, iar pentru a doua – de la 4 până la 6 dimineața.

Durata dezvoltării embrionare depinde de temperatură: la 16,5°C este de 18 zile, la 17,5°C – 15 zile, la 23,5°C – 10 zile și la 30°C – 6 zile. Condițiile optime pentru dezvoltarea ouălor sunt temperatura 23-24°C și umiditatea relativă aerului de 75%.

Pentru a determina perioada dezvoltării dăunătorului se utilizează prognoze matematice și anume focarele *H. cunea* după calendarele fenoprognostice. Oul este de culoare verde cu diametrul cuprins între de 0,5-0,55 mm, apoi pe măsură ce embrionul se dezvoltă, devine de culoare cenușie. Femela depune ouăle în ponte, a câte 100-600 pe partea inferioară a frunzelor și le acoperă cu perișori fini și rari de pe abdomen. La eclozare omida ieșită din ou este de culoare verde, cu spatele cafeniu, iar pe părțile laterale ale corpului trece o dungă gălbuie cu perișori și spini lungi. Corpul omizii mature poate atinge în lungime 25-35 mm. Omizile parcurg 7-8 vârste larvare [41, c. 64-78], [28, c. 209-216], [29, c. 74-77].

Durata dezvoltării larvelor depinde în principal de temperatură. De exemplu, la temperatura medie diurnă și nocturnă de 18,8°C, aceasta durează 44 zile, la 19,5°C – 38 zile, la 20,4°C – 32 zile, iar la 23,0°C – 28 zile.

Până la vârsta a patra omizile viețuiesc în colonii pe lăstari, unde formează cuiburi mici din 2-3 frunze, unite prin fire de substanță mătăsoasă. Pe frunze larvele sunt situate una lângă alta și după ce devorează frunza trec pe alta din apropiere, cuibul ajungând până la o jumătate de metru dimensiune. În caz de invazii în masă, cuiburile împânzesc întreaga coroană a pomilor care rămân defoliați. La vârsta a șaptea larvele părăsesc arborele și se adăpostesc pentru iernare în crăpăturile scoarței copacilor, în scorburii, pe garduri, în locurile de bifurcare ale ramurilor mai

groase, pe pereții clădirilor, sub streșini, în stratul superficial al solului. În aceste ascunzișuri larvele se transformă în pupă. Pupa de culoare cafenie, cu 10-15 spini tociți la capăt și lungimea de 8-15 mm este adăpostită într-un cocon sur din perișori. Zborul adulților are loc înaintea sau în timpul înfloririi mărului. După fecundare are loc depunerea ouălor. Peste 10-14 zile apar larvele. Dăunătorul își încheie ciclul de dezvoltare în a doua jumătate a lunii septembrie, prima decadă a lunii octombrie [37], [30, p. 36-38], [33, c. 14-17].

1.2. Strategiile de control a populației *H. cunea*

Densitatea populației unei insecte-gazdă poate constitui în anumite condiții un factor important de stimulare a virozelor. În condiții naturale s-a observat că epizootiile se manifestă cu intensitate sporită în focarele de erupție și criză, când populația defoliatorului atinge densitatea ridicată. Astfel, cercetările efectuate în Republica Moldova scot în evidență că *H. cunea* tinde să treacă prin explozii periodice ale populației. Focarele au fost înregistrate la fiecare patru-șapte ani, care pot dura 2-3 ani, iar agenții de control naturali pot reduce semnificativ activitatea *H. cunea*. Există anumite strategii de control al efectivului populației *H. cunea*.

Strategia 1: Controlul mecanic – eliminarea cuiburilor prin tăiere și îndepărtarea manuală din copacii mici și medii și arderea lor. Distrugerea frunzelor care conține ponte de ouă. Larvele pot fi înlăturate, de asemenea, prin proceduri mecanice cu utilizarea unei măture sau a unui băț și colectarea lor într-o pungă sau cutie. Monitorizarea detectarea cuiburilor dăunătorului și distrugerea timpurie a arborilor atacați de *H. cunea*, poate exclude necesitatea unor tratamente și evitarea defolierilor excesive. Aceste cuiburi mici izolate ulterior pot fi ușor lichidate. Arderea cuiburilor în copac este categoric interzisă, deoarece provoacă daune suplimentare copacului.

Strategia 2: Controlul biologic – aplicarea insecticidului baculoviral Virin-ABB-3 și a celor bacteriene: Lepidocid, Dipel, Bitobaxilina, Entobacterină, Dendrobacelină, Gomelin. Agentul biologic aplicat Virin-ABB-3 reprezintă un preparat biologic, ce poate reduce semnificativ populația *H. cunea*, atunci când umiditatea și temperaturile sunt ridicate. Insecticidele biologice, bazate pe *Bacillus thuringiensis* (Bt) pot fi folosite contra dăunătorilor lor, atunci când larvele sunt încă mici. Aplicarea tratamentelor cu aceste insecticide în combaterea defoliatorului se efectuează sub formă de stropiri fine a arborilor sau sub formă de prăfuiri cu avionul sau elicopterul. În cazul unor suprafețe restrânse, tratamentele se pot aplica și cu echipament acționând de la sol. Aceste insecticide sunt destul de eficiente împotriva *H. cunea* în cazul, în care aplicarea tratamentelor cu suspensii de poliedre virale se efectuează pe întreg cuprinsul de arboret infestat la larvele de vârstă II-III, în scopul provocării unei mortalități înalte în populația de larve. Infectarea larvelor se realizează prin introducerea virusului în corpul lor odată cu hrana. Eficacitatea combaterii baculovirale depinde de mai mulți factori, dintre care cei

mai importanți sunt gradul de virulență a virusului, susceptibilitatea insectei, vârsta larvelor în momentul tratării, doza și norma de consum utilizată, tehnica de tratare, condițiile climatice în timpul aplicării tratamentelor.

Strategia 3: Controlul biologic – utilizarea prădătorilor și paraziților. Au fost identificate peste 80 specii de paraziți și prădători ai *H. cunea*. Mai mulți dușmani naturali controlează populațiile inclusiv păsările, mamiferele mici, insectele, păianjenii și viespile parazite.

Strategia 4: Controlul chimic – utilizarea insecticidului standard sau sistemic. Stropirea arborilor se realizează cu avionul sau cu echipamentele de pulverizare terestră. Arborii pot fi tratați de multe ori cu insecticide sistemice aplicate pe sol pentru absorbția prin rădăcină.

1.3. Controlul biologic asupra dăunătorului *H. cunea*

Utilizarea pe scară largă a pesticidelor în combaterea *H. cunea* pe lângă aspectele pozitive poate avea și consecințe negative, cele mai importante fiind perturbările faunei din biocenozele naturale, dezorganizarea biocenozelor, prin distrugerea în masă a insectelor entomofage, stimularea activității unor dăunători potențiali, poluarea chimică a biotopului agricol și forestier, precum și acumularea unor pesticide în produsele alimentare.

Consecințele negative ale utilizării intensive a pesticidelor chimice au contribuit într-o măsură esențială la cointeresarea producătorilor pentru combaterea biologică a defoliatorului *H. cunea*. În cadrul acestei metode de combatere selectivă și ecologic inofensivă, un rol deosebit revine microorganismelor entomopatogene și insectelor entomofage.

Mai mult de 50 specii de insecte parazite și 36 specii de insecte prădătoare atacă *H. cunea*. Acești dușmani se întâlnesc în mod natural și ar putea contribui semnificativ în reglarea efectivului populațiilor. Fluturile *H. cunea* este considerat a fi o sursă importantă de hrană pentru mulți dintre acești dușmani naturali, permițând populațiilor să persiste până în anul următor.

Controlul biologic asupra dăunătorului *H. cunea* include:

Parazitoizi, Diptera:

- Tachinidae: *Exorista japonica* Townsend, *Lespesia frenchii* (Williston), *Mericia ampelus* (Walker), *Pales pavidus* Meigen, *Zanillia libatrix* Panz.

Hymenoptera:

- Braconidae: *Aleiodes malacosomatos* Mason, *Aleiodes sanctihyacinthi* (Provancher), *Apanteles diacrisiae* Gahan, *Apanteles hyphantriae* Riley, *Microplitis hyphantriae*, *Meteorus bakeri* Cook and Davis, *Meteorus hyphantriae* Riley

- Chalcididae: *Brachymeria obscurata* (Walker)

- Eulophidae: *Baryscapus esurus* (Riley), *Chouioia cunea* Yang, *Elachertus hyphantriae* Crawford

- Ichneumonidae: *Campoplex validus* Cress, *Casitaria genuina* (Norton), *Casitaria limenitidis* Howard, *Coccygomimus disparis* (Viereck), *Coelichneumon navus* (Say), *Enicospilus glabratus* Say, *Hyposoter fugitivus* (Say), *Hyposoter rivalis* (Cresson), *Hyposoter pilosulus* Provancher, *Itoplectis inquisitor* Say, *Pimpla turionellae* Linnaeus, *Sinophorus validus* (Cresson), *Therion morio* (Fabricius), *Therion sassacus* Vier, *Vulgichneumon brevicinctus* (Say).

- Pteromalidae: *Dibrachys cavus* (Walker)

- Torymidae: *Monodontomerus minor* (Ratzeburg)

- Trichogrammatidae: *Trichogramma dendrolimi* Matsumura

- Preparate biologice: Lepidocid, *Bacillus thuringiensis* Kurstaki, Dipel, Bitoxibacilină, Gomelină, Bactospein, Dendrobacelină.

Un alt aspect în controlul biologic al acestui defoliator, care este extrem de blând asupra mediului înconjurător reprezintă feromonii sexuali. Utilizarea feromonilor *H. cunea* permite nu numai de a monitoriza schimbările în zonă, dar, și de a demara acțiunile ce prevăd posibilitatea de utilizare a lor pentru combaterea dăunătorului în focarele sale.

Compoziția chimică a feromonilor sexuali ai *H.cunea* a fost studiată atât în America de Nord, cât și în Europa [205], [94 p. 31-36].

Aldehida linolică și linolenică (9Z, 12Z) - octadeca-9,12-dienal (Z9, Z12-18Ald) și (9Z, 12Z, 15Z) - octadeca-9,12,15 trienală (Z9, Z12, Z15-18Ald) împreună cu epoxidul dienei (3Z, 6Z) (9S, 10)-cis-epoksigenoheptacoza-3,6-dienal (Z3, Z6-9S, 10R - 2Shu EPO) au fost depistate în extractul feromonului sexual al femelelor fluturelui alb american. Respectiv, raportul dintre aceste componente a fost de 1:6:27. De asemenea, s-a încercat identificarea acestor trei componente la masculii *H. cunea*, însă, nici o combinație din aceste componente nu a fost depistată.

După identificarea *H. cunea* în Noua Zeelandă au fost efectuate studii, ce prevedeau utilizarea a mai mult de 700 capcane, pentru monitorizarea dăunătorului. Din cauza lipsei numerice a dăunătorului s-a propus efectuarea analizei chimice a feromonilor sexuali și compararea lor cu analogii utilizați în practică [94, p. 31-36].

Aplicarea capcanelor feromonale este o metodă cunoscută pe larg pentru estimarea necesității de utilizare a unor măsuri de protecție împotriva unui șir de dăunători. Însă, lipsa feromonului sexual al Omizii-păroase-a-dudului impune efectuarea inspecției doar vizuale și face aproape imposibilă monitorizarea obiectivă a dăunătorului. [164 p. 238-243].

Folosirea metodelor biologice pentru menținerea nivelurilor de dăunători sub pragul daunelor economice, fără afectarea populațiilor benefice, reprezintă unul dintre cele mai importante elemente ale unui management integrat al dăunătorilor (IPM). Interesul față de folosirea biopesticidelor selective împotriva insectelor fitofage a crescut în ultimii ani, în special, în sistemele care se bazează pe inamicii lor naturali. În patologia insectelor, cele mai importante sunt preparatele entomopatogene, care au la baza bacteria de tipul *Bacillus thuringiensis*.

În general, bolile produse de bacterii se caracterizează prin pătrunderea în hemocel și multiplicarea patogenului, ca urmare insecta piere prin septicemie (Galani și Andrei, 1997). Tulpinile bacteriei *Bacillus thuringiensis*, care se folosesc cel mai mult în combaterea biologică, produc endotoxine cu caracter insecticid. Acestea se leagă de proteinele din intestinul mediu al insectei, apoi ajunse în membrană formează canale, care permit scurgerea ionilor și distrugerea celulelor.

Marea majoritate a biopreparatelor produse în lume sunt bazate pe tulpini entomopatogene de *B. thuringiensis*. Virulența acestei bacterii reprezintă una dintre condițiile esențiale pentru utilizarea promițătoare a acesteia în protecția plantelor [37].

În general, la insectele infectate de această bacterie se observă o reducere evidentă a mobilității și o scădere a intensității nutriției. Ele invadează cavitatea corpului insectelor, unde se înmulțesc, după care pătrund în alte țesuturi ale corpului, provocând în cele din urmă o septicemie generală în rezultatul căreia survine moartea. Unele bacterii acționează prin toxinele pe care le produc și care afectează metabolismul insectelor [3].

În practica protecției plantelor sunt utilizate cel mai des preparatele bacteriene create din diferite tulpini de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. Cele mai multe specii din genul *Bacillus* sunt patogeni ai insectelor și au un efect insecticid diferit. Douăzeci și două specii de bacterii din genul *Bacillus* se întâlnesc frecvent în natură, unele dintre ele sunt utilizate pe scară largă în întreaga lume ca insecticide biologice [144, p. 1-41].

Cele mai des utilizate în acest scop sunt bacteriile entomopatogene *Bacillus thuringiensis* sporale cu cristal. Proprietățile insecticide ale acestor bacterii se datorează capacității lor de a sintetiza endotoxina cristalină și exotoxina solubilă, care este eliminată în mediul lichid în timpul creșterii și dezvoltării bacteriilor.

Deși sunt cunoscute multe specii din genul *Bacillus*, cercetătorii continuă să evidențieze noi tulpini de *Bacillus* eficiente, inclusiv și pentru populația *H. cunea*. Astfel, în conformitate cu datele obținute de către Копжачапова (2007), în pădurile din sud-estul Kazahstanului pe *Acer negundo* au fost găsite cuiburi ale *H. cunea*, cu o pierdere de 100% din omizi. În cuiburi se aflau larve de vârstă a doua. Pentru stabilirea cauzei morții larvelor dăunătorului au fost efectuate

cercetări microbiologice, în rezultatul cărora au fost izolate și identificate tulpini bacteriene *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. La analiza larvelor moarte colectate după tratarea cu bitoxibacilină a pontelor de ouă, s-a constatat că mai mult de 97,5% din insecte sunt infectate cu acest patogen. De asemenea, infectarea cu bitoxibacilină a larvelor *H. cunea* de vârste mari cu suspensie de 0,5% provoacă moartea nu numai a larvelor, dar și a pupelor. Analiza microbiologică a larvelor moarte și a pupelor a indicat, că aproape toate cadavrele conțin *Bacillus thuringiensis*. Omida-păroasă-a-dudului este lichidată cu succes de către bioinsecticidele pe bază de *Bacillus thuringiensis*, cu norma de consum 1,0-3,0 kg/ha [39].

Anterior după depistarea *H. cunea* în spațiul est european au fost testate diverse bacterii produse pentru distrugerea acestui defoliator. Au fost testate astfel de insecticide ca dendrobacilină, bitoxibacilină, lepidocid ș.a în diferite forme și cu diverse norme de consum [45, p.123-127], [58].

Cu toate acestea, la începutul anilor '90 ai secolului XX s-a redus nu numai numărul de insecticide, dar și tot arsenalul mijloacelor bacteriene și actualamente se produce numai o singură varietate de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. Preparatele microbiologice, inclusiv amestecurile de *Bacillus thuringiensis* sunt folosite cu preparatele pe bază de ciuperci, în special, ciuperca *Metarhizium anisopliae*, care a arătat o activitate înaltă, față de larvele *H. cunea*. În Rusia pentru protecția pădurilor împotriva larvelor Omizii-păroase-a-dudului la începutul secolului XXI a fost utilizat lepidocidul și lepidobactocidul. Ambele insecticide au demonstrat o eficiență la nivelul de 80-90% față de larvele de vârste mici a generației a doua. În 2004, în timpul epidemiei de *H. cunea* în fondul forestier de stat din Kabardino-Balkaria a fost utilizat insecticidul fără spori Bitiplex cu norma de consum de 0,1 kg/ha, focarul a fost suprimat pe suprafața de 2050 ha, eficacitatea biologică a constituit de 81% [36, p. 493-494].

În spațiul est european o poziție principală este recuperarea insecticidelor biologice în calitate de mijloace eficiente de protecție împotriva larvelor *H. cunea*. Astfel, în rezultatul testării produselor biologice în vestul Georgiei pe pomi fructiferi, cele mai bune rezultate au fost obținute folosind preparatele bacteriene, bazate pe *Bacillus thuringiensis* var. *aizawat* – 96,1% *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* – 93,6%. Rezultate pozitive au fost obținute și la utilizarea Lepidocidului în Kazahstan, ca concentrația de 0,2%, mortalitatea larvelor în a 9-a zi a fost de 85-87% și 0,3-100% respectiv [34].

Cu toate acestea, criza economică în arsenalul de măsuri bacteriene pentru protecția plantelor contra dăunătorilor, inclusiv, și față de *H.cunea* a rămas numai lepidocidul. În practica anterioară de protecție a plantelor în Republica Moldova cele mai utilizate au fost preparatele bacteriene create pe baza diferitor varietăți de *Bacillus thuringiensis* (Tabelul 1.2).

În Serbia testarea bioinsecticidului D-Stop, creat pe bază de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, a relevat eficacitatea împotriva larvelor *H. cunea* cu norma de consum de 3 l/ha și concentrația de 0,3% [71, p. 353-358].

Tabelul 1.2. Preparatele bacteriene utilizate anterior în Republica Moldova

Denumirea preparatului	Varietăți	Componente biologic active			Aplicarea
		spori	endotoxin	exotoxin	
Entobacterină	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>galleriae</i>	+	+	-	Lepidoptere
Dendrobacilină	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>dendrolimus</i>	+	+	-	Lepidoptere
Gomelin	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i>	+	+	+	Lepidoptere, Coleoptere
Lepidocid	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i>	+	+	-	Lepidoptere
Bitoxibacilină	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>thuringiensis</i> .	+	+	+	Coleoptere, Lepidoptere
Dipel	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i>	+	+	-	Lepidoptere

În practica de protejare a pădurilor, livezilor și plantațiilor agricole un obiectiv important reprezintă reducerea utilizării mijloacelor chimice. Elaborarea și aplicarea metodelor biologice de combatere a dăunătorilor plantelor cuprinde un spectru larg de procedee, ce prevăd atât introducerea și aclimatizarea agentului biologic pe areale noi, cât și producerea lui în masă în condiții de laborator și lansarea sezonieră în agrocenozele protejate [38, p. 36-38].

1.4. Virusurile entomopatogene – reglatori naturali ai densității populațiilor de insecte

Virusurile entomopatogene reprezintă un grup vast și variat de agenți infecțioși, care în unii ani produc în natură epizootii pe suprafețe mari în agrocenoze și ecosistemele silvice. Cercetarea specificității virusurilor entomopatogene și, îndeosebi a baculovirusurilor, ocupă un loc aparte în teoria și practica combaterii microbiologice a insectelor dăunătoare. Virusurile se prezintă sub formă de particule mici vizibile numai la microscopul electronic. O caracteristică importantă a virusurilor o constituie posibilitatea cultivării lor numai pe țesuturi vii. Ele nu se pot diviza, fiind reproduse în celulele gazdei. Până în prezent au fost făcute mai multe încercări de a defini virusurile. Dintre acestea, cea mai completă și corectă este definiția dată de către Lwoff

(1961) „Virusurile reprezintă o categorie specială de agenți infecțioși, care pot exista în trei stadii: infecțioasă, provirală și vegetativă”. Particula virală infecțioasă sau virionul este compusă în esență dintr-un material genetic condensat, înconjurat de o capsidă, formată în principal din subunități proteice-capsomere. Mecanismele de interacțiune, la nivel molecular, dintre virusuri și celule la anumite etape de morfogeneză a virusurilor și patogeneză a celulelor-gazdă corelează între ele.

Raportul actual al Comitetului pentru Clasificare și Taxonomie a Virusurilor indică faptul, că din lista celor 108 familii și 505 genuri, 15 sunt specifice insectelor [59, p. 1837-1850] (Tabelul A 4.1). Dintre acestea șapte familii de virusuri se întâlnesc doar la insecte, 8 familii de virusuri pot infecta atât animalele vertebrate, cât și cele nevertebrate, iar reprezentanții unei familii pot infecta vertebratele, nevertebratele și plantele. Virusurile entomopatogene reprezintă un grup eterogen de microorganisme, care spre deosebire de celulă vegetală sau animală, conțin numai un tip de acid nucleic – ADN sau ARN. Astfel, s-a constatat, că în cazul virusurilor poliedrice nucleare și granulozelor, caracterele genetice se datorează ADN-ului, iar în cazul virusurilor poliedrice citoplasmatiche – se datorează ARN-ului [207, p. 254-265], [201, p. 539-545].

Ulterior, pe măsură ce s-au dezvoltat cercetările de virologie, a fost posibilă identificarea unui număr mare de virusuri la insecte, dintre care unele cu un rol important în declanșarea de epizootii virale în focarele de înmulțire a dăunătorilor. În prezent, Comitetul Internațional pentru Taxonomia Virusurilor (CITV), ca organ oficial de Virusologie al Uniunii Internaționale a Societății Microbiologice, cuprinde mai mult de 6000 de virusuri clasificate în 2284 de specii, și în 39 de taxoni [66, p. 342-348], [60, p. 1441-1446], După Martignoni și Iwai în 1986 erau deja izolate virusuri la aproximativ 600 de specii de insecte și 3 specii de acarieni (Tabelul 1.3).

Tabelul 1.3. Tipuri de virusuri la insecte

Familia	Genul/ Virusul	Acidul Nucleic	Ordinul	Numărul de specii de insecte	VPN	VG
<i>Baculoviridae</i>	<i>Baculovirus</i>	ADN	Coleoptera	34	4	85
			Diptera	73	24	
			Heteroptera	3		
<i>Poxviridae</i>	<i>Entomopoxvirus</i>	ADN	Hymenoptera	36	22	
<i>Reoviridae</i>	<i>Virusul poliedrozei citoplasmatiche</i>	ARN	Lepidoptera	430	288	
			Neuroptera	3	2	
			Orthoptera	13	4	
			Trichoptera	1	1	

Există o mare varietate de virusuri cunoscute, care infectează Artropodele și acestea sunt clasificate în mai multe familii taxonomice. Numai câteva familii de insecte au fost relativ bine analizate din cauza utilității lor în agricultură și în biotehnologie. Marea majoritate a acestor

studii s-au axat pe membri ai familiei *Baculoviridae*, un număr impunător al acestor virusuri este utilizat pentru a controla insectele prin metode biologice alternative față de pesticidele chimice [201, p. 539-545].

Aceeași autori, în 1986 fac o nouă evaluare a numărului virusurilor izolate la insecte și acarieni, ajungând la cifra de 1600. Numărul de virusuri, care ocupă diferite nișe ecologice este foarte mare. Sensibilitatea și specificitatea îmbunătățirii metodelor de detectare, cât și lista de virusuri raportate continuă să se extindă. Datorită secvențierii metagenomice se estimează ca numărul de specii noi virale să crească pe viitor de cel puțin zece ori [198, p. 267–281], [114, p. 215–258].

Din istoricul utilizării baculovirusurilor pentru reducerea densității populațiilor de insecte dăunătoare. Istoria descoperirii baculovirusurilor este strâns legată de dezvoltarea industriei de mătase care a avut loc în China acum 5000 de ani în urmă. Cultura viermilor de mătase era răspândită în Asia și a ajuns în Europa aproximativ în anul 550. Producția de mătase a fost de importanță culturală majoră atât în China, cât și în Japonia. Bolile cauzate de baculovirusuri au fost descoperite pentru prima dată în China antică în secolul al 12-lea [131 p. 425-459], care a provocat epizootii la populațiile viermilor de mătase și în Europa de Vest prin secolul al XVI-lea, cu extinderea comerțului mătăsii [86, p. 13-28].

Prima descriere în literatura occidentală datează cu secolul XVI [195 p. 165-167]. Episcopul italian Marco Vida de Cremona descrie boala viermilor de mătase în poemul „De Bombyce”. Întreprinderile de producere s-au întâlnit cu o varietate de boli la insecte, care au trebuit să fie combătute. Au fost descrise diferite tipuri de boli care afectează Viermele-de-mătase, precum și metode de atenuare a acțiunii acestora. Odată cu apariția microscopiei optice, la aceste tipuri de boli a fost depistată prezența unor corpuri cu ocluzie refractilă, caracteristice și pentru insectele afectate.

Acestea, cel mai frecvent aveau formă poliedrică (Fig. 1.2), de aceea bolile asociate cu astfel de structuri au fost numite în anul 1800 „poliedroze”. Studiile ulterioare au demonstrat că acestea au etiologie virală. Dar numai în secolul XX s-a stabilit că baculovirusurile sunt importante pentru controlul natural al populațiilor de insecte de unde și a apărut ideea de folosire a baculovirusurilor în calitate de reglatori. Prin microscopia electronică s-a demonstrat că organismele de ocluzie poliedrice conțin virioni sub formă de bară, în timp ce analizele biochimice au permis de a elucida că virionii sunt compuși din proteine și acid nucleic. Acești virioni au fost numiți „baculovirusuri” („baculum” latină, bastonaș, tijă). Studiile suplimentare au demonstrat, că baculovirusurile sunt omniprezente în mediul înconjurător, atacând numai insectele.

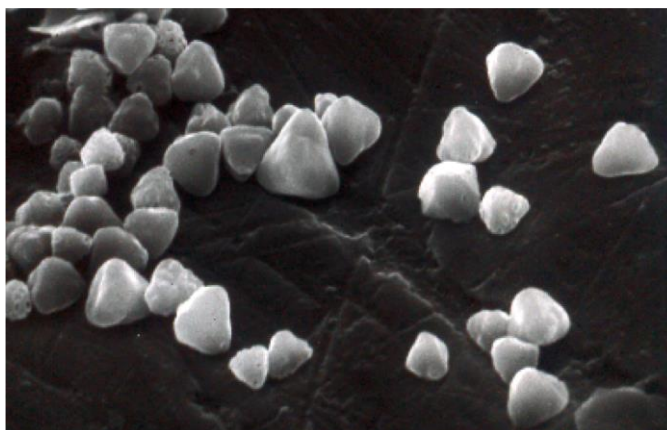


Fig 1.2. Aspectul general al poliedrilor examinate la microscopul electronic cu baliaj (Hughes și Adison, 1986)

Interesul în utilizarea agenților patogeni pentru controlul insectelor datează de peste 100 de ani. Steinhaus (1975), Bassi (1835), Audouin (1837), Le Conte (1874) și Metchnikoff (1879) au sugerat, că agenții patogeni s-ar putea dovedi eficienți pentru controlul insectelor dăunătoare.

După această perioadă se remarcă dezvoltarea cercetărilor fundamentale și aplicative atât în SUA, cât și în Europa. Începând cu anii 1945-1950 s-a trecut la o nouă etapă a cercetărilor, caracterizată prin alocarea de mijloace financiare substanțiale dezvoltării acestora. La sugestia profesorului Steinhaus, la Universitatea Berkeley-California a fost fondat laboratorul de patologie a insectelor, iar în Canada a fost creată Stațiunea de Combatare Biologică „Sault Sainte-Maerie” (Ontario). Pentru prima dată virusul poliedrozei nucleare (NPV) a *Gilpinia hercyniae* (Hartig), ca agent clasic de control biologic în Canada a fost utilizat în anul 1945 de savanții Balch și Bird.

Câteva exemple de utilizare amplă a acestora în protecția biologică sunt *Anticarsia gemmatilis* (Ag) MNPV, utilizat la peste două milioane de hectare de soia din Brazilia [153, p. 42] și *Helicoverpa armigera* SNPV (NPV), întrebuințate pentru a controla buha fructificațiilor în China [199, p. 306-319]. Acestea și alte investigații au stabilit, de asemenea natura cristalină a structurii corpului de incluzie. Ulterior, două tipuri de boli diferite a poliedrozei erau distinse: cele în care poliedrele se dezvoltă în nucleu au fost numite poliedroze nucleare (VPN), iar cele cu incluziuni proteice în citoplasmă au fost numite poliedroze citoplasmatică (CPVs). În ceea ce privește virusul granulozei (VG), acesta a fost identificat pentru prima dată în anul 1920 [159, p. 180–182]. Distincția baculovirusurilor este împărțită în două grupe majore: virusuri poliedrozei nucleare (VPN) și virusul granulozei (VG), bazată pe morfologia corpurilor de incluzie definite în diviziuni taxonomice majore a acestora până la apariția biologiei moleculare. Terminologia acestor virusuri s-a modificat și până în 1973 n-a avut o denumire taxonomică definitiv stabilită:

Borrelinavirus, Bergolidavirus, Smithiavirus, Moratorvirus și Vagoiavirus în cinstea diferitor persoane istorice care au făcut primele cercetări ale VPN și VG, apoi a fost modificată și unificată în Baculoviridae. Denumirea de baculovirus a fost propusă de Mauro Martignony, care a sugerat că familia în care sunt întrunite aceste virusuri să fie numite Baculoviridae datorită formei virionilor, derivate din latină *baculum* = bastonaș [116, p. 163-173].

1.5. Particularitățile baculovirusurilor ca agenți biologici de protecție a plantelor

Biologia moleculară a baculovirusurilor a atras un interes mare datorită varietății aplicării acestora ca: 1) agenți pentru controlul biologic al insectelor dăunătoare [202, p. 143-160]; 2) vectori pentru sinteza proteinelor recombinante în celule de insecte [80, p. 1-18], [65, p. 533-544].

Baculovirusurile sunt cunoscute la mai mult de 600 de reprezentanți ai diferitor ordine și familii de insecte [113, p. 2230-2267], aproximativ 90% fiind izolate în principal din 34 de familii de Lepidoptera [116, p. 163-173], iar în unele cazuri de la alte ordine de insecte precum Neuroptera, Trichoptera, Hymenoptera, Coleoptera și Diptera [175].

Taxonomia baculovirusurilor și particularitățile structurale. Baculovirusurile reprezintă grupul principal de patogeni ai artropodelor [118, p. 1043-1050]. Cel mai detaliat sunt studiate virusurile insectelor patogene, care au fost utilizate pentru prima dată în anul 1900 în controlul dăunătorilor în silvicultură și agricultură. În prezent acestea sunt de asemenea utilizate ca vectori în biotehnologie [212, p. 3-15], [80, p. 1-18]. Analiza filogenetică a virusurilor și gazdelor lor naturale a fost utilizată pentru a defini patru genuri: Alphabaculovirus (nucleopolyhedroviruses-VPN-specific lepidopterelor), Betabaculovirus (granuloviruses -VG- specific lepidopterelor), Gammabaculovirus (VPN- specific himenopterelor) și Deltabaculovirus (specific Dipterelor) [133, p. 180-193], [116, p. 163-173], [104]. Cota parte a speciilor descrise pentru fiecare gen este reprezentată în Figura 1.3.

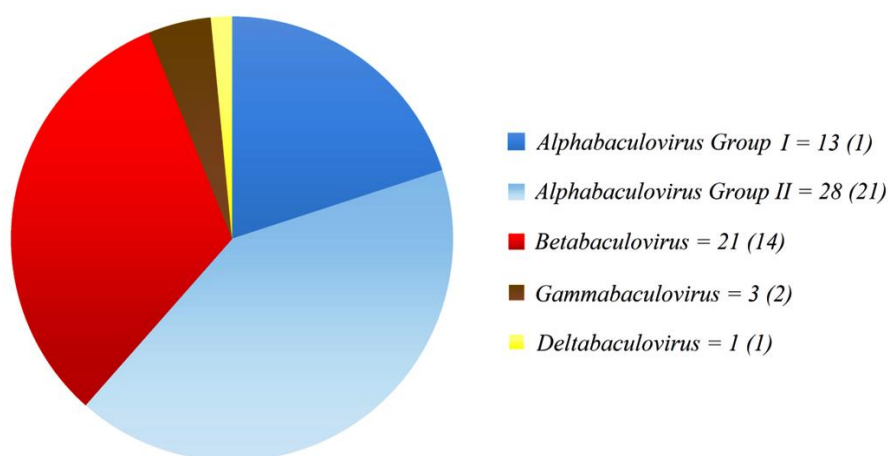


Fig.1.3. Proportia de specii pentru familia Baculoviridae [113]

În general Alphabaculovirusul este genul cu cele mai multe specii comparativ cu celelalte trei genuri. În Figura 1.3. genul Alphabaculovirus este divizat două grupuri – I și II, pe baza proteinei fusogenice active prezente în BV. Ambele grupuri sunt specifice stadiului larvar al insectelor gazde. Poliedrele sunt responsabile de răspândirea virusului la insecte, în principal, prin ingestia larvelor cu corpurile de incluzie prezente pe plante [201, p. 539-545].

Cele VPN sunt filogenetice subdivizate în două grupuri: de tip I și II. Diferența principală între ele constă în faptul că în cel de tip I VPN se conține proteina GP64, necesară pentru pătrunderea virusului în celulă, transmisia lui pe cale celulă-celulă, în timp ce la cel de tip II VPN se atestă o altă proteină, numită proteină F, cu același rol ca și GP64. Această proteină poate fi identificată și în unele virusuri caracteristice vertebratelor [202, p. 143-160].

Cercetările, au demonstrat că larvele *H. cunea* se infectează cu două feluri de virusuri din familia Baculoviridae: Nucleopolyhedrovirus (VPN) și Granulovirus (VG) [210] (Figura1.4).

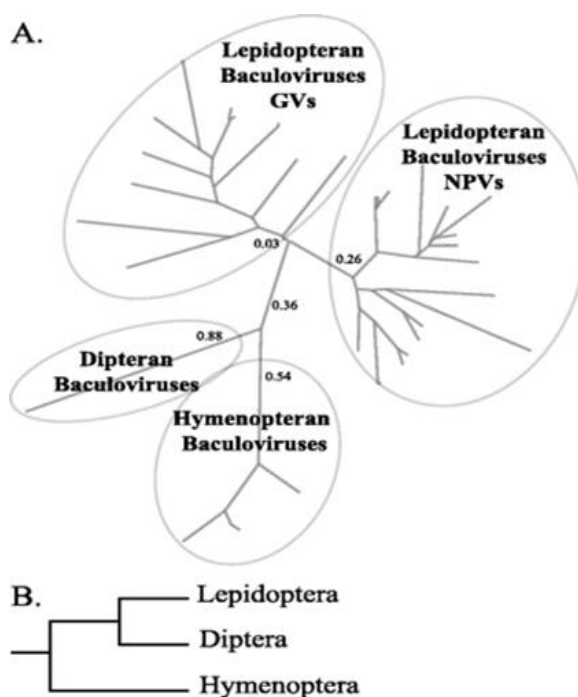


Fig. 1.4. Dendrograma evoluției familiei Baculoviridae. Filogenia (A) baculovirusurilor (după Whiting, 2002)

Nucleopolyhedrovirus (VPN) formează SPVC cu dimensiunea de 1,2x0,5 mkm, în interiorul cărora sunt virionii cu dimensiunea de 220x37 nm. SPVC VG au formă oval-alungită de 0,3x0,5 mcm, în interiorul cărora virionii au dimensiunea de 272x26 nm. SPVC uneori formează agregate mari [133, p. 180-193], [147, p. 945-961].

Baculovirusurile sunt virioni asamblați în formațiuni proteice numite supraviriocapsizi (SPVC), care pătrund în corpul insectelor prin ingestie, ajungând în intestinul mediu și sub acțiunea enzimelor, se deproteinizează și eliberează vibrionii, care se dezvoltă în celulele epiteliale pe care le distrug. Numeroase viroze la insecte sunt provocate de virusurile ce aparțin familiei Baculoviridae. Conform taxonomiei și clasificării virusurilor stabilite de ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses), [123].

ICTV Virus Taxonomy: 2013 Familia Baculoviridae cuprinde două genuri principale:

- virusurile poliedrozei nucleare (VPN);
- virusurile granulozei (VG)

Materialul genetic al baculovirusurilor este reprezentat de o moleculă de ADN, de formă circulară, cu o lungime de 90-230 kpb, în funcție de virus [208, p. 177-185]. Virionii sunt de tip incapsulat și au formă de bastonaș, de aici și provine denumirea familiei. Dimensiunile virionilor variază între 30-60 nm în diametru și 250-300 nm în lungime. În asociație cu proteinele genomul viral formează o nucleocapsidă. Nucleocapsida este înconjurată de structura proteică anvelopantă care formează un virion în forma de bastonaș. Specific pentru familia Baculoviridae este prezența SVC (Supra Virio Capside) și SPVC (Supra Poli Virio Capside), în care sunt incluși virionii. Virusul granulozei formează SVC de formă granulară și cuprind, de regulă, o singură nucleocapsidă, iar virusurile poliedrozei nucleare pot include până la 2500 nucleocapside, de exemplu VPN izolat din larvele de *Leucoma salicis* și se identifică după unele caracteristici morfologice și după specificitatea față de insecta-gazdă. Caracteristica morfologică principală a acestor virusuri constă în prezența incluziunilor proteice, având dimensiuni ce variază între 1-15 μm în care se găsesc particulele de virus (virionii) [206, p. 436-457].

Acești virioni încep un ciclu scurt de infecție și sunt responsabili de transmiterea bolii în diferitele țesuturi larvare. Aceștia se incapsulează folosind membrana celulară a celulei gazde, când ies din celulă. Acest tip de baculovirus este întâlnit în literatură sub denumirea de „budded virus” (BV), „particules bourgeonnantes”, „particules extracellulaires (ECV)”. Infestarea noilor celule de aceste particule virale se face prin adsorbția urmată de endocitoză, proces în care este implicată proteina gp 64 [181, p. 99-165], [73, p. 1084-1095].

În timpul ciclului biologic, cele mai multe baculovirusuri produc două fenotipuri diferite de virioni (Figura 1.5).

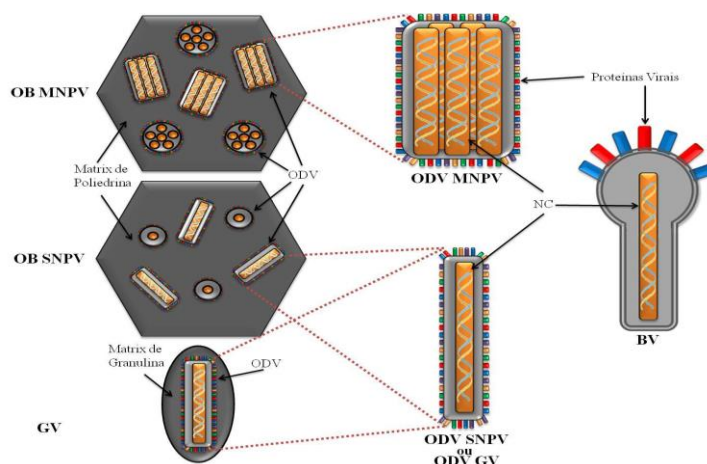


Fig. 1.5. Fenotipuri de Baculovirusuri [175]
Virusul Granulozei (VG) **Virusul Poliedrozei Nucleare (VPN)**

Nucleocapsidele rămase în nucleul celulelor infestate vor avea o anvelopă sintetizată *de novo*. Aceasta va conduce la producerea celui alt tip de particule virale numite în literatură „occluded virus” (OV) [116, p. 163-173]. La sfârșitul ciclului viral mai multe particule de OV se grupează în interiorul unui cristal proteic constituit din poliedrină. Cristalul sau poliedrul protejează virusul de influența factorilor externi și favorizează răspândirea virusurilor în natură. Detalii asupra structurii BV și OV sunt redată în Figura A 4.1.

Particulele OV se formează în celulele intestinale, primele cu care intră în contact virusul în timpul contaminării larvelor. BV inițiază infecțiile secundare, pătrunzând în celulele țesuturilor adipos, muscular, în hemocite și celulele epiteliale (Figura 1.6). Pătrunderea BV are loc prin endocitoză sau fuziune de membrană [149].

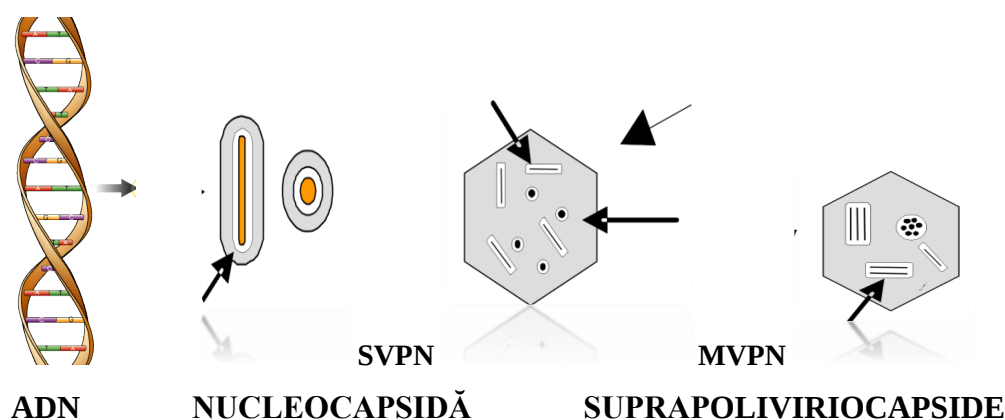


Fig. 1.6. Structura schematică a baculovirusurilor (VG și VPN)

Virusurile granulozei (VG) au fost identificate pentru prima dată la insecta *Pieris brassicae* [184, p.180-182]. Printre dăunătorii forestieri, virusurile granulozei au fost descrise la

speciile *Choristoneura murinana* și *H. cunea*. Virusurile din grupul VG sunt astfel denumite datorită formei granulare a incluziunilor, care pot fi puse în evidență în celulele infectate cu acestea. Virionii baciliformi sunt situați de-a lungul SVC. Un exemplu de astfel de virus s-a depistat la *H. cunea* (HcGV) [126, p. 2549-2562].

În cazul VG, materialul viral reprezentat de nucleoproteină are formă de bastonaș, ușor curbat și este inclus în „membrana intimă”, care la rândul ei este inclusă într-o „membrană externă”. Nucleoproteina descrisă mai sus este inclusă în întregime într-un cristal proteic denumit „granulă” sau „capsulă”. Forma capsulelor este diferită – ovală, elipsoidală, ovoidă. Proteina corpului de incluzie, care înconjoară virionii anvelopați, a fost denumită granulină în cazul VG și poliedrină, în cazul VPN. Pe de altă parte, testele biochimice efectuate pe nucleocapsidele VPN și VG au arătat că atât calitativ, cât și cantitativ fiecare virus are o compoziție polipeptidă diferită. Astfel, pentru VPN al insectelor *H.cunea* și *Trichoplusia* s-au identificat în nucleocapside 14, respectiv 12 polipeptide principale [175].

Virusurile poliedrozei nucleare (VPN) formează în nucleul celulelor infectate formațiuni proteice, în care sunt incluse particulele virale. VPN prezintă două caracteristici structurale mai importante și anume prezența incluziunilor proteice care conțin virioni solitari, anvelopați, a incluziunilor care conțin mănunchiuri de virioni anvelopați sau a incluziunilor care conțin mănunchiuri de virioni anvelopați, care sunt denumite poliedre. Se cunosc două tipuri de VPN în funcție de modul în care virionii sunt incapsulați în interiorul SPVC:

I. VPNS – conține monovirioni cu o singură nucleocapsidă, cum este cazul virusului poliedrozei nucleare la *Bombyx mori* (BmVPN).

II. VPNM – conține polivirioni. Din acest grup face parte virusul poliedrozei nucleare la *Leucoma salicis* și *Limantria dispar*.

Poliedrele diferă ca formă și mărime în funcție de specia de insecte pe care se dezvoltă virusul. Virionii apar sub formă de bastonașe solitare sau grupate în mănunchiuri. Diametrul particulelor de virus diferă de la o specie la alta. Particulele de virus incluse în poliedre prezintă fiecare câte două membrane, una internă și una externă. Într-un mănunchi fiecare particulă virală prezintă o membrană internă (intimă) proprie și o membrană externă. În ceea ce privește existența membranei poliedrale, părerile specialiștilor sunt diferite [125, p. 150-152].

În anul 1976 Gibbs și Harison au propus utilizarea criptogramelor pentru clasificarea virusurilor. În pofida faptului, că au contribuit la sistematizarea cunoștințelor despre virusuri, totuși criptogramele nu au fost dezvoltate și utilizate ulterior din motivul caracterului „închis” al informației prezentate. Virusurile poliedrozei nucleare constituie cel mai studiat grup de baculovirusuri atât datorită abundenței sale în natură, cât și a existenței unui mare număr de

celule permissive disponibile pentru reproducerea lor în condiții de laborator. În plus, interesul crescând de utilizare ca vectori de expresie pentru producerea de proteine străine impune cercetări fundamentale pentru cunoașterea ciclului viral, a expresiei genelor precum și asupra reglării acestora [139, p. 4981-4988]. SPVC permit virionilor incluși, să fie protejați de condițiile nefavorabile ale mediului. Sub această formă, virusul este ingerat de către larve, pătrunde în intestinul mediu al acestora unde este dizolvată SPVC, ca urmare a acțiunii sucului gastric și a enzimelor prezente la acest nivel. Virionii sunt eliberați și fuzionează cu membrana enterocitelor gazdei la nivelul microvilozităților intestinale. Materialul viral pătrunde în citoplasmă și apoi în nucleul enterocitelor prin porii nucleari. Replicarea începe și conduce la formarea nucleocapsidelor după câteva ore și apoi a virionilor [222, p. 228-239].

Morfogeneza virusurilor reprezintă un proces de formare a particulelor virale maturizate (virioni) în interiorul insectelor infectate cu virus sau în cultura tisulară. La familia Baculoviridae (poliedrozele și granulozele) morfogeneza virusului nu se finalizează la treapta de maturizare a virionilor, ci se prelungește până la scufundarea sau includerea virionilor în incluziunile proteice cristalice (poliedre, granule). Există două opinii referitor la dezvoltarea virusurilor insectelor. Bergold presupunea, că dezvoltarea virusurilor și a poliedrozei începe de la una ori mai multe particule sferice, care cresc în interiorul membranei, dezvoltându-se ulterior sub formă de bastonaș [133, p. 180-193].

O altă teorie privind dezvoltarea virusurilor insectelor a fost propusă de Smith și Xeros [249, p. 1073]. În conformitate cu aceasta teorie, particulele virale fine apar din masa cromatică din centrul nucleului infectat cu poliedroză. Ele cresc în mărime și se îmbracă cu o membrană. Conform cercetărilor anterioare, efectuate de către L. Voloșciuc și M. Ciuhrii ciclul de morfogeneză al baculovirusurilor poliedrozei nucleare include 10 etape [60]. În 1953 la omizile înmulțite în voliere speciale s-au depistat primele simptome ale poliedrozei clasice, apoi a fost depistat și VG. În America de Nord, care este patria dăunătorului acestei boli nu s-au evidențiat simptome de poliedroză clasică. Reieșind din acest fapt se presupune, că *H. cunea* s-a infectat cu virusuri în Europa. Primele simptome la omizi constau în dispariția poftei de nutriție la larve. Culoarea larvelor se schimbă și devine de nuanță gri, apoi se întunecă, iar hemolimfa capătă culoarea albă [182, p. 237-242].

Predominarea baculovirusurilor printre celelalte grupuri de virusuri entomopatogene este determinată de faptul, că acestea, având incluziuni de dimensiuni mari, pot fi depistate ușor, folosind metodele microscopiei optice. Aceasta mai este determinată și de necesitatea efectuării pasajelor multiple prin fazele larvare pentru obținerea biomasei virale [19, 20].

Caracterul epizootic al baculovirusurilor se manifestă periodic și este condiționat de un șir de factori biotici și abiotici. În scopul utilizării raționale a acestor pârgii eficiente este necesară cunoașterea profundă a mecanismelor și legăturilor ce determină reglarea densității populațiilor de insecte dăunătoare sub acțiunea baculovirusurilor. Factorii abiotici (apa, vântul) și cei biotici (paraziții și prădătorii, animalele vertebrate și nevertebrate) condiționează transmiterea pe orizontală a infecțiilor acute, îmbolnăvirea în masă a insectelor gazdă, precum și declanșarea epizootiilor. Dacă în cazul infecțiilor acute prezența virusului poate fi depistată ușor, apoi în cazul infecțiilor latente devine foarte dificil de determinat prezența și starea patogenului în componența populațiilor de dăunători. Deocamdată nu este descifrat mecanismul transmiterii infecției virotice în cazul acțiunii tuturor factorilor biotici. Rămâne neclară dependența dintre doza infecției și densitatea populației insectei-gazdă [21, 25] [24, p. 96-106].

Deși au fost propuse noi metode mai rapide de identificare a baculovirusurilor, îndeosebi a VPN, problema elaborării metodelor-expres de identificare a virusurilor entomopatogene continuă să persiste ca o problemă atât teoretică, cât și practică [4], [175], [162].

1.6. Perspectivile înregistrate în domeniul utilizării virusurilor entomopatogene

Succesul combaterii microbiologice a dăunătorilor forestieri și ai culturilor agricole este condiționat de existența germenilor patogeni care să răspundă la anumite cerințe [163, p. 305-327]. Aceasta se referă la unele caracteristici ale patogenilor cum sunt virulența, specificitatea, rezistența, conservarea, transmisibilitatea.

Cercetările privitor la patologia insectelor care se desfășoară în prezent în plan mondial sunt direcționate, în principal, spre cunoașterea potențialului agenților entomopatogeni, îndeosebi a virusurilor. În ceea ce privește virusurile entomopatogene, cercetările au condus la izolarea a numeroase specii patogene la insecte, care se clasifică în două categorii mari:

- virusuri incluziuni proteice ce se formează în celulele infectate;
- virusuri care se află liber în citoplasmă sau nucleu.

Un criteriu de bază în combaterea virologică îl constituie capacitatea de conservare a virusurilor, acordându-se prioritate tipurilor care își mențin viabilitatea în natură o perioadă cât mai îndelungată și care rezistă mai bine în condiții de păstrare, înainte de utilizare. Cercetările efectuate în ultimii ani au demonstrat că virusurile care produc poliedroze și granuloze au capacitatea de conservare cea mai ridicată. S-a constatat, că virusul poliedrozei nucleare a insectelor se poate menține în stare activă, dacă este protejat față de razele solare, o perioadă de 7-8 ani fără a-și pierde prea mult din virulență. Pe de altă parte, s-a demonstrat că virusurile poliedrozei nucleare persistă în natură de la an la an [172, p. 219-26].

Din acest punct de vedere se consideră că, perspectivele cele mai mari de utilizare în combaterea microbiologică în natură le au virusurile de tipul poliedrozei nucleare, care limitează focarele de defoliatori și reușesc să provoace epizootii naturale pe suprafețe mari [67, p. 1-20].

În prezent, cercetările efectuate în unele țări ca SUA, Romania, Franța, Canada, Rusia, Ucraina, Marea Britanie, China, Japonia urmăresc scopul de a elucida aspectele de epizootologie a virusurilor poliedrozei nucleare, pentru posibilitatea cunoașterii factorilor ce favorizează apariția și dezvoltarea epizootiilor în biocenozele naturale și antropizate [144, p. 1-41].

Actualmente, cercetările sunt orientate spre rezolvarea unor aspecte privind:

- procedeele de recoltare a materialului biologic virozat din natură;
- metodele de conservare la rece a materialului biologic colectat și a preparatului atomizat;
- elaborarea unor tehnologii simple și economic de producere a preparatelor virale;
- folosirea de substanțe adezive și protectoare în procesul de fabricarea preparatelor virale,
- care să sporească adezivitatea virusurilor și să asigure protejarea lor împotriva razelor solare.

Insectele cuprind cel mai mare grup de specii și prin urmare, și reprezintă potențialul cel mai sporit al rezervoarelor de virusuri. Există deja o mare varietate de virusuri cunoscute, care infectează artropodele și acestea sunt clasificate în mai multe familii taxonomice. În ciuda diversității și omniprezenței lor, cercetările se concentrează pe studiul virusurilor la insecte, probabil de aceea, că aceștia nu afectează vertebratele și prin urmare ar putea avea un impact economic direct. Numai virusurile insectelor care aparțin mai multor familii sunt deja destul de detaliat analizate în raport cu utilitatea lor în agricultură și biotehnologie. Marea majoritate a acestor studii s-au concentrat pe membrii familiei Baculoviridae, un număr mare din aceste virusuri sunt utilizate pentru a controla insectele, ca alternativă biologică a pesticidelor chimice [70, p. 163-168], [168, p. 497-504].

Obiectivele vizate de cercetători au constat în introducerea virusului în populațiile dăunătorilor, urmând ca acesta să se mențină și să se răspândească în mod natural, asigurându-se astfel o reglare a densității populațiilor dăunătoare pe termen lung. Au fost efectuate diverse cercetări care au demonstrat eficacitatea utilizării virusurilor contra unui număr mare de dăunători ai semănăturilor, livezilor, pădurilor și spațiilor verzi (Tabelul A 2.1).

Rolul infecțiilor virale în reducerea densității populațiilor de insecte dăunătoare. Ciclul infecției virale începe atunci, când insecta înghite hrana contaminată (Figura 1.7). Odată ajuns în

intestinul insectei mediul alcalin contribuie la dizolvarea incluziunilor și eliberarea virionilor, care pătrunzând în nucleu, încep inițierea și transcrierea informației genetice [102, p. 707-736], [65, p. 533-544].

Rolul virusurilor în combaterea dăunătorilor este determinat de transmiterea pe orizontală și pe verticală a patogenilor în populațiile de insecte. Luând în considerare și caracterul specific al acestor agenți, devine clară proprietatea lor epizootică care cauzează moartea în masă a insectelor-gazdă. Deosebit de importantă devine aplicarea preparatelor biologice în cadrul tehnologiilor de obținere a producției ecologice, deoarece acestea reglează densitatea insectelor dăunătoare pe parcursul mai multor generații [167, p. 383-392].

Strategiile de persistență ar putea include transmiterea pe verticală, prevenind superinfecția (de exemplu, re-infecția) de patogeni mai virulenți transmiși orizontal pentru a preveni utilizarea sau nimicirea gazdei [214]. Unii agenți patogeni au capacitatea de a fi transmiși vertical și orizontal, cât și să ofere posibilitatea de a verifica predicțiile despre diferite cereri de virulență în fiecare rută [79, p. 8130-8135].

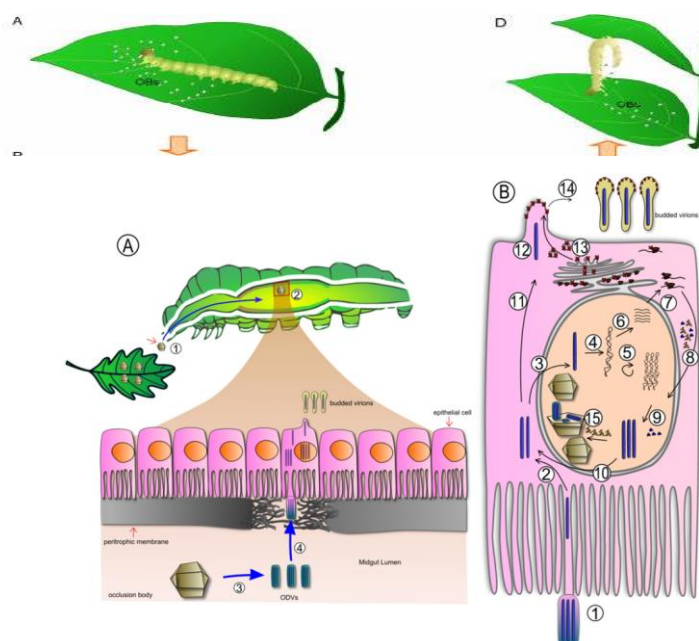


Fig. 1.7. Schema procesului de infecție a unui baculovirus după pătrunderea în epiteliul intestinului mediu al larvei infectate [113, p. 2230-2267]

Incluziunile baculovirusurilor sunt considerate a fi principala cale de transmitere a virusului, acestea pot supraviețui pentru perioade considerabile de timp în afara gazdei în rezervoare de mediu (de exemplu, scoarța arborilor, sol). Cu toate acestea, semnificația acestora și persistența virusului între generații rămâne neclară. Insectele transportă cu ele 40%

din virusurile dobândite orizontal, alte 20% sunt infectate prin moștenire de la părinții lor. Deocamdată puțin însă se cunoaște și despre aceea cum insectele se infectează cu virusurile entomopatogene [151], [221, p. 1337-1342].

Coevoluția, evoluția reciprocă în interacțiunea speciei determinate prin selecția naturală este un factor motrice major în asociațiile istorice dintre agenții patogeni și gazdele lor. Studiile privind evoluția virulenței agentului patogen și rezistenței gazdei au constatat că în cadrul populațiilor atât agenții patogeni, cât și gazdele sunt capabile să se adapteze. Cu toate acestea, exista multe presupuneri privind modul în care aceste schimbări pe scara microevoluționară pot influența modelele speciilor, care interacționează la nivel macroevoluționar [217, p. 569-577], [222, p. 228-239], [178, p. 366].

1.7. Producerea și aplicarea preparatelor baculovirale comerciale

Deși suprafețele ocupate de agricultura ecologică în lume sunt relativ mici, interesul față de acest gen de activitate crește considerabil. Extinderea agriculturii ecologice este limitată de lipsa cercetărilor în baza de sistem cu utilizarea rezultatelor obținute în experiențe complexe sau în condiții de producție [148, p. 19864-19873], [111, p. 519-533], [112] (Tabelul 1.5).

Tabelul 1.5. Cota vânzărilor estimate la nivel mondial pentru agenții de control pe bază biologică, anul 2016

Clasa de produse	Cota de piață (%)
Biopesticide microbiene	65-70
Microorganisme benefice	15-16
Semiochimice	10-19
Botanice	4-8
Microbiene din sol și plante ameliorate	1-2

Biopesticidele pe bază de microorganisme alcătuiesc cota majoră pe piața pentru controlul agenților de natură biologică prin reducerea presiunii pesticidelor [201, p. 161-167]. Interesul deosebit față de baculovirusuri s-a înregistrat în anii 1950-1980. Baculovirusurile sunt patogeni naturali cu capacitatea de a persista în mediu și pot fi produse în masă, ambalate, depozitate și comercializate într-un mod similar cu pesticidele [203, p. 808]. Din punct de vedere agroindustrial, preparatele biologice prezintă mai multe limitări potențiale așa cum ar fi viteză mai lentă de inhibare (variind de la cinci zile până la două săptămâni) față de cele chimice (ore), specificitatea gazdei foarte îngustă, stabilitatea scăzută în câmp,

sensibilitatea la razele UV, perioada de viață scurtă, precum și costul înalt a producției baculovirale comparativ cu insecticidele chimice. Cu toate acestea, baculovirusurile sunt instrumente ideale în programele IPM și unele dintre ele au avut rezultate semnificative în teren [68, p. 362-373], [117, p. 35-50].

Introducerea unui baculovirus străin, care devine o parte permanentă a unui ecosistem, este o excepție. De regulă, se utilizează alte două strategii de a suprima dăunătorii:

- zonele infestate sunt tratate cu baculovirus foarte concentrat pentru a suprima dezvoltarea dăunătorilor;
- zonele infestate sunt pulverizate cu baculovirusuri cu concentrație mai mică și aceasta duce la stabilirea virusului pentru mai multe generații.

Numărul de pesticide înregistrate pe bază de baculovirusuri, deși încet, dar crește în mod constant. În prezent acestea depășesc cincizeci de formulări, unele dintre ele fiind aceleași preparate baculovirale distribuite sub diferite denumiri comerciale pentru diferite țări [202, p. 143-160], [113, p. 2230-2267]. La nivel mondial a crescut interesul față de agenții microbieni (The Minnesota Pollution Control Agency (MPCA)), pe bază de virusuri, bacterii, ciuperci, protozoare și nematozi ca ingrediente active. Piața MPCA a fost marcată cu o creștere de 47% între anii 2004-2007, cu vânzări în valoare, de 396 milioane dolari în anii 2007-2008. Piața de biopesticide microbiene reprezintă aproximativ 1% din piața mondială. Piața globală de biopesticide a evaluat la 1,796.56 milioane de \$ în 2013 și este de așteptat să ajungă la 4,369.88 milioane de \$ până în 2019 [81]. Factori care împiedică crearea unor piețe puternice de MPCA sunt complexe, dar includ cheltuieli suplimentare legate de înregistrarea produselor comerciale [82, p. 1987-1998], [173, p.452-460].

Aproximativ 60 de pesticide baculovirale au fost utilizate pentru a controla diverse insecte dăunătoare. Din gama variată de mijloace biologice folosite în combaterea insectelor dăunătoare un rol deosebit revine familiei Baculoviridae, care grație particularităților lor biologice, pot controla densitatea populațiilor de insecte dăunătoare pe parcursul a mai multor generații [153, p. 415-445].

Toate aceste preparate se bazează pe replicarea virusurilor în țesuturile insectelor sau crescute special în laborator. Cercetările efectuate în diferite țări, privitor la baculovirusuri, au condus la izolarea unui număr mare de virusuri din insectele dăunătoare și la cunoașterea acestor patogeni (Tabelul 1.6).

Lipsa eforturilor de cercetare cu privire la baculovirusuri este o barieră importantă în calea dezvoltării în continuare ca agenți de protecție a culturilor, având în vedere importanța unor potențiali dăunători țintă.

Tabelul 1.6. Biopreparate virale produse pe scară largă, folosind sistemul de producere *in vivo*

Nr. d/r	Denumirea produsului comercial	Virusul	Țara	Specii de insecte țintă
1	Virox	VPN	Finlanda	<i>Neodiprion sertifer</i>
2	Preserve	VPN	Anglia	<i>Neodiprion sertifer</i>
3	Neocheck	VPN	SUA	<i>Neodiprion sertifer</i>
4	Virin-ENS	VPN	Rusia	<i>Neodiprion sertifer</i>
5	Lecontvirus	VPN	Canada	<i>Neodiprion lecontei</i>
6	Gypcheck	VPN	SUA	<i>Lymantria dispar</i>
7	Virin-NSH	VPN	Rusia	<i>Lymantria dispar</i>
8	Inf-Ld	VPN	România	<i>Lymantria dispar</i>
9	Virtuss	VPN	Canada	<i>Orgyia pseudotsuga</i>
10	TMBiocontrol-1	VPN	Canada	<i>Orgyia pseudotsuga</i>
11	Viron H ^M	VPN	SUA	<i>Heliothis sp.</i>
12	Elcar ^M	VPN	SUA	<i>Heliothis sp.</i>
13	Virin-HS	VPN	Rusia	<i>Heliothis sp.</i>
14	78-3	VPN	China	<i>Heliothis sp.</i>
15	Mamestrin	VPN	Franța	<i>Mamestra brassicae</i> , <i>Plutella xylostella</i> , <i>Heliothis armigera</i>
16	Virin-KS	VPN	Rusia	<i>Mamestra brassicae</i>
17	Spod-x	VPN	Olanda	<i>Spodoptera exigua</i>
18	Madex 3	VG	Elveția	<i>Cydia pomonella</i>
19	Granupom	VG	Germania	<i>Cydia pomonella</i>
20	Carpovirusin	VG	Franța	<i>Cydia pomonella</i>
21	Hifantrin	VPN	Bulgaria	<i>Hyphantria cunea</i>
21	Decyde	VG	SUA	<i>Cydia pomonella</i>
22	Virin-Gyap	VG	Rusia	<i>Cydia pomonella</i>
23	Virin-OS	VG	Rusia	<i>Agrotis segetum</i>
24	Agrovir	VG	Danemarca	<i>Agrotis segetum</i>
25	prGV	VG	China	<i>Pieris rapae</i>
26	pxGV	VG	China	<i>Plutella xylostella</i>
27	Capex 2	VG	Elveția	<i>Adoxophyes orana</i>
28	Virin-CP	VG	R.Moldova	<i>Cydia pomonella</i>
29	Virin-ABB-3	VPN+VG	R.Moldova	<i>Hyphantria cunea</i>
30	Virin-OS	VPN+VG	R.Moldova	<i>Agrotis segetum</i> , <i>Agrotis exclamationis</i> , <i>Autographa gamma</i>
31	Virin-MB	VPN	R.Moldova	<i>Mamestra brassicae</i>
32	Virin-HS-2	VPN	R.Moldova	<i>Helicoverpa armigera</i>

Fără cunoștințe fundamentale referitor la taxonomia virală, patologie, ecologie și dezvoltarea unor sisteme de producție în masă, viabile comerciale, baculovirusurile sunt puțin probabil să fie atractive pentru comercializarea lor în următorul deceniu [67, p. 1-20], [103, p. 161-167]. Baculovirusurile infectează doar insectele, sunt omniprezente în mediul înconjurător și sunt cunoscute ca un reglator important al multor populații de insecte. Baculovirusurile sunt gazde specifice, infectarea are loc doar la o specie sau câteva specii înrudite cu ele, facilitând gestionarea insectelor dăunătoare agricole și forestiere cu impact minim [75, p. 359-366], [120,

p. 48-57], [135, p. 2549-2562]. Rezultate mai importante, obținute în diferite țări, în combaterea Omizii-păroase-a-dudului cu preparate pe bază de virusuri, sunt prezentate în Tabelul 1.7.

Tabelul 1.7. Testarea a virusurilor patogene în combaterea *H. cunea*

Țara	Virus folosit	Autorul	Observații
Ungaria	VPN	Szirmai, 1957	Teste de laborator
Japonia	VPN	Kunimi, 1998; Yang, 2012	Tratarea arborilor infestați în ambele generații
SUA	VPN VPN și VG	Nordin, 1971 Boucias și Nordin, 1977; Beckaje NE, 2012	Testele de laborator pentru stabilirea sensibilității larvelor după vârstă
Iugoslavia	VPN	Vasilievici, 1962 Injac, 1973	Tratarea arborilor infestați în generațiile de primăvară și toamnă
Armenia	VG	Драмлян, 1973	Teste de laborator
Georgia	VPN și VG	Loladze, 2011	Tratarea arborilor infestați în ambele generații. Experimentări de laborator și câmp
Romania	VPN și VG	Iamandei, Manole, Teodorescu, 2005	Experimentări de laborator și în condiții naturale cu VPN și VG
Rusia	VPN și VG	Ижевский, 2002; Шамилов, 2011	Teste de laborator și câmp
R.Moldova	VPN și VG	Тарасевич, 1975 Рындовская, 1977 Волощук, 1988, 2014, 2017 Чухрий, 1977, 1982, 1985 Stîngaci, 2014, 2015, 2017	Tratarea arborilor infestați în ambele generații. Experimentări de laborator și în condiții naturale cu VPN și VG
Canada	VPN	Summers, 2012; Jessica Ann Breznik, 2014,	Experimentări de laborator și în condiții naturale cu VPN
China	VPN	Qiao, 2007, Yang and Zhang, 2012	Testele de laborator pentru stabilirea sensibilității larvelor după vârstă

Baculovirusurile sunt stabile și pot fi stocate sub formă de suspensii sau pulbere pentru perioade lungi de timp fără pierderi în activitate. Ele sunt rezistente la multe substanțe chimice și persistă în sol timp de mulți ani, iar activitatea lor nu este influențată semnificativ de umiditate și precipitații sau expunerea îndelungată în natură. Acestea pot fi utilizate concomitent cu cele mai multe insecticide chimice și permit reducerea numărului de aplicații, necesare pentru a menține sub control, nivelul dăunării insectelor contribuind astfel la reducerea sinecostului preparatului. În sfârșit, baculovirusurile înlocuiesc insecticidele sintetice și ajută la reducerea nivelului global de poluare chimică. Baculovirusurile sunt componente ale naturii și diferă semnificativ de insecticidele chimice. Cantități mari de virus sunt eliberate în mediul înconjurător în timpul epizootiilor naturale, care sunt răspândite și adesea importante în reglarea nivelului populației de insecte. Există dovezi că cantitatea de virus, care este plasată artificial în mediu ca biopesticid, este minimă în comparație cu cantitatea produsă în timpul acestor epizootii. De fapt,

baculovirusurile au fost recunoscute ca printre cele mai sigure pesticide și au fost incluse de către Uniunea Europeană pe listele de risc redus ca agenți de protecție biologică. [150, p. 425-435].

Eficiența insecticidelor baculovirale este asigurată de ingredientul activ și de un șir de avantaje față de cele chimice, printre care cea mai importantă este specificitatea lor. Aplicarea largă a preparatelor baculovirale a devenit o realitate doar după organizarea producerii lor, datorită cercetărilor biotehnologice profunde. Astfel a devenit posibilă producerea preparatelor baculovirale eficiente și ieftine necesare pentru combaterea dăunătorilor culturilor agricole. E necesar de accentuat că, actualmente producerea insecticidelor baculovirale este orientată spre inocularea larvelor de vârste mari (3-5) pentru a obține volume maximale de biomasă virală. Această tendință e inseparabil este legată de următoarea dependență: coeficientul reproducerii în masă a agentului patogen în țesuturile receptibile ale insectelor de laborator este direct proporțională cu reducerea activității biologice a patogenului [5], [156, p. 172-175], [24, p. 62-72], [6, 11,12, 32].

Accentul pus pe baculovirusuri pentru comercializare poate fi atribuit de mai mulți factori favorabili. Nivelurile ridicate de replicare *in vivo* a baculovirusurilor care prezintă un interes comercial deosebit, de asemenea, sunt ca factor-cheie de a realiza producția comercială mai atractivă și disponibilă [144, p.1–41], [213, p. 63-73], [15, p. 262-265], [9, p. 509-513]. De la începutul utilizării lor comerciale, baculovirusurile au fost testate extensiv pentru evaluarea siguranței lor și îndeplinirea cerințelor de înregistrare. Începând cu anul 2010, peste 24 specii de baculovirusuri au fost înregistrate pentru a fi utilizate în managementul insectelor dăunătoare [136], [170]. Dintre toate pesticidele microbiene baculovirusurile ocupă pe piața comercială o cotă de 6%, tratându-se milioane de hectare cu produse baculovirale înregistrate de-a lungul anilor [171, p. 11-52], [202, p. 143-160], [155, p. 415-445].

În decursul multor ani de utilizare și testare împotriva organismelor dăunătoare n-au fost înregistrate efecte adverse ale baculovirusurilor [203, p. 105-112], [159], [154, p. 415-445].

1.8.Tehnologia de producere și formularea preparatelor baculovirale

Cercetările efectuate în mai multe țări au condus la elaborarea unor tehnici speciale de obținerea a preparatelor baculovirale. Excelente în acest domeniu au fost realizate cu virusurile unor dăunători agricoli, care astăzi stau la baza unor preparate virale industriale, ce se aplică în combaterea biologică. Baza pentru formularea baculovirusului a fost stabilită în anul 1980, folosind tehnologii de formulare dezvoltate anterior pentru pesticide. În cele mai multe cazuri, produsul este formulat pentru a optimiza depozitarea, iar la utilizare acesta este suspendat pentru a se obține o formulare aplicabilă. Larvele infectate sunt uscate prin anumite metode acceptate,

cum ar fi deshidratarea, liofilizarea sau printr-o suflare de aer pentru a genera o pulbere. Aplicarea lactozei în procesul de uscare îmbunătățește stabilitatea și infectivitatea virusului. Pentru obținerea concentrației dorite, pulberea este amestecată cu o substanță purtătoare inertă. Purtătorul trebuie să fie ieftin, ne repelent pentru larve și să păstreze virionii bine dispersați. Siliciul și argilele sunt frecvent utilizate în calitate de purtători [220, p. 24-27], [124, p. 788-802].

În prezent, producția de baculovirusuri pe scară comercială se realizează exclusiv *in vivo*, baculovirusurile sunt aplicate în câmp, larvele infectate sunt colectate, atunci când sunt moarte sau crescute în laborator, folosind hrana contaminată cu baculovirus [218], [95, p. 577-582].

Este posibil să se producă baculovirusurile într-un mod mai eficient și controlat cu ajutorul insectelor *in vitro* prin culturi de celule în bioreactoare. Celulele insectelor pot fi cultivate cu ușurință ca culturi statice. Totuși, atunci când cultura se testează în special pe scară largă, apar multe probleme. Celulele insectelor sunt foarte sensibile la diferite stresuri și pot fi ușor deteriorate prin agitare și aerare. O varietate de factori afectează creșterea celulelor în suspensii, cum ar fi formularea mediului, compoziția medie, concentrația serică, pH-ul, presiunea osmotică, presiunea oxigenului și hidrodinamica bioreactorului [69, p. 362-373]. Producerea baculovirusurilor este un proces migălos, de aceea cele mai importante variabile pentru optimizarea procesului este momentul infectării, multiplicării infecției și perioada recoltării [64, p. 174-186], [107, p. 839], [185, p. 49-68].

Succesul producerii baculovirusurilor *in vitro* foarte mult depinde și de alte motive, cum ar fi costurile medii, liniile de celule ale insectei și productivitatea volumetrică [124, p. 788-802]. În plus, acumularea diversității genotipice a baculovirusului prin trecerea pasajelor în serie este o forță serioasă pentru producția *in vitro* [153 p. 415–445], din moment ce pasajele în serie a baculovirusului trec în culturi celulare prin procese, care cauzează în ocluzie redusă și pierderea virulenței. De asemenea, formularea poate afecta foarte mult activitatea biologică a baculovirusului [169, p. 267-272], [184, p. 788-802]. Deși baculovirusurile pot rămâne neschimbate pe o perioadă îndelungată atunci când sunt depozitate în condiții optime [180, p. 65-69], ele sunt inactivate rapid în condiții de câmp sub influența razelor UV cu lungimile de undă 254-320 nm [134, p. 305-316], îndeosebi în UV-B (280-320 nm) [146, p. 42-49].

Aceasta a determinat utilizarea protectanților contra radiației ultraviolete pentru prevenirea inactivității baculovirusurilor. Câțiva protectanți au fost folosiți cu succes, așa cum ar fi reflectanții care sunt de regulă substanțe luminoase, cum ar fi aluminiul, oxidul de aluminiu sau dioxidul de titan, absorbanți generali – materiale negre care absorb lumina, cum este cărbunele activat sau naftalina, absorbanți selectivi, cum ar fi acidul aminobenzoic amelozan,

înălbitori optici – substanțe care absorb radiațiile UV și emit lumină în regiunea albastră a spectrului, cum ar fi derivații oxazolului, pirazolului, lactoninei și cumarinei, și cromofori – substanțe care transferă energia de la moleculele sensibile absorbante și UV, de exemplu ADN la molecule care acceptă energie [157, p. 35-47]. Mai mulți autori au testat eficacitatea UV împotriva inactivării virusurilor lansate în natură, precum și abilitatea acestor substanțe pentru a spori infecția virală [137, p. 113-117], [250, p. 38-39].

Producerea in vivo a preparatelor pe bază de baculovirusuri. Producerea în masă a baculovirusurilor la un sinecost mai mic pentru utilizator rămâne o problemă semnificativă. Producerea insecticidelor baculovirale comerciale depinde de utilizarea sistemelor *in vivo*, în special insectele crescute sau colectate din natură [176, p. 437-482]. Sistemele *in vivo* pentru producerea baculovirusurilor în larve vii sunt benefice ca metodă de producere pentru societăți comerciale și pentru programele din sectorul public [211, p. 367-378], [112], dar sinecostul relativ ridicat de producere a baculovirusurilor în insecte vii, comparativ cu omologii lor insecticide chimice, rămâne o constrângere deoarece prețurile comerciale sunt dificil de a reduce sub 20 \$ /ha și extinderea *in vivo* a baculovirusurilor de înaltă calitate este, de asemenea, o provocare [176, p. 437-482]. Automatizarea și mecanizarea inoculării, creșterii și recoltării a facilitat producerea în masă, prezentând o opțiune comercială viabilă a baculovirusurilor pentru scara de utilizare a lor. Această abordare de fabricare rămâne atractivă pentru multe companii din America de Nord și Europa, care sunt familiarizate cu înmulțirea în masă a insectelor ca o producere în masă și în continuare răspunde cerințelor actuale ale pieței.

Există un șir de avantaje a producerii baculovirusurilor *in vivo* după cum urmează:

- 1) utilizarea cu succes a baculovirusurilor pentru controlul dăunătorilor de insecte;
- 2) cercetarea continuă în acest domeniu pentru a produce sisteme mai eficiente, care face ca această metodă să fie una viabilă din punct de vedere economic.

În multe zone ale lumii producerea în masă a baculovirusurilor în gazdă este singura abordare fezabilă [153]. Sistemele de producere în masă *in vivo* își au începutul prin anii '60 ai sec. XX. Dezvoltarea dietelor artificiale semisintetice pentru tehnologiile în masă inițiate de către Vanderzan et al. (1962) a condus la creșterea și producerea de virusuri pentru viermele-de-bumbac (*H. zea*), viermele de tutun (*H. virescens*) și de varza looper (*T. ni*) [de Ignoffo (1965)]. Sistemul inițial de creștere a fost mai eficient prin introducerea unor țăvi din plastic multicelulare de unică folosință, prin automatizarea în creștere și inoculării și recoltării baculovirusurilor [118].

Producerea optimă a virusului este rezultatul interacțiunilor dintre gazde-patogen-mediul și fiecare factor a acestei triade trebuie evaluată pentru a influența cantitatea și calitatea produsului. Investigațiile în aceste domenii au fost inițiate de mai mulți cercetători [211], [120, p. 48-52].

În perioada anilor '70 ai sec. XX, sectorul privat a obținut primul insecticid viral Elcar TM, pe bază de *Heliolhis zea* VPN, care s-a comercializat pe piață. Alte insecticide baculovirale (Gypcheck, TM BioControl-1 și Neocheck-S) au fost înregistrate și brevetate de către serviciul forestier al SUA. Gypcheck este singurul insecticid viral produs de către serviciul forestier al SUA, cu o producție anuală care acoperă 10-20 mii acri suprafață tratată. Un interes sporit pentru acest sector în anii '90 ai sec. XX a condus la introducerea și înregistrarea altor produse precum: Spod-X (*S. exigua* VPN) și GemStar (*H. zea* VPN) [61, p. 1-8], [229, p. 36-38].

Producerea în masă a baculovirusurilor la un preț rezonabil pentru mai mulți utilizatori potențiali rămâne o problemă semnificativă. Producerea insecticidelor comerciale baculovirale este încă dependentă de sistemele *in vivo* care utilizează speciile de insecte crescute sau sălbatice colectate din natură [176, p. 437-482].

Producerea *in vivo* are mai multe avantaje față de cea *in vitro*, îndeosebi, când este vorba de virusuri din natură. Prețurile inițiale de producere sunt mai scăzute în cazul producției *in vivo*. Un alt sistem de producție este tehnica HeRD înregistrată de AgriViron, care presupune îmbunătățiri ale nutriției și reduceri ale costurilor de manoperă. Totuși o tehnologie nouă în ceea ce privește tehnologia *in vivo* a fost recent elaborată, îmbunătățind substanțial raportul costuri/beneficii privind producția de pesticide baculovirale. Acest sistem, denumit „HeRD” (High efficiency Rearing Device) care reprezintă un instrument de înaltă eficiență în creșterea insectelor, se bazează pe cuplarea necesităților fizice și alimentare ale unei anumite specii cu un comportament specific larvar. Dezideratul acestei cuplări constă în crearea unui design fizic care maximizează numărul de larve pe cm² al suprafeței de nutriție sau pe m² al ariei de creștere, reducând munca fizică, manipulările și materialele. Forma fizică a unei unități poate varia în funcție de specie a insectei, care necesită creșterea [108, p. 413-422], [90, p. 1945-1951].

O configurație ușor diferită (compartimentare în loc de grile) a fost folosită pentru a crește specia *L. dispar*, la densități de aproximativ 800 larve de L5 /930 cm², aproape de 5 ori densitatea obținută de serviciul forestier al SUA. Greutatea pupelor obținute prin sistemul HeRD în cazul speciei *L. dispar* a fost semnificativ mai mare, constituind în medie 0,07 g pentru mascul și 2,4 g pentru femele, comparativ cu 0,6 g masculul și 2,1 g femela în cazul celor obținute de serviciul forestier.

Sistemul HeRD este util pentru multe specii la care larvele nu sunt canibale. Structura acestuia permite separarea cu ușurință a insectelor de dejecții și de resturile de dietă, iar construcția ei modulară simplifică tehnica de producere. Asemenea tehnici de creștere în densitate mare scad costurile de producție, comparativ cu sistemul de producere pe culturi celulare. Tehnologia perfecționată de creștere în masă ar putea fi folosită și în cazul insectelor utile sau în cazul metodei autocide [88, p. 29-72], [111], [89, p. 1140-1157].

Producerea in vitro a preparatelor pe bază de baculovirusuri. Dezvoltarea și obținerea baculovirusurilor de tip VPN cu o viteză de acțiune sporită a mărit considerabil performanțele în câmp ale insecticidelor virale, această viteză sporită însemnând de fapt o creștere a protecției culturilor. Aceste îmbunătățiri au creat condiții de producere pe piață de noi virusuri prin progrese în formularea și modificarea metodelor tehnologice [171, p. 11-52], [111, p. 519-553].

Actualmente un insecticid chimic folosit în controlul insectelor lepidoptere costă între 5 și 20 dolari pentru tratarea unei suprafețe de un acru. Bioreactoarele de tipul tancurilor de agitare sunt singurele alternative pentru a realiza aceste cerințe ale producerii. Trebuie de avut în vedere faptul, că și un program modest de vânzare în cazul unei culturi de câmp importante (tratamente pe 500.000 hectare) necesită o tehnologie de producere care să asigure 1×10^{11} poliedre/ hectar [184], [145, p. 247-250].

Este posibil producerea în cantități mari a baculovirusurilor cu preț eficient și controlat prin utilizarea *in vitro* a culturilor celulare cu bioreactoare. O varietate de factori influențează creșterea celulelor în suspensie, cum ar fi formularea mediului, compoziția, concentrația, pH-ul, presiunea osmotică și hidrodinamica bioreactorului. De la momentul producției în bioreactoarele pilot până la producerea pe scară largă trebuie parcurse mai multe etape. După inoculare necesitățile de oxigen cresc și pentru a menține celulele active în timpul infecției, aceste cantități de oxigen trebuie bine echilibrate. Consumul crescut al acestora în perioada dezvoltării celulare și în perioada infecției necesită o strategie de realimentare a bioreactoarelor cu nutrienți pentru a menține ratele de creștere și de producție virale. Numeroase strategii, printre care hrănirea pe șarjă, hrănirea permanentă sau prin perfuzie s-au dovedit a fi eficiente, fiind folosite cu succes. Metoda și rata de hrănire trebuie selectate cu atenție, pentru fiecare reactor în parte [69, p. 1747-1756], [124, p. 788-802].

Deși baculovirusurile pot rămâne neschimbate pentru mulți ani, acestea sunt rapid inactivate în condiții de câmp de lumina UV (254-320 nm) în special gama UV-B (280-320 nm). Radiațiile UV aduc modificări în molecule de ADN prin interacțiunea a două baze de timină din catena ADN-ului prin formarea unui inel ciclobutan dintre baze, inducând dificultăți în procesul de replicare a lui, precum și o rată ridicată de mutație. Prin urmare, a fost folosită protecția UV

care a propus prevenirea inactivării baculovirusului [134, p. 305-316], [145, p. 247-250].

Mai mulți protectori au fost utilizați cu succes, cum ar fi reflectantele (materiale reflectante care sunt de regulă substanțe luminoase metalice în aluminiu, oxid de aluminiu sau dioxid de titan), absorbanți (materiale negre care absorbă de la infraroșu prin lungimile de undă vizibile la razele UV cum ar fi carbonul), absorbanți selectivi (substanțe cu absorbție puternică în razele UV-B care sunt adesea în întregime sau în mare măsură transparente față de lungimea de undă cum ar fi amelozan și acidul paminobenzoic), luminofori optici (substanțe care absorb radiațiile UV și emit în regiunea spectrului albastru a luminii cum ar fi derivații de stilben, oxazolul, pirazolul, acid naftalic, lactona și cumarina) și cromofori (substanțe care transferă energia de la molecule cu grad ridicat de absorbție și razele UV susceptibile, de exemplu ADN-ul, la moleculele care absorb energie și-au cromofori înainte de distrugere cum ar fi acriflavina, etil-verzue verde-metil și rodamina B). [146, p. 247-250], [147 p. 288-234].

Un alt caracter esențial al produsului viral pentru comercializare este producerea de plăci virale care păstrează virulența în timpul stocării. Izolatele de VPNAc reprezintă în mod obișnuit un exces de 10^8 PFU (Plaque Forming Units) pe ml care mențin la 8°C virulența mai mult de 1 an. Capacitatea unui virus de a genera plăci infecțioase în timpul inoculării este determinată de un complex de caractere care interacționează, format din: tulpina virală, linia celulară și mediul de creștere. De aceea, fiecare tulpină virală introdusă în producere trebuie monitorizată în legătură cu schimbările care au loc în mediu și linia celulară [85, p. 1-8], [228, p. 521-534].

Mai multe din mediile elaborate în ultimii 10 ani au contribuit cu succes la producerea *in vitro* a baculovirusurilor. Primul lucru care s-a efectuat în cazul acestor medii a fost substituirea FBS cu un substrat obținut din ficat de porc. Agitarea permanentă a mediului de creștere din bioreactoare cu ajutorul mixerelor și aportul permanent de oxigen prin barbotare fac absolut necesară prezența acestor agenți pluronici în toate mediile de producere. Deficiențele nutriționale ale mediului au efecte adverse, care afectează productivitatea obținerii masei virale [154, p. 415-445]. Deși producerea insecticidelor baculovirale în culturi de celule de insecte a fost propusă ca o alternativă pentru a depăși limitările proceselor *in vivo*, până în prezent nici un proces *in vitro* nu ar putea fi aplicat pe scară industrială și, de aceea baculovirusurile sunt încă produse prin infestarea larvelor [184], [185, p. 49-68].

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 (2006-2010) 06.40.22 F “Elaborarea mijloacelor ecologic inofensive în baza microorganismelor utile și a substanțelor biologice active pentru combaterea organismelor dăunătoare în agroecozisteme”, (2011-2014) 10.04.038 F “Biotehnologia producerii și aplicării preparatelor biologice pentru combaterea organismelor dăunătoare”, precum și în cadrul Grantului pentru tineri cercetători (2007–2008) 07.40.29” Elaborarea procedeelor biotehnologice de producere a metodelor virale și aplicării preparatului baculoviral în combaterea Omizii-păroase-a-dudului (*Hyphantria cunea* Drury)”, Bursa de cercetare în memoriam ”Mircea Ciuhrii”, (2017) ”Cercetări novatoare privind transmiterea vectorială a baculovirusurilor entomopatogene în combaterea insectelor dăunătoare cu capcanele de lumină și feromoni”. Cercetările au fost efectuate în condiții de laborator și câmp la Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor (IGFPP). Experimentele de câmp au fost efectuate în masivele Gospodăriei silvice Strășeni și liziera de pădure din Rezervația „Codrii” și livada IGFPP cu suprafața totală de 16 ha Cercetările au fost efectuate în decursul anilor 2003-2017.

2.1. Locul efectuării experiențelor staționare și condițiile climaterice

Experiențele de câmp s-au desfășurat pe teritoriul rezervației naturale “Codrii”, Întreprinderea Silvo Cinegetică Strășeni, livada experimentală a Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor, Gospodăria Țărăneasca ”Oleg Timciuc” (s.Petrunia, r-n Glodeni), livezile de măr la S. C. ”Frutex” S.A. Bacău, Romania, Centrul Științific aplicativ „Insect Farm”, Romania, Ocolul silvic Snagov, Romania. Condițiile climaterice din anii incluși în studiu au fost diferite de la an la an și au dus la manifestarea gradului de răspândire a dăunătorului în Republica Moldova.

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

În experimentele de laborator și câmp au fost aplicate ambele genuri de baculovirusuri (Baculoviridae): *Nucleopolyhedrovirus* și *Granulovirus* [45, c. 123-127], [219]. Pentru cercetare au fost folosite atât tulpinile de virusul poliedrozei nucleare, cât și cele ale virusului granulozei. Experimentele 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 din livada Institutului de Genetica, Fiziologie și Protecția Plantelor. Larvele colectate erau crescute în condiții de laborator pe hrană naturală (frunze de arțar și dud). Pentru creșterea larvelor, insectele erau trecute 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.

2.3. Metode de cercetare

Au fost cercetate ambele genuri de baculovirusuri (Baculoviridae): *Nucleopolyhedrovirus* și *Granulovirus* [206, p. 254-265], [175]. Baculovirusurile reprezintă bastonașe baciliforme ce conțin ADN circular cu masa moleculară 50×10^6 - 100×10^6 [207, p. 254-265], [208]. Reproducerea baculovirusurilor nu se stopează la formarea virionilor baciliformi, ci continuă până la formarea incluziunilor cristalice ce capătă forma de poliedre (la reprezentării genului *Nucleopolyhedrovirus*) sau de granule (la reprezentanții genului *Granulovirus*). Pentru experiențe au fost folosite scheme, bazate pe recomandările metodice existente. Înregistrările în câmp au fost realizate după metoda Vago (1972) generală admisă cu diverse modificări ale ei [54], [20, 234 p].

Creșterea în condiții dirijate a H. cunea ca sursă de obținere a preparatelor virale.
Efectivul inițial de adulți a fost obținut din larve colectate în luna iunie a anilor 2007-2014, din zona municipiului Chișinău și creșterea lor în condiții de laborator pe hrană naturală (frunze de arțar).

Selecția de imago, folosiți în experiențele ulterioare a fost realizată pe baza diferitor indicatori morfofiziologici, în primul rând, dimensiunea și aspectul general al larvelor. În vederea elucidării acestor aspecte au fost evaluate dimensiunile adulților obținuți din larve crescute pe hrană naturală *Acer negundo*, cu cea a adulților obținuți din larve hrănite cu mediu artificial, precum și apariția diferitor abateri morfometrice în ambele variante. Lungimea corpului și anvergura aripilor au fost măsurate după moartea adulților. Prolificitatea și fertilitatea femelelor crescute în condiții controlate au fost determinate în conformitate cu metodologia cercetărilor entomologice [35, 37].

Larva de vârstă I are o colorație galben deschisă, capul negru și corpul acoperit cu perișori fini. Larvele de vârste mari au culoarea gălbuie-pală sau verde-deschisă cu o bandă longitudinală dorsală întunecată și câte o bandă gălbuie longitudinală laterală, aceasta din urmă fiind acoperită cu o pilozitate albicioasă aliniată de-a lungul unor șiruri a câte 12 tuberculi de culoare galben-portocalie pe fiecare parte. Culoarea larvelor variază în ceea ce privește tonurile și nuanțele.

H. cunea este o specie cu cel mai larg spectru trofic dintre toate insectele pe întreg arealul său, fiind depistată pe cca 626 de specii de plante. 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 [217], ca fiind preferate de larvele

dăunătorului, ele au fost folosite în cadrul cercetărilor pentru creșterea cu hrană naturală [164], [1, p. 217-227], [2, p. 167-175].

Studiul dependenței intensității viabilității față de factorul trofic la insecte. Studiile au fost realizate pe larvele de *H. cunea*, recoltate din natură din diferite focare ale fazei gradației dăunătorului. Biomaterialul selectat în faza de erupție din focarele dăunătorului, unde a fost înregistrată creșterea populației a avut următorii parametri biologici: greutatea pupelor – 1,7-3,8 g; numărul de ouă în ponte-larve – 1000-1200 buc, eclozare – 96%. Biomaterialul colectat în retrogradație se află în faza de criză și are o greutate a pupelor de 0,48-0,72 g, numărul de ouă constituie 10-150 ponte, incubajia larvelor – 32%. Fiecare variantă a experimentului s-a realizat trei repetări (100 ponte/repetiție) sau zece repetări, a câte 25 larve.

Studiul factorului trofic la *H. cunea*. Pentru stabilirea legăturii dintre intensitatea factorului trofic și viabilitatea indivizilor la speciile studiate, a fost folosită metoda de selectare a larvelor după eclozare pe hârtie de filtru frecată cu planta preferată [44, p. 171-173]. Pentru *H. cunea* ca semnal atractiv au fost utilizate frunzele plantelor preferate de dud și de arțar american, rase pe hârtie de filtru. La creșterea în condiții dirijate au fost selectate larvele, care timp de 30 de minute au trecut spre partea laterală a hârtiei (slăbirea intensității de atracție), ca cele mai sensibile. La varianta-martor au fost colectate larvele, care s-au transferat la marginea hârtiei pe suprafața căreia a fost rasă planta preferată.

Studiul factorului fonic. Pentru stabilirea indicatorului viabilității populației și intensitatea factorului fonic au fost utilizate metode cunoscute aplicate în selectarea larvelor viermelui de mătase, după incubare cu o reducere a intensității razelor solare. La creșterea în condiții dirijate au fost selectate larvele eclozate în primele 40 de minute, după iluminarea ponte de ouă. Iluminarea s-a efectuat cu lămpi fluorescente de zi de la 16 până la 18 ore (Osram L 18W / 72-965 Biolux, fluxul luminii - 1050-1100 lm).

Studiul sensibilității masculilor față de feromonul sexual al femelelor de *H. cunea*. A fost utilizat feromonul sexual al femelelor, monocomponent și bicomponent elaborate de ESP „Biohimtech”. Masculii au fost transferați în olfactometre, în care n-au fost femele, au fost plasați pe foi de hârtie (4 repetări a câte 100 de bucăți) la o distanță de 5 cm între ei. În continuare la vârful antenelor insectelor de sex masculin (2 cm), a fost aplicat bastonașul de sticlă umectat prealabil în feromonul sexual al femelelor. Pentru a preveni zborul masculilor, *H. cunea* a fost fixată de aripi pe foi cu știfturi entomologice. Testarea a fost efectuată dimineața (de la 8⁰⁰ până la 10⁰⁰) la două ore după apariția masculilor. Prezența unui răspuns din partea masculilor a fost evaluată prin mișcarea antenei, membrelor anterioare, curbarea abdomenului și „dansul de curtenie”. Masculii, care au răspuns la feromon au fost împerecheați. Descendenții

femelelor împerecheate cu masculii din lotul de control (fără selecție pentru feromon) și varianta în care a fost realizată selecția au fost crescuți separat în conformitate cu procedeele metodice de creștere a *H. cunea*.

Stabilirea prolificității, modului și duratei de depunere a pontei la femelele colectate din câmp, precum și la femelele obținute prin creștere în condiții de laborator. Din crisalidele rezultate în urma creșterii larvelor recoltate din natură s-au obținut 586 de adulți. Dintre aceștia s-au selectat 20 de cupluri, care au fost separați în momentul acuplării în boxe, fiecare reprezentând o repetiție. Alte douăzeci de cupluri selectate dintre adulți, obținuți în urma creșterii larvelor pe medii sintetice, de asemenea, au fost separate în momentul acuplării în boxe, fiecare reprezentând o repetare în cazul investigațiilor privind femelele obținute prin creștere în condiții de laborator. Cuștile au fost amplasate în camera de creștere, temperatura fiind menținută la $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Înregistrările vizuale efectuate zilnic au avut ca obiectiv momentul începerii/finalizării depunerii pontei, locul și modul de depunere a pontei, numărul de ponte depuse. Ulterior s-au efectuat observații privind durata incubației, aspectul morfologic al ouălor și ecloziunea larvelor. Datele obținute au fost comparate cu cele din literatura, de specialitate privind parametrii menționați la specia *H. cunea*.

Selectarea celei mai avantajoase modalități de creștere. După experimentarea mai multor tipuri de voliere de creștere, în rezultat s-a selectat un volier paralelipipedic cu dimensiunile de 50x100x50 cm, laturile inferioară și superioară fiind din fier, iar celelalte acoperite cu plasă cu ochiuri fine. Pentru manipulările realizate pe parcursul diferitor cercetări s-au a creșterii în masă, una dintre laturi este prevăzută cu un manșon de pânză dispus pe o structură din sârmă. Interiorul volieruri este tapetat cu hârtie, ca suport pentru depunerea pontelor. Pentru depunerea pontelor s-au introdus și mănunchiuri de plante în sticlute cu apă, iar pentru nutriția adulților – recipiente cu soluție apoasă de zahăr (10-20%), schimbate la un interval de 2-3 zile.

Stabilirea duratei incubației și viabilității ouălor la populația de H. cunea colectată din câmp. Zece cupluri de adulți colectați din câmp au fost introduse într-un volier. După încetarea depunerii pontei și transferul adulților în alte voliere, a fost efectuat un control amănunțit al frunzelor și hârtiilor, cu decuparea porțiunilor de hârtie cu ponte și transferarea unui număr de 10 ponte (fiecare reprezentând o repetiție) în vase pentru incubație.

Au fost numărate ouăle din fiecare pontă și au fost efectuate observații zilnice, privind aspectul morfologic al ouălor și eclozarea larvelor. Rezultatele au fost comparate cu cele din literatura de specialitate, privind parametrii menționați la specia *H. cunea*. În camerele de incubație s-a menținut temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$ și umiditatea relativă de $70 \pm 5\%$.

Stabilirea influenței temperaturii. Un număr de 10 ponte, depuse de femele obținute prin creșterea larvelor pe medii sintetice în laborator, au fost crescute în voliere. Pontele, care au reprezentat repetările, în cazul cercetărilor din această fază, au fost numărate, introduse în vase de incubație și supuse observațiilor zilnice, descrise în subcapitolul 1.2.

Pentru stabilirea influenței temperaturii asupra duratei incubației, au fost prevăzute trei variante: în prima variantă a fost studiată influența temperaturii de $18 \pm 2^\circ\text{C}$; în a doua variantă – $22 \pm 2^\circ\text{C}$, în a treia variantă – $26 \pm 2^\circ\text{C}$. Pentru fiecare variantă au fost efectuate 20 de repetări a câte o pontă. Vasele de incubație erau reprezentate de sarpagene din plastic, având baza căptușită cu hârtie de filtru, iar pe capac o etichetă pe care erau notate:

- proveniența ponteii (numărul experienței, numărul repetiției);
- data colectării/ introducerii la incubație.

Observațiile au fost efectuate zilnic și au urmărit aspectul morfologic al ouălor, ecloziunea larvară, comportamentul larvelor neonate, etc.

Controlul calității materialului biologic. Pentru studiul acestui parametru, la fiecare generație au fost prelevate randomizat, câte 10 ponte din cuștile adulților, varianta martor fiind reprezentată de ponte ale femelelor selectate în condiții naturale. Datele înregistrate zilnic se referă la aspectul ouălor, ecloziunea larvară, etc.

Selectarea mediului de creștere și stabilirea duratei dezvoltării larvare în condițiile creșterii pe medii artificiale comparativ cu creșterea pe hrană naturală. Principalele cerințe pe care trebuie să le îndeplinească un mediu artificial, utilizat la creșterea insectelor în masă sunt următoarele: să conțină toți nutrienții strict necesari dezvoltării normale a speciei, antibiotice și alte substanțe, care să elimine pericolul infectării mediului cu patogeni; substanțe, care să stimuleze apetitul larvelor și să fie ușor de preparat; să poată fi păstrat pe o perioadă cât mai îndelungă și să fie acceptat de un număr cât mai mare de specii.

Din punct de vedere al eficienței, după Stan și colab. (1992), în urma rezultatului creșterii larvelor pe mediul sintetic trebuie să se obțină cel puțin 75% de adulți din ouă viabile.

Pe parcursul experimentelor s-a elaborat 5 diete de creștere a larvelor de *H. cunea*. Fiecare mediu a reprezentat o variantă. La prepararea mediilor 1-3 se realizează următoarele etape:

- amestecarea: se mixează mai întâi agarul, celuloza, nutrienții proteici, amestecul de săruri minerale și o parte din apă; se adaugă substanțele de ajustare a pH-ului, lipidele dizolvate în prealabil în alcool etilic fierbinte (care se evaporă în 24 de ore);
- autoclavarea amestecului;

- răcirea la 60°C și adăugarea de glucoză, sucroză, amestec de vitamine, antibiotice și amestecuri inhibitoare pentru ciuperci și alți patogeni. Se pregătește o soluție, adăugând restul de apă distilată.

Pentru celelalte două medii artificiale într-un vas au fost introduse apă și agarul, iar amestecul a fost încăzit până la 100°C. Amestecul s-a răcit până la 60°C, după ce au fost adăugate restul ingredientelor: mai întâi acidul benzoic apoi formaldehida și substanțele nutritive, iar apoi vitaminele. Mediile de cultură au fost turnate în cutii alimentare cu capacitatea de 450-1000 ml. Mediile de cultură au fost păstrate în frigidere, timp de 2-3 săptămâni.

Vasele de creștere reprezintă cutii alimentare din plastic transparent, cu capacitatea de 200 ml. În vasele dezinfectate în prealabil cu soluție de formaldehidă, s-au introdus porțiuni de medii de creștere și apoi, cu ajutorul unei pensule, transferate larve neonate, câte 100/repetari. Varianta martor a fost reprezentată de larvele crescute pe substrat natural. În acest caz, în experiență vasele de creștere s-au utilizat paharele Berzelius cu capacitatea de 2000 cm³, la bază cu hârtie de filtru și acoperite cu evelină fixată cu ajutorul unei benzi elastice. În calitate de hrană s-au folosit lăstări, frunze de arțar sau dud, având baza introdusă într-o sticlă cu apă pentru menținerea turgescenței. Pe acest substrat de creștere s-au transferat larvele neonate, câte 100 de larve în repetare. Începând cu vârsta a 3-a larvele s-au transferat în vase zilnic în vase noi.

Observațiile efectuate au vizat comportamentul larvelor pe parcursul dezvoltării; mortalitatea larvară, specificându-se și cauza acesteia (accidente, boli etc.); transferul crisalidelor în momentul formării acestora. Pe întreaga durată a dezvoltării, temperatura în camera de creștere a fost de 24±1°C, umiditatea relativă de 85±5°C și fotofaza de 16 ore.

Stabilirea momentului propice pentru colectarea biomasei baculovirale. Larvele de *H. cunea*, obținute în laborator din ponte sterilizate, au fost crescute pe diete artificiale în mod obișnuit până la vârsta a treia, după care au fost transferate în vase de creștere cu capacitatea de 950 ml și hrănite cu o dietă conținând 6 x 10⁹ granule/ml. În fiecare vas au fost amplasate câte 20 larve, reprezentând o repetare din cele cinci în cadrul fiecărei variante. Acestea au fost ținute la 23°C, 26°C, 29°C și 32°C. Zilnic s-au efectuat observații, privind comportamentul și mortalitatea larvelor. Larvele afectate de baculovirus au fost procesate prin următoarea schemă:

1. Mixare (omogenizare) în apă distilată
2. Filtrare prin evelină
3. Centrifugare 25 min la 6000 g
4. Uscare în hotă la temperatura camerei
5. Măcinare până la o pulbere fină

Stabilirea metodei de colectare a larvelor. Colectarea larvelor a fost efectuată cu aplicarea următoarelor două metode:

- manual cu ajutorul unei pensule,
- aplicarea unui dispozitiv cu vid, care absoarbe larvele într-un vas cu capacitatea de 3 litri. S-au colectat exclusiv larvele cu simptome specifice infecției virale.

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. Larvele moarte se macerează cu ajutorul omogeneratorului sau se fărâmițează în piuliță. Masa biologică amestecată cu bidistilat steril se filtrează prin plasa de capron. Pentru purificare suspensia virală filtrată se centrifughează timp de 10 min la 5000 rotații/min. Sedimentul obținut a fost diluat într-o soluție constituită din volume egale de alcool etilic și supus unei noi centrifugări timp de 10 minute la 5000 rotații/min. Sedimentul din nou a fost reluat și recentrifugat în aceleași condiții. Ultima centrifugare a sedimentului prezintă o pulbere fină de granule virale, fiind suspendată în eter etilic și lăsat să se usuce la aer și se obține o pulbere de granule în stare pură.

Pentru cercetarea particularităților morfologice și biochimice ale virusurilor încapsulați în cadrul SVC sau SPVC se aplică diverse metode, care reprezintă unele optimizări ale metodei elaborate de către Bergold. Esența metodei se bazează pe proprietățile proteinelor din componența matricei baculovirale (poliedrină și granulină) de a se solubiliza în soluții de tampon cu pH titrat pentru anumite specii de virus. În acest scop, se aplică centrifugarea fracționară, care permite sedimentarea proteinelor la accelerarea de 2000 rotații/min, iar a virionilor – la 20 000 rotații/min.

Titrarea baculovirusurilor. Pentru determinarea concentrației baculovirusurilor se folosesc diverse metode, îndeosebi, microscopia electronică și optică [53]. 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 [58].

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 [57, c. 15-19], [56], [4], [3].

Cercetările electrono-microscopice necesită lucrări prealabile ample, care includ pregătirea materialului biologic al grilelor, soluțiilor și peliculelor. Ele au fost efectuate în conformitate cu prevederile tehnicii elaborate de Adams [59, p. 1837-1850].

Pentru fixarea materialului biologic a fost folosită soluția de 2% de aldehydă glutarică. Spălarea probelor s-a efectuat în soluție tampon constituită din: 50% tampon cacodilat, 50% apă bidistilată și zaharoză. Postfixarea probelor s-a efectuat cu soluție de OsO_4 în concentrație de 4%. Materialul fixat în așa mod s-a deshidratat în serii de acetonă (20%-100%), iar apoi s-a turna 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-Iung (Austria). Acestea au fost contrastate cu soluție apoasă de 2% de uranil-acetat timp de 30 min, apoi cu citrat de plumb – soluție după Reynolds (1963).

2.4. Determinarea numărului de poliedre

Metoda este bazată pe numărarea suprapoliviriocapsizilor (SPVC) la microscopul optic cu contrast de fază în camera Goreaiev. Pentru determinarea concentrației VG s-a folosit metoda picăturii strivite

$$T = 5,76 \times 10^6 \times A \times K, \text{ unde: } \quad (2.5), \text{ unde}$$

T – titrul suspensiei (SPVC);

A – numărul mediu de SPVC în pătratul rețelei oculare;

K – gradul de diluare a suspensiei virale.

Testarea sușelor identificate și recombinate ale insectelor de *H. cuinea* s-a efectuat pe larve specifice ale insectelor de vârstă a doua, crescute pe medii de cultură selective. Pentru aceasta s-a aplicat metoda diluțiilor succesive de la 10 până la 1000 particule virale pentru o larvă. Larvele erau hrănite cu mediu infectat, ulterior menținute la 26-28°C. Timpul letal s-a determinat la infectarea larvelor cu doză sporită de particule virale (250 poliedre la o larvă). Testarea în condiții de laborator și câmp s-a efectuat în 4 repetări randomizate, în conformitate cu cerințele generale ale experiențelor de acest gen.

Stabilirea metodei de păstrare a larvelor virozate. Pentru a stabili metoda optimă de păstrare s-au colectat larvele care prezentau simptomele infecției cu baculovirusuri, au fost colectate și păstrate în două modalități: în pungi de plastic a câte 0,1 kg, în frigider sau congelator la diferite temperaturi în pungi vidate, în frigider sau în congelator.

2.5. Obținerea biomasei virale

Dezvoltarea unor tehnologii viabile necesită selecția unei tulpini virulente a baculovirusurilor la specia *H. cunea*. Este foarte important ca pentru multiplicare, înregistrare și folosire să fie selectată tulpina cea mai activă. În cercetările realizate s-au folosit baculovirusuri din trei surse:

1. VG izolat din larve de *H. cunea* colectate din 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)

Cele trei baculovirusuri au fost izolate, purificate și utilizate în teste de laborator pe larve crescute în condiții controlate, câte 3 repetări x 100 de larve/varianta. Administrarea baculovirusurilor s-a făcut prin stropirea frunzelor, care au servit drept hrană pentru larvele proaspăt năpârlite de vârsta a doua. Această metodă a fost aleasă datorită condițiilor asemănătoare celor 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 $24 \pm 25^{\circ}\text{C}$, iar iluminarea a fost de 16 ore lumină și 8 întuneric. Hrana administrată ulterior a constatat din frunze, la fel ca și în varianta martor. Baculovirusurile au fost izolate din cadavrele larvelor afectate și puse în evidență cu ajutorul tehnicilor de microscopie electronică.

Monitorizarea caracterului epizootic în cadrul populației larvelor *H. cunea*. Cercetările la această etapă au fost determinate de necesitatea colectării unei cantități cât mai mari de virus, având în vedere atât criteriul economic, cât și aspectele legate de sensibilitatea larvelor, condițiile fiziologice și structura genetică a loturilor larvare testate. Cercetările au fost desfășurate în perioada 2011-2017 în laborator, exclusiv pe larve crescute în condiții controlate.

În vasele de creștere a larvelor, inoculul viral a fost pulverizat fin, direct pe substratul nutritiv. După 30 de minute larvele au fost transferate cu ajutorul unei pensule. Mortalitatea în stadiul larvar s-a înregistrat zilnic, diferențiat după cauză (naturală, patologică sau din manipulare) prin analiza microbiologică a cadavrelor. Martorul a constatat în loturi a câte 100 larve din fiecare vârstă larvară, a căror hrană nu a fost contaminată cu baculovirusuri.

Determinarea dimensiunilor ingredientelor preparatului. Preparatul în cantitate de 20g în pahar s-a amestecat minuțios cu o baghetă de sticlă, adăugând 200 ml de apă. Conținutul omogenizat se transferat pe o sită nr. 009, adusă prin uscare până la masă constantă. Conținutul

rămas pe sită s-a spalat sub un jet de apă timp de 15 min. Sita cu resturile rămase pe ea s-a uscat în dulapul de uscare la 80-85°C, apoi s-a cântărit din nou.

Gradul de fărâmițare se exprimă prin cantitatea preparatului ce depășește 90 nm și se calculează după formula:

$$x = \frac{m_1}{m} \times 100, \text{unde} \quad (2.1)$$

m – masa inițială a preparatului,

m₁ – masa preparatului rămas după spălare.

Pentru asigurarea calității înalte, particulele mai mari decât gradul de fărâmițare standard nu trebuie să depășească 5 %.

Determinarea umidității preparatului. Într-o fiolă de sticlă, adusă până la masa constantă, s-a trecut 5 g de preparat. Fiola deschisă s-a amplasat în dulapul de uscat la 100-105°C pentru 3 ore. Fiola, după ce s-a răcit în exicator, s-a uscat până la masa constantă.

Umiditatea preparatului s-a determinat după formula:

$$x = \frac{m_0 - m_1}{m_2} \times 100, \text{unde} \quad (2.2)$$

m₀ – masa fiolei cu preparat până la uscare,

m₁ – masa fiolei cu preparat după uscare,

m₂ – masa preparatului.

Umiditatea preparatului trebuie să nu depășească 8-10 %.

Determinarea activității biologice a preparatului. Au fost elaborate mai multe metode de determinare a activității biologice a baculovirusurilor [23, 24]. 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 de 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 [55, 54]. S-au efectuat calcule suplimentare, care a permis 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 virotice care asigură moartea a 50% din larvele experimentale. Cunoscând concentrația virusului și volumul suspensiei virale s-a determinat ușor concentrația letală (CL₅₀) [27, 31].

Luând în considerare faptul, că moartea insectelor testate poate fi cauzată și de alți factori, ce nu țin de potențialul de infecție al virusului, pentru determinarea activității biologice a preparatelor s-a aplicat formula Abbot, care ia în cont și mortalitatea larvelor în control:

$$x = \frac{M_c - M_o}{100 - M_c} \times 100, \quad (2.4)$$

unde: A_b – activitatea biologică exprimată în procentul de mortalitate al insectelor,

M_o – % mortalității larvelor în experiment,

M_c – % mortalității larvelor în control.

Pentru determinarea activității biologice a baculovirusurilor se aplică și timpul letal (TL_{50}), exprimat în timpul în care se înregistrează moartea a 50 % din larve. Acest indice s-a determinat în mod analogic cu (CL_{50}), înregistrând rezultatele la intervale de timp. Datele estimate au fost procesate în cofomitate cu pachetul Software Microsoft [20].

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 infectate 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, expuse în continuare (Figura A 1.11). Faza optimă de dezvoltare a insectei, pentru înmulțirea în masă este cea a larvelor de vârstă I, II.

3.1. Evoluțiile și caracteristicile gradației dăunătorului de *H. cunea* la culturile agricole forestiere și decorative

În diferite zone a 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 pe teren în zona de Centru (Chișinău, Grușova, Sângera, Meleșeni), din zona de Nord – Coreștauți, raionul Ocnița, Tabani, raionul Briceni), a fost stabilit gradul de răspândire a dăunătorului în Republica Moldova. Cercetările efectuate pe parcursul ultimilor ani au stat la baza monitorizării agravării stării fitosanitare. Secetele frecvente, iernile aspre cu puțină zăpadă, înghețurile de primăvară din perioada de monitorizare și sporirea densității populațiilor de insecte dăunătoare au avut un impact evident asupra culturilor agricole și a cauzat uscarea masivă a livezilor și masivelor silvice.

În rezultatul clasificării s-au determinat speciile preferate pentru înmulțirea în masă: dudul (*Morus nigra*); lemnul cânesc (*Ligustrum vulgare*); alunul (*Corylus avellana*); ulmul (*Ulmus campestris*, *Ulmus gscabra*); teiul (*Tilia cordata*); plopul (*Populus alba*); salcia (*Salix fragilis*); salcâmul (*Robinia pseudoacacia*), cenozele cu arțar (*Acer campestre*, *A. negundo*, *A. platanoides*, *A. pseudoplatanus*, *A. saccharinum*) și nucul comun (*Juglans regia*) (Figura A 5.6 - 5.14). În zonele favorabile înmulțirii insectei gradațiile apar, de regulă, la intervalele mai scurte

(4-5 ani) și au o amploare mare. În zonele mai puțin favorabile, gradațiile se repetă la intervale de timp mai mari, fiind de amploare 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 de mortalitate, printre care un loc deosebit revine microorganismelor entomopatogene (Tabelul 3.1).

Tabelul 3.1. Gradul de infestare a speciilor de arbori cu larvele de *H. cunea*

Zona geografică a Republicii Moldova (Localitatea)	Numărul de arbori examinați	Numărul de arbori atacați	Gradul de infestare, %
Nord			
Brânzeni (Edineț)	92	92	100
Naslavcea (Ocnița)	37	18	49,5
Briceni	38	11	3,1
Mihailovscoe (Râșcani)	103	76	66,1
Glingeni (Fălești)	86	86	100
Centru			
Hrușova (Criuleni)	22	4	33,7
m. Chișinău	112	12	10,7
Sângera (Chișinău)	16	11	81,5
Dobrogea (Chișinău)	15	8	35,2
Sud			
Vinogradovca (Taraclia)	17	1	30,7
Cucoara (Cahul)	16	7	10,7

Datele prezentate în tabel permit să, constatăm că *H. cunea* a atacat cei mai mulți arbori din zona de Nord, unde gradul de infestare atinge 100%, cum a fost la Brânzeni (Edineț) și Glingeni (Fălești). Cercetările stării fitosanitare a masivelor silvice precum și deplasările în teren în gospodăriile agricole din zona de Sud, Centru și Nord pe teritoriul Republicii Moldova au demonstrat pe parcursul ultimilor ani o înrăutățire considerabilă a stării fitosanitare. Pe parcursul anilor 2004-2016, Omida-păroasă-a-dudului s-a aflat la un nivel mediu de dezvoltare a populațiilor. Condițiile iernilor din aceasta perioadă au avut un impact destul de mare asupra fazei de iernare. Prima generație, ieșind din diapauză, în luna februarie, odată cu creșterea bruscă a temperaturii, a cauzat eclozarea fluturilor, care au depus numeroase ponte.

Într-un complex biocenotic populația insectei-gazdă reprezintă unul din elementele mediului sau al ecosistemului, în care alături se găsesc dispersate într-un număr mai mare sau mai mic și microorganismele entomopatogene. Acestea printr-o înmulțire mai rapidă se pot acumula în masă în populațiile de *H. cunea*, provocând epizootii, în urma cărora gradația insectei se poate reduce pe cale naturală.

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*) [154]. În Republica Moldova aceste specii sunt considerate ca plante indicatoare pentru semnalarea acestui dăunător [37, 187]. 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 jobținerea biomasei baculovirale [17, 18].

Problemele de natură fiziologică ale populației de insecte, care se înregistrează în faza de erupție și criză, ca urmare a acțiunii factorilor biotici și abiotici poate conduce la activarea baculovirusurilor latente existente în corpul larvelor, care după o anumită perioadă de multiplicare declanșează epizootile virale. Virusurile latente ale poliedrozei nucleare se localizează în nucleii celulelor gazdă și sunt transmise din generație în generație [22, p. 96-106.], [188, p. 157-160].

Condițiile climatice din perioada aprilie-iunie au influențat semnificativ dezvoltarea *H. cunea*. Este necesar de menționat faptul că înghețurile, temperaturile ridicate (35-40°C) au acționat în mod nefast asupra populațiilor (Figura 3.1).

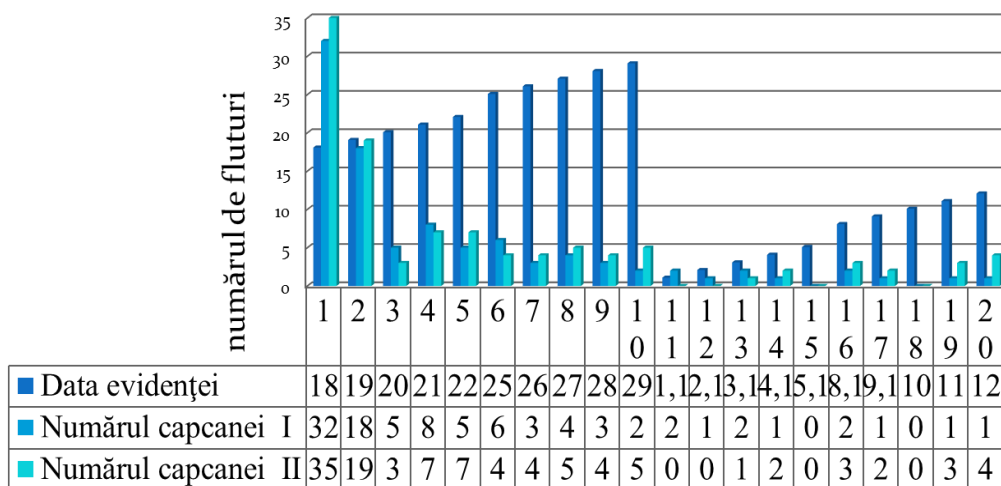


Fig. 3.1. Dinamica numărului de adulți ai speciei *H. cunea*, capturați în capcana feromonală cu lumină, 2010-2015

S-a constatat că numărul adulților ai speciei *H. cunea*, capturați în capcana feromonală cu lumină au fost 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. Rezultatele înregistrate în ultimii ani, cu capturi relativ slabe de fluturi confirmă faptul, că dăunătorul se află la faza de dezvoltare depresivă. 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.

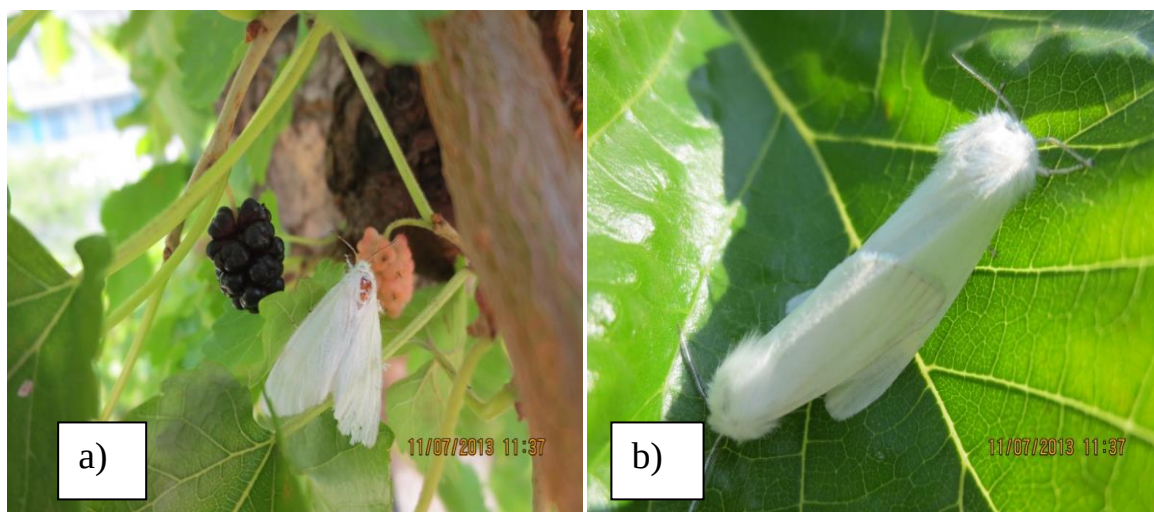


Fig. 3.2. Adulții de *H. cunea* cu aripile de tonalitate albă (♂,♀)(a, b), 2013

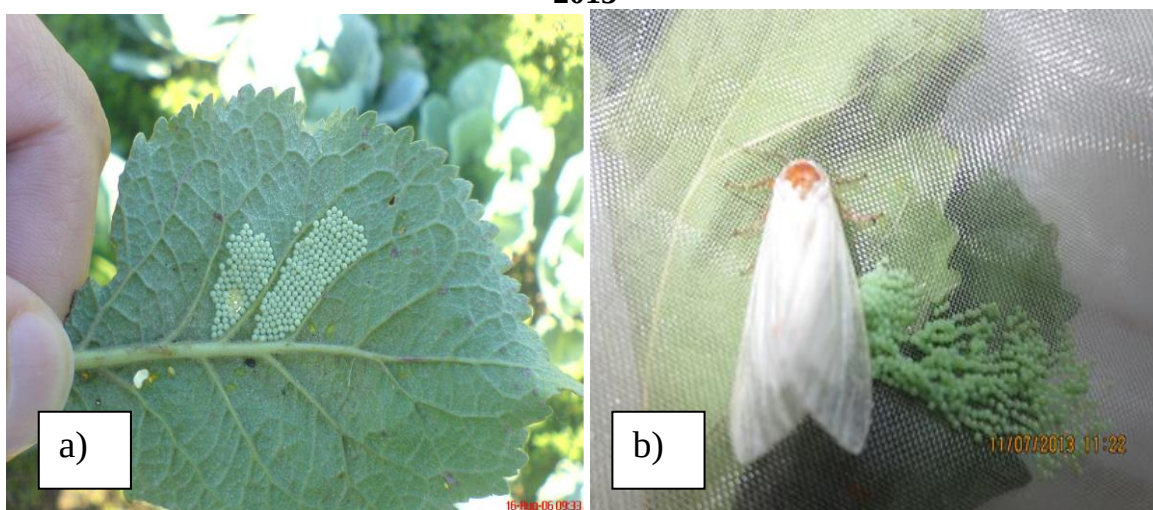


Fig. 3.3. Aspectul general al diferitor ponte (a,b) de *H. cunea*, 2013

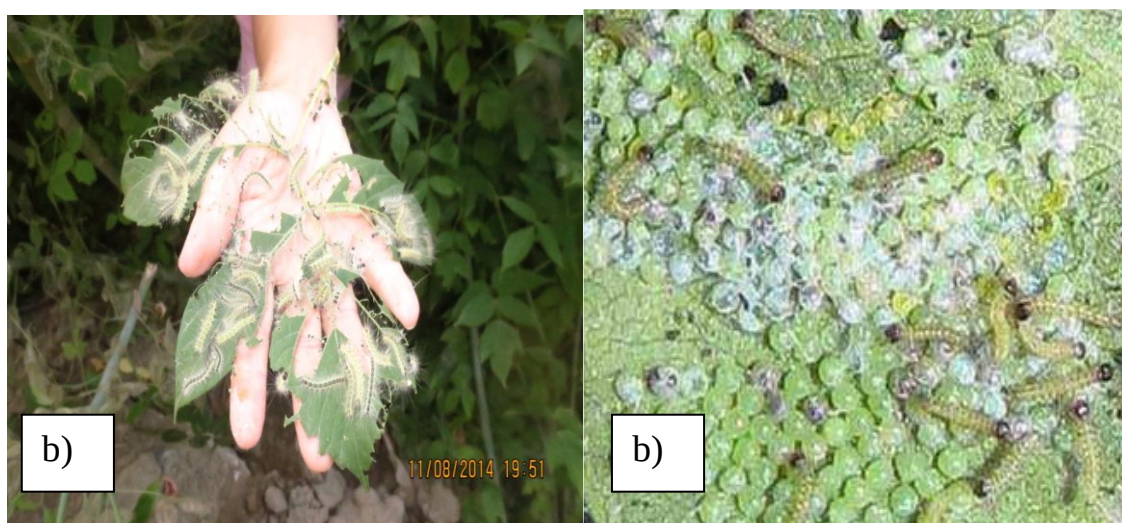


Fig. 3.4. Aspectul general al larvelor (a) și eclozarea larvelor de *H. cunea* (b), 2014

Pentru monitorizarea *H. cunea* au fost amplasate capcane feromonale cu lumină. Folosirea capcanei cu lumină pentru semnalarea și depistarea defoliatorului *H. cunea* contribuie în același timp la menținerea nivelului populației sub pragul intrării acesteia în gradație (Figura 3.5 (a,b)).

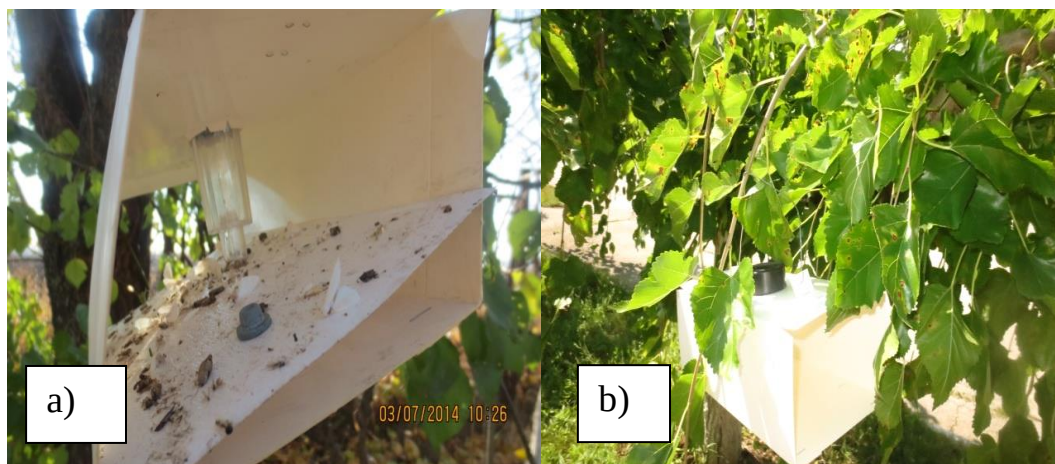


Fig. 3.5. Capcane feromonale cu lumină (a, b) pentru capturarea *H. cunea*

În perioadele de gradație, larvele pot provoca defolieri de intensități diferite, a căror amploare depinde de regiunea în care are loc înmulțirea în masă, structura și specia de plantă, precum și de condițiile climatice, umiditatea, temperatura ridicată.

Perioada atacului a continuat pe tot timpul sezonului de vegetație, fiind mai intens în lunile iunie-august. 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 considerat unicul criteriu pentru prognozarea apariției primilor fluturi primăvară (Figura 3.6).

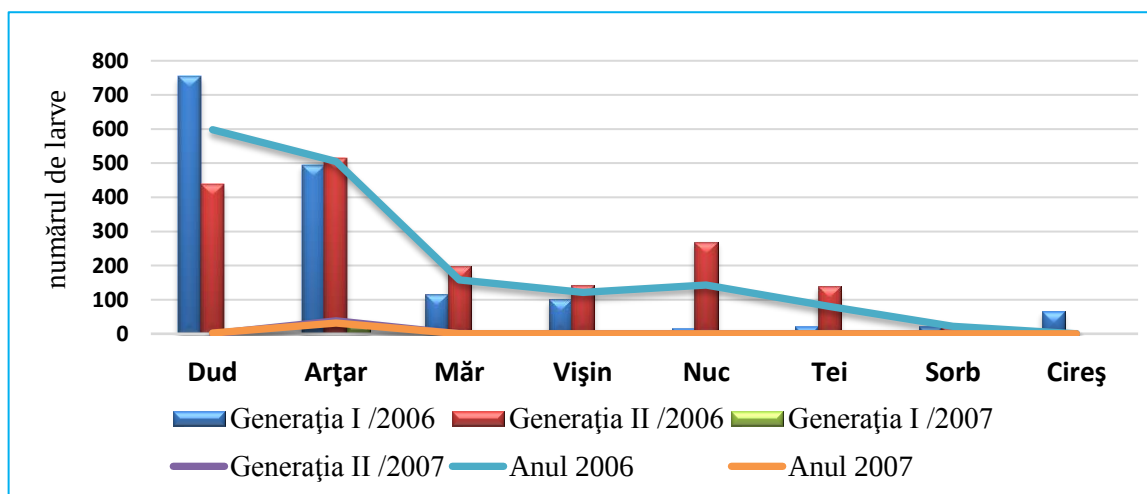


Fig. 3.6. Atacul *H. cunea* pe arbori la diferite specii pe generații/ani

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 amploare 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, fâșiile forestiere, livezile pomicole experimentale și industriale, precum și 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 monitorizarea.

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 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. Eficacitatea biologică 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 [16, 18] (Tabelul 3.2).

Tabelul 3.2. Izolarea și identificarea tulpinilor de baculovirusuri la *H. cunea*

Nr.	Locul colectării	Agenți patogeni identificați				Aplicarea
		baculo-virusuri	bac-terii	ciu-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 Chișinău, Hrușova (Criuleni).	VPN	+	+	-	Virin-ABB-3, cercetare

S-au depistat simptomele la larvele atacate de baculovirusuri, exprimate printr-o culoare brună-gălbui. 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 la microscopul optic pentru depistarea baculovirusurilor. Femelele pierite de *H. cunea*, infectate de baculovirusuri, au fost tratate cu alcool etilic (70%) și ulterior au fost selectate pentru analiza histologică. Apoi, a fost prelevată din țesutul bolnav o mostră de țesut, cu ajutorul bisturiului steril, care a fost omogenizată într-un major steril și dizvoltată în 2-3 ml apă sterilă, obținând suspensia, utilizată ulterior pentru infectarea larvelor.

Cele trei baculovirusuri au fost izolate, purificate și utilizate în teste de laborator pe larve crescute în condiții controlate, câte 3 repetări a câte 100 de larve în fiecare variantă. Administrarea baculovirusurilor s-a efectuat prin stropirea frunzelor, care au servit drept hrană pentru larvele de vârstă a doua, proaspăt năpârlite. Această metodă a fost aleasă datorită corespunderii condițiilor de câmp, fiind calea obișnuită de infectare a larvelor în natură. Temperatura din camera de creștere a fost de 24-25°C, fotoperioda constituind 16 ore lumină și 8 ore 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 microscopiei optice și electronice.

Pentru realizarea preparatului viral, predestinat combaterii *H. cunea* s-au realizat investigații orientate spre identificarea unor sușe cu caractere respective în condiții naturale. Au fost utilizate tulpini atât de VPN, cât și de VG. În acest sens prin izolarea unui virus se înțelege izolarea din celule, hemolimfă sau culturi de celule și eliberarea lui de particulele străine. Determinarea caracterului patogen al virusurilor izolate s-a efectuat conform postulatelor triadei Koch, în care un agent patogen trebuie să fie găsit în leziunea unei boli, izolat de la gazda infectată și crescut într-o cultură pură, să fie recuperat din nou, de la gazda a doua, să inițieze boala la inocularea unui asemenea agent într-o altă gazdă sănătoasă.

Virusurile entomopatogene acționează asupra insectelor prin localizarea lor la nivelul anumitor țesuturi, dezvoltându-se fie în nucleele celulelor (în cazul virusului poliedrozei nucleare), fie în citoplasma celulelor (în cazul virusului granulozei). Pe parcursul procesului patologic, în celulele și țesuturile infectate, se produc numeroase modificări patologice și biochimice, ale căror intensitate diferă de la o specie de virus la alta și de la o insectă la alta. Așa cum rezultă din aceste studii, insectele infectate cu virusuri entomopatogene manifestă diferite simptome, care pot fi grupate în trei categorii: simptome morfologice, fiziologice și de comportament.

Elaborarea tehnologiilor de producere și aplicare a insecticidelor baculovirale este indispensabilă de cercetarea particularităților lor morfologice. Au fost studiate și aplicate ambele genuri de baculovirusuri (Baculoviridae): Nucleopolyhedrovirus și Granulovirus.

Baculovirusurile în procesul contactului infectează stomacul, corpul gras, hipoderma, celulele hemolimfei, epiteliul traheal, celulele nervoase, gonadele – practic toate organele omizii, îndeosebi ale primelor vârste larvare. În condiții naturale virusurile granulozei și poliedrozei nucleare (VG și VPN) se reproduc independent, dar numai 4% din situații pot fi întâlnite ambele virusuri. După particularitățile morfologice virionii sunt baciliformi, de aici provine și denumirea familiei. Mărimea virionilor este cuprinsă între 30-60 nm în diametru și 250-300 nm în lungime. La interacțiunea genomului viral cu proteinele se formează o nucleocapsidă, care este înconjurată de o membrană anvelopantă, ce formează un virion în formă de bastonaș. Larvele *H. cunea* se infectează cu reprezentanți a 2 genuri de virusuri din familia Baculoviridae: Nucleopolyhedrovirus (VPN) și Granulovirus (VG) [161, p. 306], [131, p. 425-459]. Nucleopolyhedrovirus (VPN) formează SPVC cu dimensiunea de 1,2x0,5 mcm, în interiorul cărora se amplasează virioni cu dimensiuni de 220x37 nm [118, p. 1043-1050].

Insectele infectate se deosebesc puțin de cele sănătoase, numai în acest caz corpul lor se mărește în volum și are o culoare mai deschisă. Pe măsură ce infecția progresează larvele bolnave pierd mobilitatea, scade intensitatea hrănirii și pier adeseori înainte de împupare. Larvele moarte capătă culoarea gri și treptat se întunecă. Organele interne ale larvei se descompun, având o culoare gălbuie albicioasă. Amploarea simptomelor și tipul de simptome depind de mai mulți factori, dintre care cei mai importanți sunt tipul de virus și insecta-gazdă. Astfel, în cazul virusului poliedrozei nucleare, larvele lepidopterelor se comportă diferit de la o specie la alta.

În cazurile identificării prezenței virusurilor este necesară efectuarea mai multor teste cu aplicarea diferitor metode. Cea mai modernă metodă care dă rezultate mai adecvate este metoda imunologică și histochimică, care demonstrează existența certă a virusurilor. Este semnificativ faptul, că spre deosebire de alte virusuri, baculovirusurile nu provoacă imunitatea organismului, adică nu se formează anticorpi, ceea ce permite utilizarea lor în dirijarea densității populațiilor anumitor organisme. La etapa actuală, virusurile reprezintă acea armă, care poate regla densitatea organismelor vii și ele pot fi aplicate în anumite cazuri în folosul omului la momentul când sunt utilizate direcționat pentru reglarea dezvoltării anumitor organisme la culturile agricole și silvice.

Unitatea structurală a baculovirusurilor reprezintă virionii asamblați în formațiuni proteice, numite suprapoliviriocapsizi (SPVC), care pătrund în corpul insectelor prin ingestie, ajung în intestinul mediu și, sub acțiunea enzimelor, se deproteinizează și eliberează virionii,

care se reproduc în celulele epiteliale și pe care le distrug. În general la lepidoptere, după 2-3 zile de la infecție, apar primele simptome ale formării poliedrelor și coagulării cromatinei în nucleul celulelor. S-a observat, că în primele faze ale infecției virale, are loc o creștere a dimensiunilor nucleului și nucleolilor; ulterior se constată, că numărul nucleolilor se reduce, iar cei rămași devin mult mai mari.

Cercetările efectuate la *H. cunea* indică că simptomele externe ale bolii provocate de VPN, sunt scăderea mobilității și activității larvelor, ruperea cu ușurință a epiteliului, eliminarea hemolimfei. Examinarea larvelor în diferite momente din evoluția procesului patologic, arată că poliedrele se dezvoltă succesiv în următoarele țesuturi: corpul gras, hipodermă, matricea traheală, teaca musculară, teaca nervoasă, mușchii, ganglionii, celulele pericardiale. Histopatologia larvelor infectate, se caracterizează prin prezența în nucleul celulelor majorității țesuturilor infectate, în țesutul traheal și în cel gras, a unui număr mare de poliedre, care conțin particule virale anvelopate. Aceste formațiuni virale pun în evidență existența unui proces patologic foarte avansat, care are ca rezultat mortalitatea în masă într-un timp foarte scurt (1-2 zile) a populației de larve virozate.

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

În baza acestor studii s-a 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 soluționarea unelor probleme ecologice, cum ar fi prognozarea relațiilor dintre dăunători și entomofagi precum și precizarea termenilor de tratament și al numărului de generații în zonă. Dacă dinamica numărului de specii, în funcție de condițiile de existență este un proces multifactorial, atunci numărul de factori de mediu, care în esență influențează semnificativ numărul de populații ale unei specii, este întotdeauna mult mai mic [194, p. 161-165], [193, p. 69-73].

Acest fenomen se explică prin faptul, că neavând capacitatea de a se adapta la un număr mare de factori, populația este nevoită să-și mobilizeze mijloacele de existență pentru a evita contactul cu majoritatea factorilor limitativi. Întrucât principalul factor, care influențează dezvoltarea *H. cune*, este temperatura, i-ar cele mai eficiente tratamente se efectuează în raport cu larvele de vârstă mică a dăunătorului, a fost întocmit calendarul fenologic pentru teritoriul Republicii Moldova folosind metoda propusă de Sergheeva și Levitina (1973) (Tabelul 3.3).

Tabelul 3.3. Calendarul fenologic al eclozării larvelor de *H. cunea* și data recomandată de efectuare a tratamentelor cu Virin ABB-3

Datele reale ale ovipозиției	Devieri reale ale temperaturii aerului pentru o perioadă de timp de la norma multianuală, °C													
	T°C 0	Termenul tratamentelor	T°C +1	Termenul tratamentelor	T°C +2	Termenul tratamentelor	T°C +3	Termenul tratamentelor	T°C -1	Termenul tratamentelor	T°C -2	Termenul tratamentelor	T°C - 3	Termenul tratamentelor
1.05	19	29	16	26	14	24	12	22	21	1.06	25	5.06	30	10.06
3.05	20	30	17	27	16	26	14	24	23	3.06	26	6.06	30	10.06
5.05	21	1.06	18	30	17	31	16	26	24	4.06	27	7.06	31	11.06
8.05	23	3.06	21	1.06	19	1.06	18	30	25	5.06	29	9.06	1.06	12.06
10.05	24	4.06	22	2.06	21	1.06	20	31	26	6.06	30	10.06	2.06	13.06
13.05	26	6.06	24	4.06	23	3.06	23	3.06	28	8.06	31	11.06	4.06	15.06
15.05	27	7.06	26	6.06	25	5.06	25	5.06	30	10.06	1.06	12.06	5.06	16.06
10.07	20	27	19	26	19	26	18	25	20	27	20	27	21	28
13.07	22	29	22	29	22	29	21	28	23	30	23	30	24	31
15.07	24	31	24	31	24	31	23	30	25	20	25	20	26	2.08
18.07	27	3.08	27	3.08	27	3.08	26	2.08	28	4.08	28	4.08	29	5.08
20.07	29	5.08	29	5.08	29	5.08	28	4.08	30	5.08	30	5.08	31	6.08
23.07	1.08	7.08	1.08	7.08	1.08	7.08	31	6.08	208	9.08	2.08	9.08	3.08	10.08
25.07	3.08	10.08	3.08	10.08	3.08	10.08	2.08	9.08	4.08	10.08	4.08	10.08	5.08	11.08
28.07	6.08	12.08	6.08	12.08	6.08	12.08	5.08	11.08	7.08	13.08	7.08	13.08	8.08	14.08
30.07	8.08	14.08	8.08	14.08	8.08	14.08	7.08	13.08	9.08	15.08	9.08	15.08	10.08	16.08

Datele prezentate în tabel denotă, că tratamentele de protecție trebuie efectuate în momentul, când s-a terminat eclozarea larvelor din ponte. Calendarul se utilizează în felul următor: să presupunem, că începutul depunerii ouălor *H. cunea* în Republica Moldova are loc pe 15 mai, iar temperatura medie a aerului în această lună este mai mare decât norma multianuală cu un grad. La intersecția coloniței de 15 mai cu colonița +1⁰C găsim data primei apariții a larvelor din prima generație, și anume – 26 mai. La o deviere medie a temperaturii aerului în aceeași perioadă de timp cu un grad, începutul eclozării larvelor *H. cunea* va avea loc pe 30 mai. De regulă, larvele nu eclozează simultan, procesul prelungindu-se cu 1-1,5 luni. Utilizând acest calendar putem anticipa tratamentele de protecție, ceea ce permite nu numai de a pregăti din timp echipamentul necesar, dar și avertizarea populației locale privind efectuarea tratamentelor. La înlăturarea cuiburilor împăiengenite 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, înlăturarea 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 numărului de insecte, trebuie 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 cu calitate înaltă. În acest sens, pentru obținerea noilor modalități de a controla calitatea biomaterialului a fost stabilit un nivel calitativ diferit al populațiilor de insecte ca răspuns la factorul trofic.

Intensitatea factorilor specifici și viabilitatea insectelor. O importanță deosebită pentru controlul calității estimării biomaterialului o au indicatorii structurali ai populației și viabilitatea insectelor. Un rol imens în reglarea relațiilor dintre insecte îl au receptorii de mediu. În mod permanent, insecta recepționează din mediul extern (natural și artificial), precum și din interiorul organismului numeroase semnale de diferită natură.

În interiorul populației *H. cunea* există întotdeauna un grup de indivizi care răspund cu intensitate diferită la acțiunea anumitor factori specifici. Adesea factorii stimulatori ne oferă informație cu referire la potențialul de adaptare a insectelor la modificările condițiilor de mediu. În același timp, capacitățile de adaptare ale populației stabilesc viabilitatea lor, ca o trăsătură determinată genetic de a supraviețui și de a produce urmași în diferite condiții de mediu. Pe baza ipotezelor de mai sus, este util de a analiza relația dintre intensitatea stimulatoarelor și viabilitatea populației de insecte.

Studiul teoretic al problemei date este strâns legat de analiza surselor bibliografice. În lucrările lui Zlotin și colab. (2015) pentru prima dată a fost demonstrată experimental existența unei relații dintre nivelul viabilității viermilor de mătase de sex masculin cu intensitatea răspunsului feromonului sexual al femelei. Studiile biochimice la adulții de sex masculin, cu sensibilitate ridicată la feromonul sexual feminin au indicat, că acești indivizi se caracterizează printr-un nivel metabolic mai înalte.

Ulterior această relație a fost confirmată și pentru alte specii de insecte, stabilind dependența nivelului de viabilitate de reactivitatea dăunătorului la stimulatori (sensibilitatea la miros de frunze de dud). Mai mult, adulții de sex masculin dezvoltați din astfel de larve au avut o sensibilitate mai mare la feromonul sexual feminin. Acestea demonstrează activitatea ridicată a

transducției senzoriale foarte viabile în toate fazele active ale ontogenezei. În timpul selecției, după intensitatea stimulatoarelor de mediu la larvele *H. cunea* pentru a optimiza biomaterialul a fost demonstrată, pentru prima dată, existența relației dintre populațiile viabile ale *H. cunea* și intensitatea fotofactorului.

Astfel, a fost demonstrată experimental manifestarea legii generale biologice privind relația receptorilor dintre insecte și indicatorii lor biologici, care este confirmată experimental. Experimentele 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. Materialul biologic ales din zona cu gradație înaltă se caracteriza prin indicatorii: 1,8-2,4 g; numărul de ouă depuse – 421-1210 bucăți, viabilitatea larvelor – 96%, numărul de ouă în pontă – 12-150, viabilitatea larvelor – 42%. Fiecare variantă a inclus 4 repetări a câte 100 larve.

Studiul asupra factorului trofic la *H. cunea*. Pentru stabilirea efectivului acestora și a viabilității dăunătorului, a fost utilizată metoda de selectare a larvelor după eclozarea din pontă pe hârtie de filtru rasă cu frunză de dud. Au fost alese larvele, care în decurs de 15 minute s-au deplasat pe partea de hârtie rasă cu frunză de dud (slăbirea atractivității larvelor), fiind identificați cei mai sensibili reprezentanți. Alegerea larvelor a avut loc de la orele 6⁰⁰ până la 8⁰⁰ dimineata. Pentru frecare hârtie a fost utilizată o frunză matură de dud, tăiată din condiții naturale imediat înainte de experiență.

Studiul factorului fonic la *H. cunea*. Pentru stabilirea legăturii dintre viabilitatea populației și intensitatea fototaxisului, a fost utilizată metoda de selecție nocturnă a larvelor după incubare, care se folosește la reproducerea Viermilor-de-mătase. Au fost selectate larvele pentru hrănire, care s-au ecluzat în primele 40 de minute de la începutul iluminării ouălor. Iluminarea a fost efectuată cu lămpi fluorescente timp de 16-18 ore.

Determinarea sensibilității masculilor față de feromonul sexual al femelelor de *H. cunea*. A fost utilizat feromonul sexual monocomponent și bicomponent al femelelor, elaborat de ESP „Biohimtech”. Masculii au fost transferați într-o încăpere fără femele, au fost plasați pe foi de hârtie (4 repetări a câte 100 de bucăți) la o distanță de 5 cm unul de celălalt. La vârful antenelor acestora (2 cm), a fost aplicat bastonașul de sticlă îmbibat prealabil în feromonul sexual (Tabelul 3.4), [189, p. 162-163].

Tabelul 3.4. Dependența manifestării intensității stimulatoarelor față de viabilitatea *H. cunea*

Varianta	Viabilitatea larvelor, %	Intensitatea manifestării factorilor de mediu, %
Martor	73,1±1,72	56±1,21
Selecția după factorul trofic	83,1± 1,66	65±0,72
Selecția după factorul chimic (feromon)	88,2 ±1,29	70±1,07
Selecția după factorul fonic	82,3±1,57	66±1,11

Pentru a preveni zborul masculilor, *H. cunea* a fost fixată de aripi pe foi cu știfturi entomologice. Testarea a fost efectuată dimineața la două ore după apariția masculilor (de la ora 8⁰⁰ până la ora 10⁰⁰). Manifestarea răspunsului caracteristic masculilor a fost evaluată prin reacțiile de testare a mișcării antenei, membrelor anterioare, curbarea abdomenului și „dansul de curtenie”. Masculii care au avut reacție de răspuns la acțiunea feromonului au fost împerecheați. Descendenții femelelor împerecheate cu masculii din lotul de control (fără selecție pentru feromon) și varianta în care a fost efectuată selecția au fost crescuți separat, în conformitate cu standardul pentru multiplicarea *H. cunea*.

În urma cercetărilor s-a stabilit, că rata viabilității a larvelor selectate după intensitatea factorilor de mediu este mai mare decât în varianta martor. Astfel, selecția după factorul trofic la *H. cunea* a constituit 10,0%, după factorul fonic – 9,2%, iar după sensibilitatea față de feromonul sexual – 15,1%. A fost confirmată dependența directă a manifestării reactivității la factorii specifici de nivelul viabilității larvelor de *H. cunea* (Tabelul 3.5).

Tabelul 3.5. Dependența manifestării intensității stimulatoarelor față de viabilitatea *H. cunea* în funcție de gradația dăunătorului

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

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 [181].

Așadar, s-a stabilit existența unei relații dintre nivelul manifestării viabilității insectelor și intensitatea excitanților studiați. În decursul evoluției coadaptarea în sistemul „insectă-planta-hrană” a fost asociată cu formarea celor mai eficiente modalități de a găsi hrana și depăși barierele imunogenetice ale plantelor. Creșterea adaptabilității este însoțită de stabilirea nivelului optim pentru specia dată și adaptabilitatea genetică a populației. Acest lucru este confirmat de intensitatea mirosului feromonului sexual și răspunsul la lumină. Putem confirma, că excitanții sunt incluși în faza de investigare ca componente ale unui act comportamental, în care acestea sunt completate cu reacțiile orientării de căutare, în rezultatul cărora insecta primește informație de la factorii din mediul înconjurător. Toate acestea contribuie la realizarea fazei finale a unui act comportamental. Din acestea rezultă, că cu cât mai mare este manifestarea intensității reacțiilor la insecte, cu atât mai mare este capacitatea lor de adaptare la schimbarea condițiilor de mediu și au mai multe șanse de supaviețuire. Manifestarea intensității reacțiilor poate fi considerată ca o măsură a viabilității populației și poate fi utilizată pentru predicția dinamicii populației.

Utilizarea indicelui de intensitate a factorului trofic în selecția materiei prime pentru crearea populației artificiale de insecte. Succesul tuturor programelor de entomologie tehnică pentru creșterea în masă a insectelor depinde, în primul rând, de alegerea reușită a materialului biologic inițial. În acest sens au fost elaborate principiile și metodele de selectare a materialului biologic inițial pentru crearea culturilor de insecte [126] (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 min.	Viabilitatea larvelor, %	Greutatea medie a pupei, mg	Prolificitate medie a femelelor, buc.	Mortalitatea din cauza bolii, %
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

Au fost colectate insecte de Omida-păroasă-a-dudului din populații naturale având diferiți indicatori în funcție de fazele de gradație a focarului acestui dăunător. Aceasta a demonstrat eficiența înaltă a aplicării metodei rapide de selecție a materialului inițial prin determinarea intensității factorului trofic al larvelor pentru crearea unei culturi viabile. Astfel, la selectarea neprotejată a larvelor a fost relevată diferența semnificativă ($p < 0,001$) în indicii de intensitate a factorului trofic dintre indivizii din două populații. Acestea includ analiza populațiilor donatoare prin caracteristici organoleptice, morfofuncționale și biochimice. Ulterior, materialul biologic este crescut în laborator pentru determinarea corelării dintre indicii culturii de insecte și programul de reproducere a lor. Prin urmare, metoda utilizată devine nepotrivită pentru selectarea materialului biologic și identificarea culturilor insectelor în timpul expedițiilor, datorită timpului limitat. Pentru aceasta, s-a propus în selectarea materialului inițial al insectelor să se țină cont de dependența intensității factorilor specifici ai insectelor și de viabilitatea lor.

Rezultatele obținute în rezultatul investigațiilor de teren au aratat, că cele mai preferate pentru *H. cunea* sunt plantele de dud, arțar, salcie, măr, prun, la majoritatea populațiilor dăunătorului raportul dintre sexe constituie 1:1 (Figura 3.7).

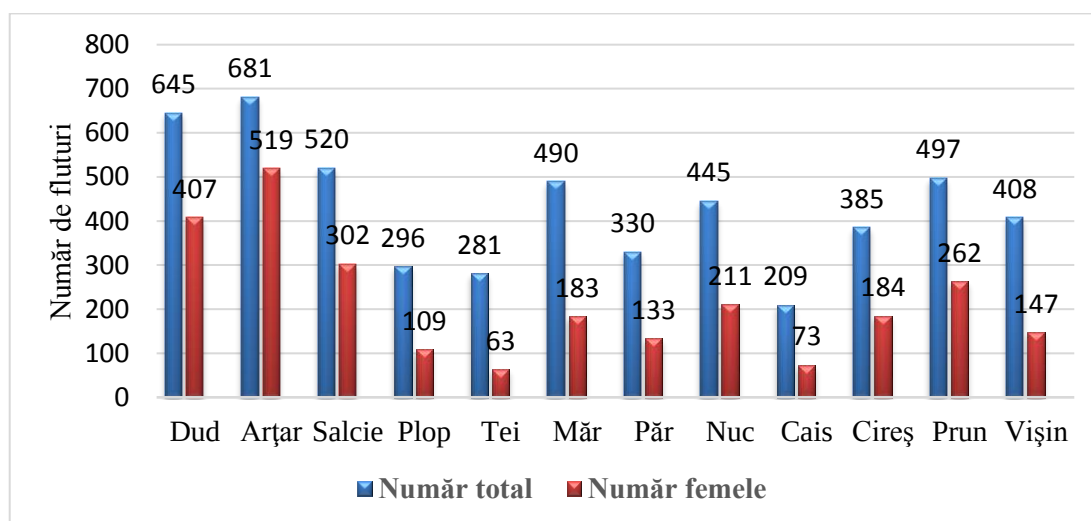


Fig. 3.7. Raportul dintre sexe la *H. cunea*, crescute pe diferite specii de plante pe parcursul sezonului 2007

Totodată, cel mai mare procent de femele a fost înregistrat pe arborii de arțar, dud, salcie, prun și nuc. La alte specii de plante predomină masculii, care au dominat în raport de 2:1 față de femele.

Creșterea ulterioară a materialului biologic a arătat că, indivizii din populația care manifestă o reactivitate înaltă față de factorul trofic, au viabilitatea, masa medie a pupei și fecunditatea femelelor semnificativ mai mare. Atunci, când se selectează larvele este suficient să

se determine intensitatea factorilor specifici la larvele, ce au părăsit oul. Experimentul a dovedit că populația din Rezervația științifică „Codrii” nu corespunde cerințelor pentru cultura de insecte. Adulții au fost obținuți din larvele colectate în condiții naturale, din masivele Gospodăriei silvice din raionul Strășeni și liziera de pădure din Rezervația științifică „Codrii”, crescute în condiții de laborator pe hrană naturală. În experimentele ulterioare au fost utilizați adulții, selectați după următorii indicatori: mărimea și aspectul, prolificitatea și fertilitatea femelelor crescuți în condiții controlate (Tabelul 3.7).

Tabelul 3.7. Variabilitatea lungimii corpului la fluturii de *H.cunea* în funcție de factorul trofic (generația I-a)

Nr.	Planta-gazdă	Lungimea fluturilor (mm)	
		♂	♀
1.	Dud	13,45±0,45	14,55±0,53
2.	Arțar	14,05±0,61	14,25±0,02
3.	Salcie	9,82±0,26	12,18±0,28
4.	Plop	8,78±0,55	11,20±0,94
5.	Tei	10,99±1,31	11,43 ±1,59
6.	Măr	11,90±0,15	13,95±0,83
7.	Păr	8,96±0,67	8,97±0,17
8.	Nuc	9,81±1,52	11,87±1,58
9.	Cais	10,65±0,42	11,85±1,09
10.	Prun	10,85±0,58	12,63±0,98
11.	Cireș	10,20±0,28	11,55±0,55
12.	Vișin	9,80±0,58	10,85±0,82

Boguleanu și colab. [2], Gomy [103] au stabilit, că valorile ponderale și dimensionale ale Omizii-păroase-a-dudului variază mult în funcție de dezvoltarea plantei-gazdă: dimensiunea corpului la femele variază de la 14,2 mm, când larvele sunt hrănite cu dud până la 8,32 mm la cele hrănite cu tei. La masculi dimensiunile variază de la 11,36 mm, în cazul hrănirii cu dud, și până la 7,98 mm la hrănirea cu tei (Tabelul 3.8).

Tabelul 3.8. Indicatorii morfometrici ai adulților de *H. cunea* crescuți pe diferite substraturi nutritive

Substrat nutritiv	Repetiția	Lungimea corpului (mm)		Anvergura aripilor (mm)		Adulți cu anomalii, %	Media
		♀	♂	♀	♂		
Frunze de arțar	R ₁	14,4	12,5	35,5	29,8	8	6,33
	R ₂	14,8	12,8	35,7	29,7	5	
	R ₃	14,5	12,1	33,4	29,5	6	
	Media	14,56	12,13	35,87	29,66		
Agar+celuloză +nutrienții proteici+amestecuri de săruri minerale+apă +vitamine	R ₁	13,9	12,7	33,9	27,2	9	8,33
	R ₂	13,8	12,0	34,0	26,8	7	
	R ₃	13,0	11,5	33,2	28,5	9	
	Media	13,9	12,4	33,7	28,5	-	
	DEM _{0,05} =2,88						

Ca urmare a studiului a fost determinat indicele sexual la femelele de *H. cunea*, stabilind că la cele de pe arțar, salcie, nuc, cireș și prun a fost la acelaș nivel ca și la cele care s-au dezvoltat pe dud (Figura 3.8).

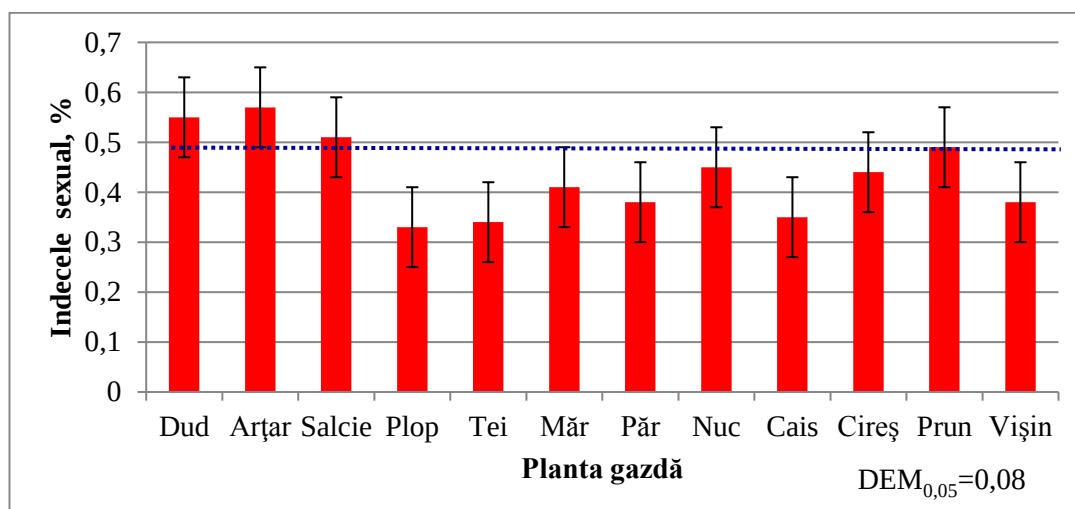


Fig. 3.8. Indicele sexual la pupele de *H. cunea* în funcție de factorul trofic

Indicele sexual al femelelor, care s-au dezvoltat pe alte specii de plante a fost mai mare. Rezultatele reprezentate indică, că la arborii ornamentali și forestieri (dud, arțar, salcie, plop și tei), indicele sexual la fluturi a variat de la 0,36 la tei până la 0,59 la arțar. În cazul pomilor fructiferi, indicele sexual a variat de la 0,38 la cais și până la 0,47 la nuc. La femele, cea mai mare lungime a corpului de $14,55 \pm 0,53$ mm s-a înregistrat la femelele, larvele cărora au fost hrănite cu frunze de dud, iar cea mai mică – de $12,20 \pm 0,94$ mm, la cele crescute din larve hrănite cu frunze de plop (Figura 3.9 (a,b)).

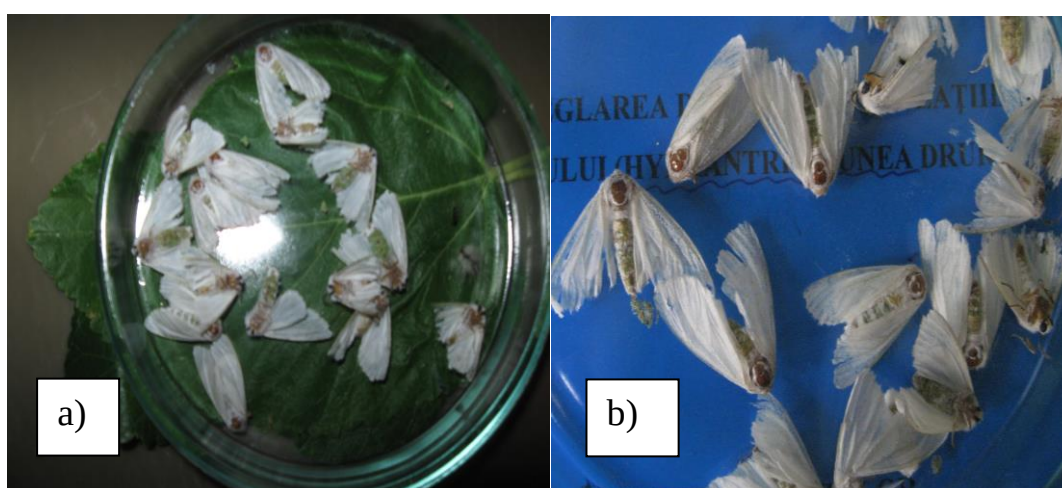


Fig. 3.9. Adulții (♀) în timpul înmulțirii *H. cunea* (a, b), 2014

S-a stabilit, că planta-gazdă este un factor important care guvernează procesul de dezvoltare și factorul de optimizare a creșterii populației dăunătorului. Analizând rezultatele cercetărilor prezentate în tabelul 3.9 s-a constatat, că la creșterea larvelor pe hrană naturală, lungimea corpului femelelor este în medie de 14,56 mm, iar anvergura aripilor 35,87 mm. La masculi lungimea medie a corpului este de 12,13 mm, iar anvergura aripilor 29,66 mm. În varianta creșterii larvelor pe mediu sintetic adulții au mărimi mai mici: femelele au lungimea medie a corpului de 13,9 mm și anvergura aripilor de 33,7 mm, iar masculii 12,4 mm și respectiv 28,5 mm. Procentul de adulți anormali în varianta creșterii pe mediu sintetic a fost de 8,33 %, iar pe hrană naturală de 6,33 %. Selecția adulților a fost efectuată pe baza caracteristicilor morfofiziologice. Au fost selectați adulții cu lungimea de 11-14 mm și anvergura aripilor de 26-33 mm, masculii fiind mai mici decât femelele.

Stabilirea prolificității, modului și duratei de depunere a ponte la femelele colectate în câmp și la cele obținute în condiții de laborator. Temperatura și umiditatea aerului determină în mare măsură viteza de dezvoltare, nutriția, durata de viață, prolificitatea adulților, voracitatea și comportamentul insectelor (Figura 3.10 (a,b)).



Fig. 3.10. Depunerea ponte de către femela *H. cunea*, (a, b), 2013

Observațiile au fost efectuate zilnic. În prima vivieră fluturii și-au petrecut cea mai mare parte a timpului pe dud și au depus ouă pe frunze. În a doua vivieră, fluturii nu au reacționat la plantele cultivate și ouăle au fost depuse pe pereții vivierii, iar în cea de-a treia vivieră, fluturi au preferat plantele de arțar, unde au depus ponte de ouă. Astfel, atât în condiții naturale de dezvoltare, cât și controlate *H. cunea* preferă depunerea pontelor de ouă pe planta-gazdă (Tabelul 3.9).

Tabelul 3.9. Efectul temperaturii și umidității asupra dezvoltării pontelor

Temperatura aerului, °C	Numărul de ouă, buc.	Umiditatea relativă a aerului, %	Eclozarea larvelor		Durata medie a dezvoltării embrionare, zile
			indivizi	%	
20	40	75	15	38,0	12,25
	40	85	18	45,0	9,5
	40	100	25	67,5	9,5
25	40	75	18	35,0	9,6
	40	85	26	70,0	7,5
	40	100	32	80,0	6,5
30	40	75	9	25,0	6,25
	40	85	36	90,0	5,5
	40	100	38	95,0	5,5

Este cunoscut faptul că temperatura influențează semnificativ dezvoltarea embrionară. Atunci, când ouăle sunt ținute la temperatura de 20°C în condiții de laborator, durata dezvoltării embrionare este cuprinsă între 6 și 8 zile, iar la 30°C între 3 și 4 zile. De asemenea, umiditatea mediului determină durata dezvoltării embrionare, deși nu este atât de evidentă. S-a constatat, că condițiile optime pentru dezvoltarea pontelor este umiditatea relativă de la 70 până la 85% și temperatura de 25-30°C, la care se înregistrează durata minimă de dezvoltare embrionară și numărul maxim de larve eclozate (Tabelul 3.10).

Tabelul 3.10. Influența umidității asupra duratei de dezvoltare a stadiului de crisalidă

Temperatura aerului, °C	Numărul de pupe, buc.	Umiditatea relativă a aerului, %	Eclozarea fluturilor		Durata medie a dezvoltării stadiului de crisalidă, zile
			indivizi	%	
20	25	75	9	35,0	17,5
	25	85	8	45,0	17,5
	25	100	8	65,5	17,5
25	25	70	9	35,0	15,0
	25	85	8	65,0	15,0
	25	100	9	85,0	15,0
30	25	75	9	25,0	13,5
	25	85	6	98,0	11,5
	25	100	7	95,0	11,5

Larvele de vârstă a treia sunt hrănite intens și cresc foarte repede. Năpârlirea are loc la 3-4 zile, lungimea corpului ajunge la 9,8-10 mm. La această vârstă, larvele se hrănesc cu parenchimul frunzelor, lăsând doar scheletul. Durata celei de a patra vârste este mult mai îndelungată și constituie 4-5 zile. În această perioadă larvele cresc rapid și sunt foarte vorace. La momentul năpârlirii ating o lungime de 25-32 mm. Datele prezentate în tabelul 3.10 arată că doar din 30-40% pupe au zburat fluturi. Restul pupelor au rămas la stadiul de diapauză facultativă.

Pentru a confirma această ipoteză, a fost testată reactivarea suplimentară a pupelor. În acest scop, acestea au fost deplasate într-o cameră de răcire, în care a fost menținută temperatura de + 5-7°C timp de 10 zile. Ulterior temperatura a fost majorată până la 20°C. În a 16-18-a zi, 30% din fluturi au zburat, restul pupelor fiind moarte. În condiții de laborator a fost posibil să se obțină date privind reactivarea pupelor, indicând faptul că din 60-70% de pupe au zburat fluturi.

Ca urmare a studiului acțiunii prolificității și modului de depunere a ponte de ouă a *H. cunea* au fost efectuate observații zilnice asupra depunerii ponte, locul și modul de depunere a ponte, numărul de ponte depuse. Cercetările efectuate au demonstrat că copulația adulților poate avea loc imediat după emergența din crisalidă (Figura 3.11, 3.12).

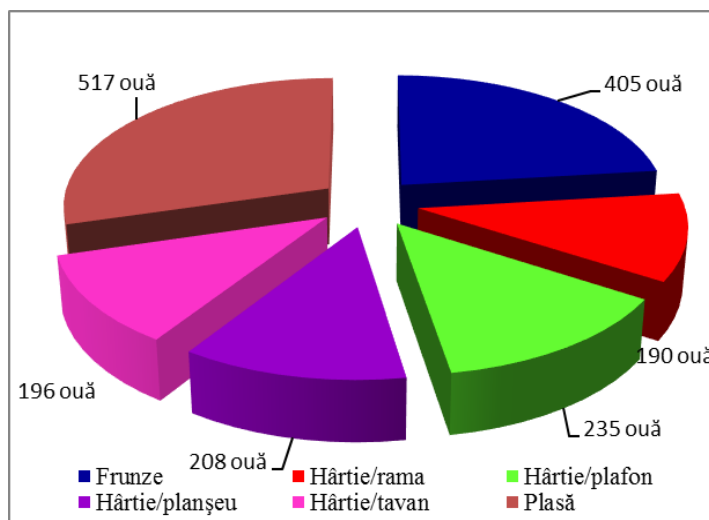


Fig. 3.11. Prolificitatea medie a unei femele colectate din natură și comportamentul de ovipoziție în condiții de laborator

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. 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 cuprinsă 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 pona de ouă pe suprafața inferioară a frunzelor de dimensiuni mici într-un singur strat.

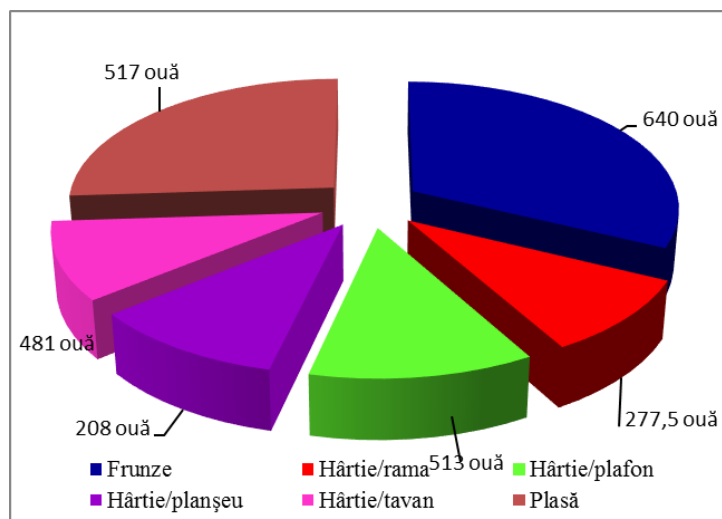


Fig. 3.12. Prolificitatea medie în funcție de ovipoziție la femelele speciei *H. cunea* crescute pe mediu artificial în condiții de laborator

Oul rotund, galben-verzui cu diametrul de 0,5-0,7 mm, pe măsură ce embrionul se dezvoltă, devine la culoare 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.

În comparație cu datele obținute în investigații, datele din literatura de specialitate la fel denotă faptul că numărul de ouă depuse variază în mod considerabil în funcție de mai mulți factori. Jasic et al. (1958) a constatat că fecunditatea femelelor din prima generație corelează direct cu greutatea crisalidelor din care au provenit, calitatea hranei pe care au avut-o la dispoziție larvele, precum și cu temperatura din timpul dezvoltării larvare. În România Boguleanu (1973) a obținut - 620 de ouă, și Iamandei (2005) că prolificitatea femelei de *H. cunea* în laborator are valori medii 630 de ouă pe substrat natural. Cel mai mare număr de ouă 916 a fost obținut la 26°C, în timp ce în condiții de câmp, în Cehia, numărul mediu de ouă depuse variază între 450 și 800. În Ungaria, Nagy și colab., (2003) au demonstrat, că numărul de ouă variază și în funcție de planta cu care s-a hrănit larva: 953 de ouă la hrănirea cu dud și 563 – cu nuc.

Controlul calității materialului biologic. Suportul preferat pentru ovipoziție de către femelele de *H. cunea* colectate din câmp sunt frunzele introduse în acest scop în cuștile de creștere. Femelele de *H. cunea* obținute în generațiile succesive, crescute în condiții de laborator nu au o preferință vizavi de suportul pentru depunerea pontelor (Tabelul 3.11).

Tabelul 3.11. Dependența duratei incubației ouălor de *H. cunea* de valorile temperaturii din camera de incubație

Temperatura din camera de incubație, °C	Durata incubației (zile)	
	minimă - maximă	medie
20±2°C	8-15	12,5
25±2°C	6-12	9,9
30±2°C	4-8	8,7

Conform datelor obținute, durata incubației a avut valori medii cuprinse între 11,25 zile, la varianta 20±2°C, și 6,25 zile în varianta menținerii în camera de incubație unei temperaturi de 30±2°C. Imediat după ecloziune, larvele neonate erau foarte active, migrând în vasele de incubație, fapt care a indicat, că acesta este momentul propice pentru transferul lor în vasele de creștere.

Stabilirea duratei incubației și viabilității ouălor a *H. cunea* în condiții de laborator. În cercetările efectuate în cadrul IGFPP au fost colectate ponte și depuse pe mediul de creștere (Tabelul 3.12).

Tabelul 3.12. Viabilitatea pontelor depuse de femelele *cunea* obținute în condiții de laborator

Repetarea	Număr ouă/pontă	Intervalul de ecloziune (zile)	Rata de ecloziune, %
1	427	6-7	81,12 ± 0,19
2	520	5-7	98,23 ± 0,33
3	634	6-7	85,16 ± 0,36
4	529	5-7	76,10 ± 0,20
5	508	5-7	89,00 ± 0,30
6	576	6-7	82,57 ± 0,67
7	624	3-6	82,45 ± 0,57
8	648	5-7	82,44 ± 0,34
9	490	4-6	73,57 ± 0,37
10	678	5-7	79,34 ± 0,51
Media	563,4	-	82,99 ± 6,90

Analizând rezultatele din tabel s-a constatat, că procentul de ecloziune al ouălor în mediu în condiții de laborator a fost de 82,99 ± 6,90 la o durată a incubației de la 4 până la 7 zile.

Stabilirea duratei incubației și fertilității ouălor de *H. cunea* colectate în condiții naturale. Cercetările efectuate în condițiile IGFPP au demonstrat, că imediat după ecloziune larva neonată se hrănea parțial cu corionul oului. Deși ecloziunea unei ponte poate continua timp de 3 zile, cea mai mare parte a larvelor neonate apar în câteva ore. Procentul de ecloziune al

ouălor a fost de $81,54 \pm 9,32$ iar durata incubăției de la 4 până la 8 zile. Datele din literatură confirmă rezultatele obținute (Tabelul 3.13).

Tabelul 3.13 Viabilitatea pontelor depuse de femelele de *H. cunea* colectate în condiții de câmp

Repetarea	Număr ouă/pontă	Intervalul de ecloziune (ziua)	Rata de ecloziune, %
1	634	4-6	$83,80 \pm 1,15$
2	278	5-7	$70,99 \pm 1,29$
3	357	6-7	$85,44 \pm 0,74$
4	786	7-8	$68,81 \pm 0,91$
5	418	5-6	$74,81 \pm 1,11$
6	512	7-8	$94,79 \pm 0,59$
7	415	4-7	$75,41 \pm 0,51$
8	934	7-8	$87,50 \pm 0,46$
9	433	4-6	$78,66 \pm 0,43$
10	351	6-8	$95,20 \pm 0,5$
Media			$81,54 \pm 9,32$

Ehrenhardt et al. (1953) au înregistrat în condiții de laborator, la temperatura de 24-25°C, o durată a stadiului de ou la specia *H. cunea* de 8 zile. În laboratorul de Control Biologic din Zemun, Slovenia, la temperatură de 27°C și umiditatea de 70 % durata stadiului de ou a fost de 8-9 zile [213].

Stabilirea spectrului trofic (culturi agricole, silvice și decorative) al *H.cunea*. Această insectă atacă mai mult de 630 specii de arbori, arbuști și plante erbacee. În America sunt înregistrate 120 specii de plante care sunt afectate de larvele *H.cunea*, în Europa Centrală – 234 specii, inclusiv mai mult de 30 specii de plante fructifere, 100 specii de arbori și arbuști și 100 specii de plante erbacee [207, p. 254-265], [223], [2, p. 167-175].

În condițiile Republicii Moldova au fost semnalate 124 specii de plante din 43 familii cu care se hrănesc larvele de *H. cunea*, iar pentru creșterea larvelor *H.cunea* în condiții de laborator – 26 specii de plante, date ce confirmă spectrul trofic menționat pentru țările din Europa și se încadrează în lista celor peste 630 specii de plante cunoscute ca substrat trofic pentru această specie (Tabelul A 3.1).

În Figurile 3.13-3.25 sunt prezentate unele aspecte ale daunelor aduse spațiilor verzi și grădinilor de către larvele de *H. cunea*. Se știe, că factorul trofic are un efect considerabil asupra dinamicii proceselor fiziologice ale insectelor și determină, de asemenea calitatea lor. S-a stabilit, că vitalitatea și productivitatea.

Viermelui-de-mătase (*Bombyx mori*), sunt în mare măsură dependente de calitatea hranei și capacitatea larvelor de a o distinge. A fost demonstrat rolul hranei ca factor de optimizare a creșterii populației de insecte. În condiții de laborator durată dezvoltării insectelor la buburuza cu șapte puncte (*Coccinella septempunctata*) depinde, în mare măsură, de hrana propusă. În cazul, în care insectele sunt hrănite cu afidele aceleiași specii durată medie de viață a ouălor la insectă a durat de două ori mai mult decât în cazul, în care se hrăneau cu ambele specii de afide. Nutriția *H. cunea* în I-a și a III-a vârstă cu frunze de varietățile sălbatice de dud, iar în vârsta IV-V-a – cu frunze de dud cultivate, a contribuit la uniformitatea dezvoltării larvelor [39].

Cercetări privind metoda de creștere a adulților de *H. cunea* în condiții controlate. În prezentul tabel sunt prezentate rezultatele stabilirii cerințelor nutriționale ale adulților de *H. cunea*. Cerințele nutriționale ale adulților la lepidoptere sunt mai modeste față de cele ale larvelor și diferă de la specie la specie.

Astfel, hrana speciilor de *Heliothis* constă într-un amestec de zahăr, melasă, miere, suc de piersici, drojdie și apă; la speciile de *Agrotis* – din bere, sucroză, acid ascorbic, cisternă și miere, iar la *Cydia pomonella* – din miere, acid ascorbic, tiamină, riboflavină, niacină și colină în apă (Tabelul 3.14).

Tabelul 3.14. Influența hranei asupra longevității adulților de *H. cunea* crescuți în condiții controlate

Varianta (soluții nutritive)	Longevitatea, zile	
	minimă-maximă	media
Apă filtrată	2-5	4,5
5% zaharoză	2-9	6,6
10% zaharoză	3-12	8,9
15% zaharoză	3-15	11,5
5% miere în apă	3-8	7,7
10% miere în apă	4-13	11,3
15% miere în apă	5-15	11,9
Mediu standard (faină de grâu, mălai, masă vegetală uscată, lapte praf, drojdii uscate, glicerol și miere)	2-14	10,9
Miere (5%), zahăr(5%), Acid ascorbic (1%)	5-14	9,9

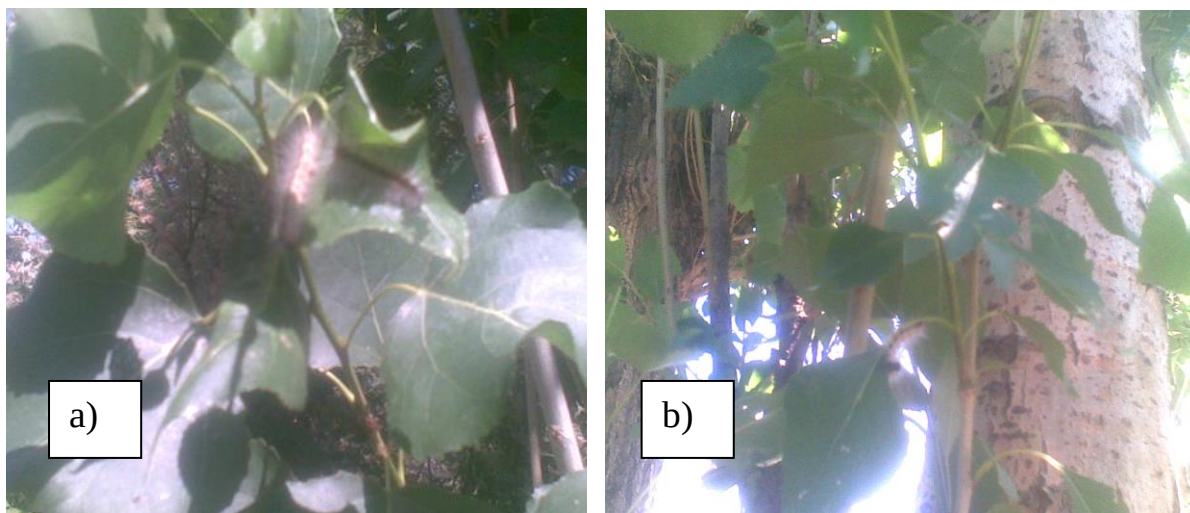


Fig. 3.13. Aspect privind atacul larvelor de *H. cunea* la plop (a, b) 2007-2008, Sîngaci A

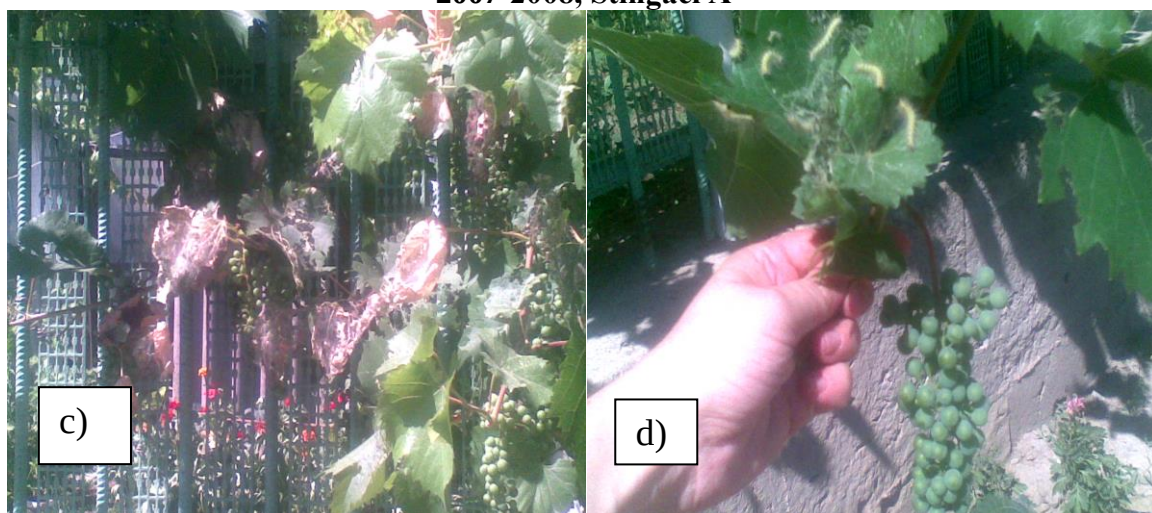


Fig. 3.14. Aspect privind atacul larvelor de *H. cunea* la viță-de-vie (c, d) 2012, Sîngaci A

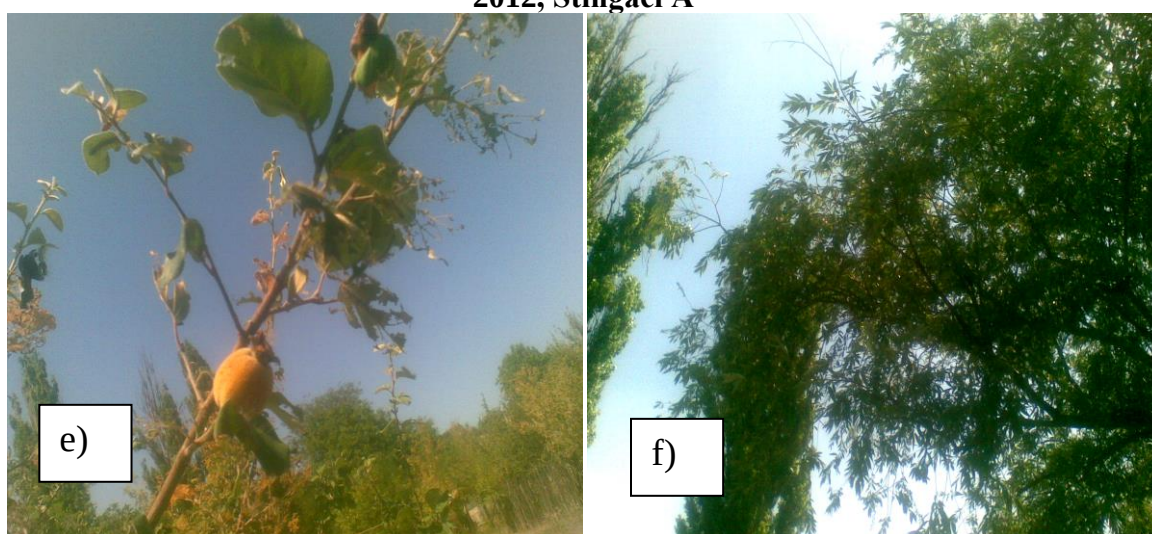
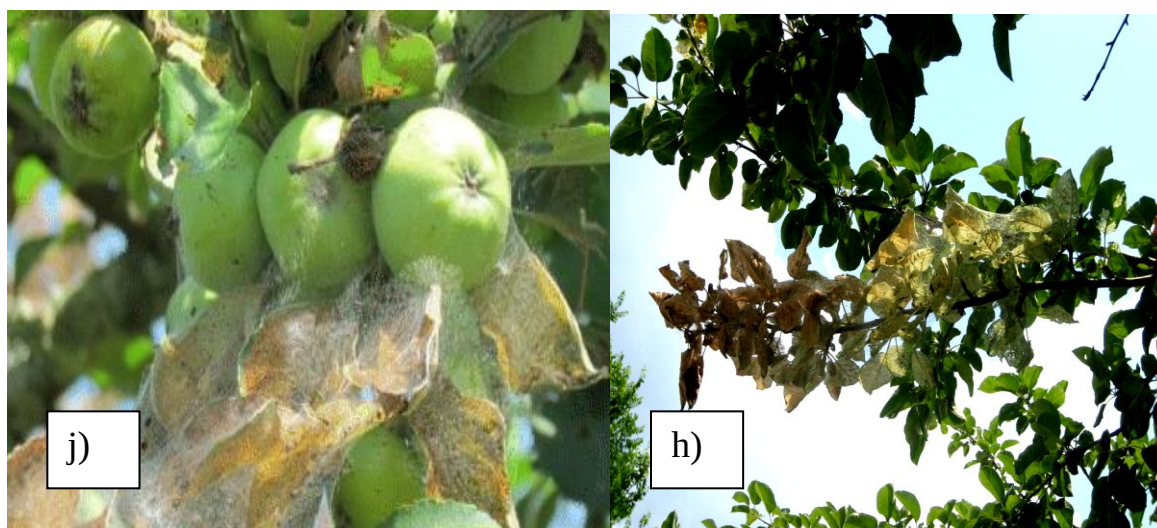
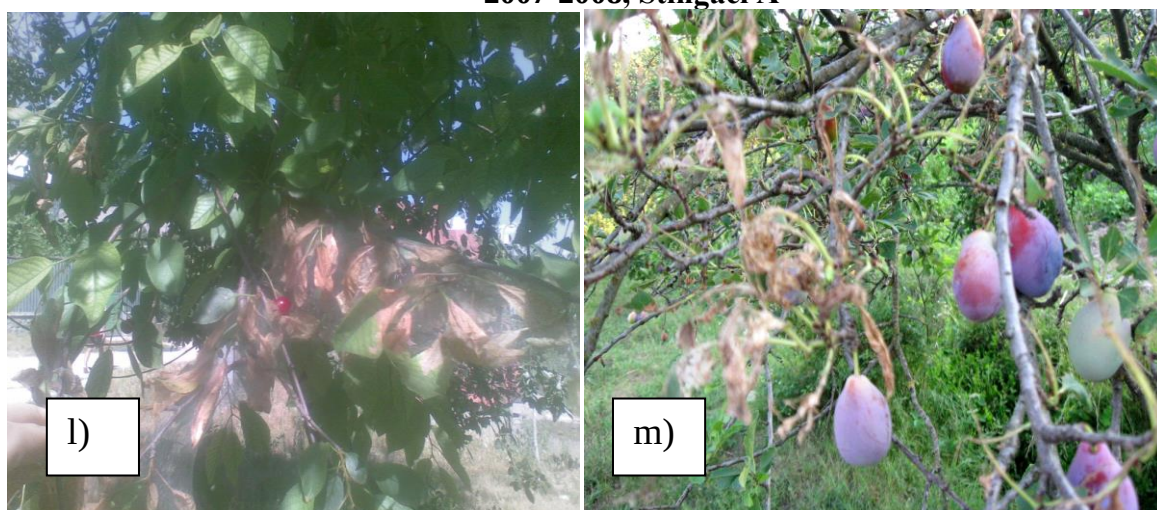


Fig. 3.15. Particularitățile atacului larvelor de *H. cunea* la gutui (e) și salcie (f), 2012, Sîngaci A



**Fig. 3.16. Aspect privind atacul larvelor de *H. cunea* la măr (j, h)
2007-2008, Sîngaci A**



**Fig. 3.17. Aspect privind atacul larvelor de *H. cunea* la vișin (l) și prun (m)
2007-2008, Sîngaci A**



**Fig. 3.18. Scheletarea aparatului foliar la atacul larvelor de *H. cunea* la arțar (n, o),
2012, Sîngaci A**

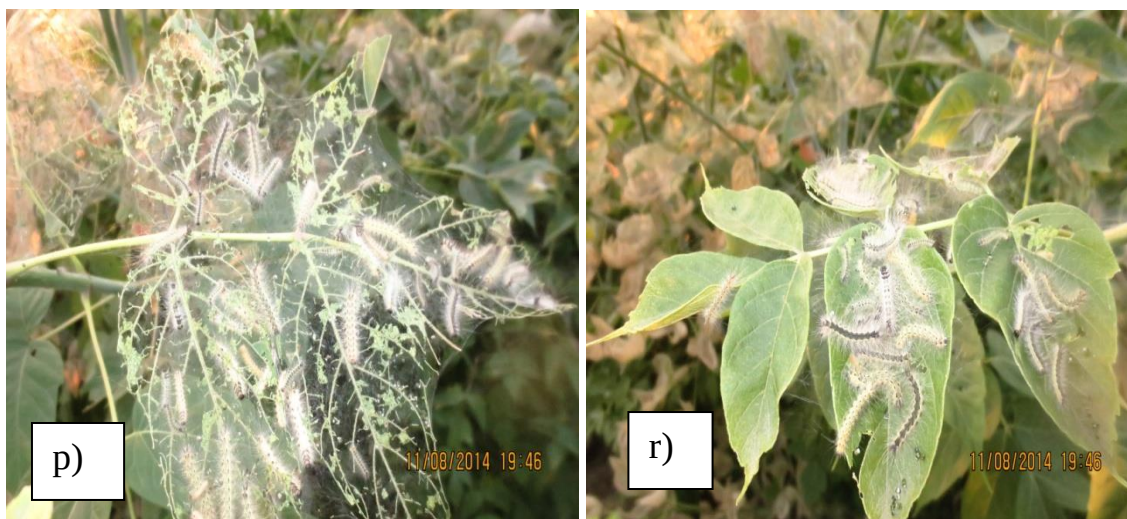


Fig. 3.19. Particularitățile scheletării cauzate de larvele *H. cunea* la arțar (p, r), 2014, Sîngaci A



Fig. 3.20. Atacul larvelor de *H. cunea* la lemn cânesc (*Ligustrum vulgare*) (s, t), 2014, Sîngaci A

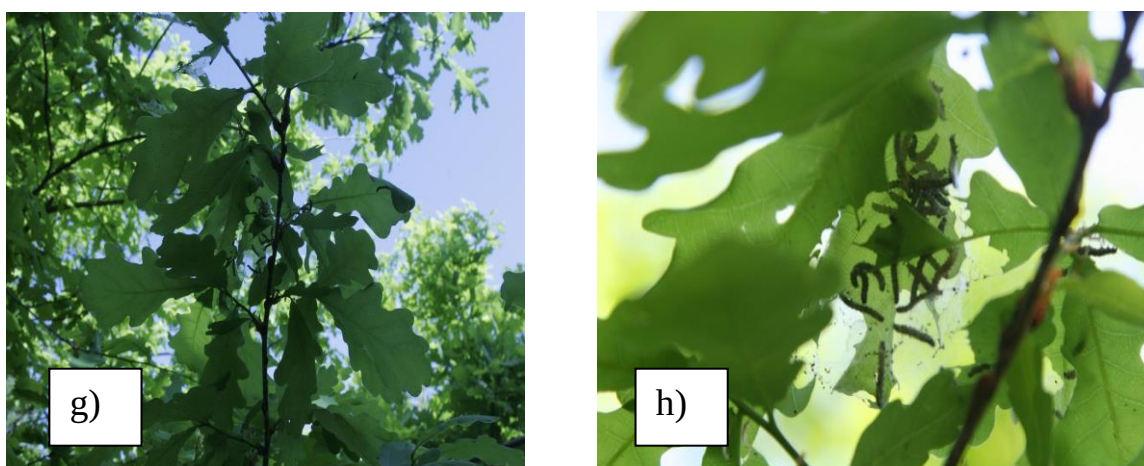


Fig. 3.21. Atacul larvelor de *H. cunea* la stejar brumariu (*Quercus pedunculiflora*) (g, h), 2014, Sîngaci A



Fig. 3.22. Atacul larvelor de *H.cunea* la platan (*Platanus* sp.) (i, j), 2012, Stîngaci A



Fig. 3.23. Atacul larvelor de *H. cunea* la nuc (k) și la tei (l), 2014, Stîngaci A

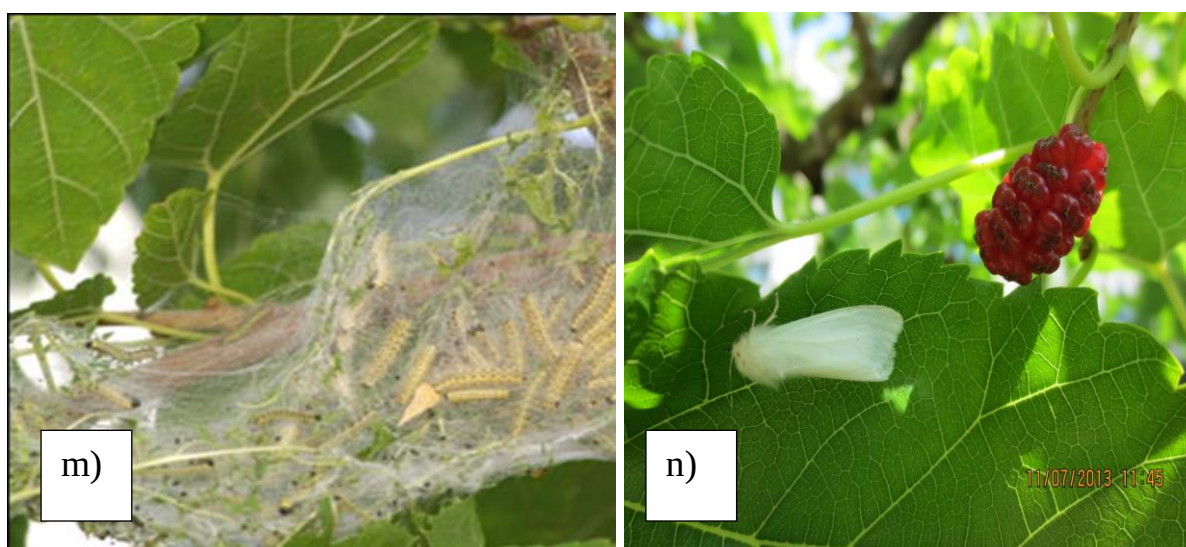


Fig. 3.24. Atacul larvelor de *H. cunea* la dud (m, n), 2013, Stîngaci

Numărul optim de adulți într-o boxă utilizată pentru creșterile în masă a speciei *H. cunea* este de 60, maximum 100. În cazul, în care se depășește limita admisă, atunci aglomerarea indivizilor și numărul manipulărilor sunt prea mari, iar sub nivelul de 60 de indivizi, nu are lor completarea și explorarea efectivă a spațiului (Figura. 3.25, 3.26 a, b).

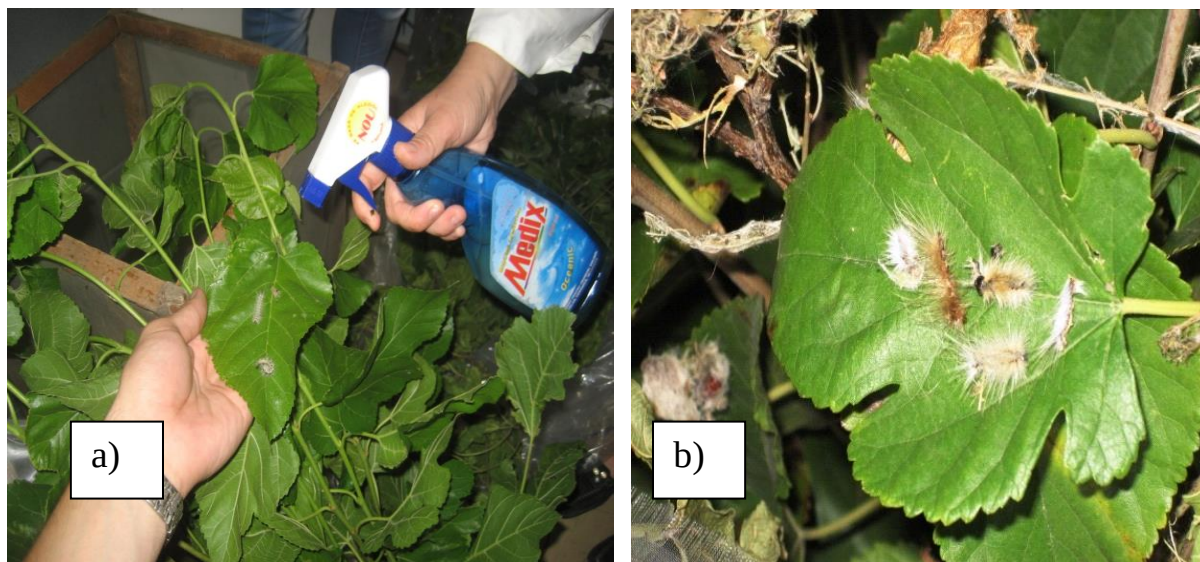


Fig. 3.25. Aplicarea biopreparatului baculoviral contra larvelor *H. cunea* (a) aflate pe frunze de dud (b)



Fig. 3.26. Aspectul vivierei (a,b) pentru înmulțirea în masă a speciei *H. cunea*

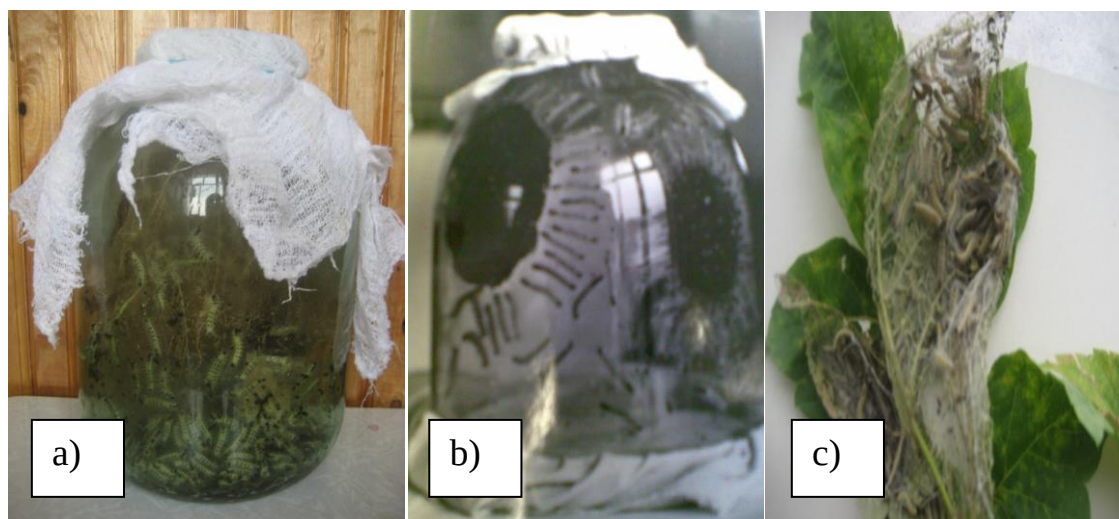


Fig. 3.27. Creșterea în condiții dirijate (a, b, c) a larvelor de *H. cunea* ca sursă de obținere a biopreparatului baculoviral, 2012

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 probleme nu sunt pe deplin elucidate.

Optimizarea structurii spațiale a larvelor de *H. cunea* după densitatea distribuției indivizilor. Observațiile efectuate asupra *H. cunea* au arătat că în ultima vârstă (a cincea la masculi și a șasea – la femele) larvele au o greutate maximă, „luptă pentru spațiu” și escaladează. În acest caz, o parte din indivizi se împușcă în partea de jos a vasului – „strat inferior”, iar alții pe capace (pe tifon) – „nivel superior”. S-a stabilit, că acest lucru se datorează activității motorice a larvelor. S-a presupus, că generația indivizilor *H. cunea*, împușcate pe capace (activitatea motorică mare la larve), va avea un indice de viabilitate mai mare, decât descendenții împușcați pe partea de jos a vasului (activitatea motorică mică la larve).

Pentru a afirma cele menționate mai sus în decursul a șase generații au fost selectate femele și masculi de *H. cunea* împușcate pe nivelul „superior” și „inferior”. Împerecherea indivizilor a fost efectuată în cadrul experiențelor, iar în a treia și a șasea generație au fost determinați indicii biologici ai urmașilor. În baza cercetărilor efectuate au fost stabilite

particularitățile influenței selecției indivizilor de *H. cunea*, care preferă împuparea la diferite niveluri spațiale, asupra indicilor biologici ai urmașilor (Tabelul 3.15).

Tabelul 3.15. Indicii biologici ai *H. cunea* în funcție de preferințele împupării

Selecția generațiilor	Locul împupării	Greutatea medie a pupelor, mg	
		femele	masculi
După trei generații	Sus	1135±11 *	1135±11 *
	Jos	799±9 *	799±9 *
După șase generații	Sus	1345±10 *	1345±10 *
	Jos	901±10	901±10

Notă: * Diferențele au fost semnificative la $<0,05$

Datele obținute denotă că la descendenții indivizilor, ce s-au împupat în partea superioară a vasului, viabilitatea omizilor și greutatea pupelor (atât la femele cât și la masculi) este semnificativă ($p < 0,05$) și sunt mai mari față de cele ale descendenților indivizilor, împupați pe partea de jos a vasului, constituind 17,7% după 3 generații și 28,7% după 6 generații.

Aceast fapt confirmă ipoteza propusă, privind dependența directă dintre activitatea larvelor și viabilitatea lor. Astfel, optimizarea distribuției spațiale prin selecționarea insectelor împupate în nivelurile superioare ale vaselor (cu activitate motorică mare), permite selectarea unor indivizi mai viabili și productivi ca material de reproducere mai calitativ (Tabelul 3.16).

Tabelul 3.16. Timpul necesar pentru obținerea a 1000 de adulți de *H. cunea* în cele două variante, în condiții de laborator

Activitatea	Nr. ore	
	larve crescute individual	larve crescute în grup
Prepararea mediului	1	1
Supravegherea ecloziunii larvelor	0,5	0,5
Instalarea variantelor	7,5	0,5
Transferul larvelor în alte vase	0	25
Supravegherea apariției crisalidelor	2,5	2,5
Transferul crisalidelor	0	3,5
Spălat vase creștere	4	5
Supraveghere apariție adulți	2,5	2,5
Instalare valierilor pentru adulți	5	5
Transfer adulți în valierele de creștere	3,5	3,5
Total	26	48

Pentru producerea indivizilor este necesar o perioadă de timp anumită. Analizând datele prezentate în tabelul de sus s-a constatat, că în varianta creșterii individuale au fost necesare 26 ore/om, iar la creșterea în grup – 48 de ore/om.

Este cunoscut faptul, că pentru creșterea larvelor în masa de *Lymantria dispar* pe ghindă, densitatea optimă admisă este de 20 de larve într-un vas de 0,5 litri. În scopul creșterii indivizilor până la ultima vârstă se recomandă să se includă într-un borcan de 0,5 litri femele (vârstă 6-a) câte 10 larve. A fost studiată influența densității larvelor (10 și 20 de larve într-un vas de 0,5 litri) asupra dezvoltării ulterioare a populației de diferită densitate (respectiv 10 și 20 de larve) (Tabelul 3.17).

Tabelul 3.17. Dependența viabilității descendenților larvelor de *H. cunea* de densitatea lor în generația parentală

Densitatea de întreținere, buc. / 0,5 l		Viabilitatea, %	
Descendenți parentali	Descendenți materni	control fără selecție	descendenți materni după selecție
10	-	86,3±1,8	-
	10	-	85,6±1,2
	20	-	80,5±1,9
20	-	80,6±1,4	-
	10	-	94,9±1,1
	20	-	91,1±0,9

A fost demonstrat, că distribuția spațială a populației contribuie la formarea genotipurilor adaptate la o densitate mai mare. Rezultatele privind dependența viabilității descendenților larvelor de *H. cunea* în a 3-a și a 6-a generație în funcție de densitatea în generația parentală. Din datele expuse în tabel reiese, că la întreținerea a câte 10 larve de generații parentale într-un borcan de 0,5 litri viabilitatea materialului de reproducere a fost mai mare cu 5,7%, față de varianta ce prevedea 20 de larve în 0,5 l. Însă, densitatea mai mare a generației parentale (20 de larve/borcan de 0,5 l) contribuie la sporirea viabilității generației următoare în special după 6 generații (4 %). Astfel, se poate de afirmat că la specia *H. cunea*, fiind sensibilă la densitatea de întreținere a indivizilor, este posibilă selectarea genotipurilor adaptate la indici mai mari ai densității. Pentru creșterea *H. cunea*, se recomandă cultură de insecte pentru mai multe generații, la o densitate a câte 20 de indivizi per 0,5 litri.

3.5. Elaborarea procedurilor biotehnologice de obținere a biomasei virale și constituirea preparatelor biologice de combatere a *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 (Figura 3.28).

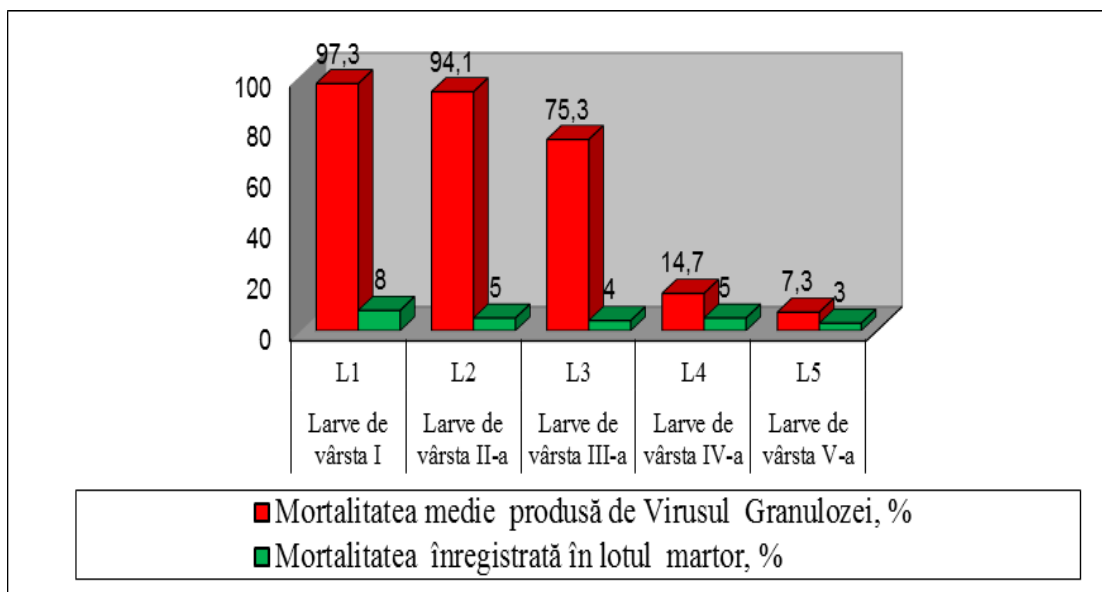


Fig. 3.28. Susceptibilitatea larvelor de *H. cunea* de diferite vârste la infecția cu virusul granulozei în lotul experimental și martor

Rezultatele prezentate în Figura 3.28 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). La vârsta a cincea mortalitatea este foarte redusă (9,3%), apropiată de valoarea mortalității înregistrate în cazul larvelor din variant 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.

Elaborarea metodei de colectare a larvelor. S-a colectat exclusiv larvele cu simptome specifice infecției virale. Caracteristic pentru larvele de *H. cunea* infectate cu baculovirusuri este că în prima fază își pierd coordonarea normală a mișcării, devenind foarte agitate. Consumă mai puțină hrană, își pierd sensibilitatea față de diverși excitanți mecanici. Se deplasează către părțile superioare ale vaselor sau boxelor de creștere. Se fixează de pereți, capacul vasului sau pe ramuri rămânând atârinate de substrat, agățate cu picioarele abdominale false. În ultimele stadii ale infecției, tegumentul larvelor infectate se poate rupe foarte ușor. Larvele moarte ca rezultat al

infecției, lăsate în vasele de creștere, boxe sau alte recipiente la temperatura camerei au prezentat un risc sporit de apariție a suprainfecției. Înlăturarea cu ajutorul pensei a larvelor moarte în rezultatul infecției cu baculovirusuri trebuie efectuată cu mare atenție, fiind o metodă de colectare utilă în cazul cercetărilor legate de izolarea agentului patogen, de evidențiere a procesului infecțios etc., în cazul când nu se lucrează cu o cantitate mare de material biologic. Pentru colectarea în procesul de obținere a preparatului viral s-a folosit dispozitivul cu vid.

Păstrarea larvelor virozate. Investigațiile multianuale privind păstrarea preparatelor baculovirale au permis de a evita un șir de variante. Larvele, prezentând simptomele infecției cu baculovirusuri, s-au păstrat în pungi de plastic a câte 0,5 kg, în congelator la temperaturi de -10 – -25°C, până la terminarea procesului de colectare care s-a realizat pe etape (Tabelul 3.18).

Tabelul 3.18. Durata de păstrare a larvelor de *H. cunea* virusate în funcție de metoda utilizată la păstrare

Modul de păstrare	Temperatura	Durata de păstrare
Pungi de plastic, în frigider	+ 4°C	Maximum 24 ore
Pungi de plastic, în congelator	- 10°C	O săptămână
Pungi de plastic, în congelator	-15°C	Două săptămâni
Pungi de plastic, în congelator	- 25°C	Un an
Pungi vidate, în frigider	+ 4°C	O săptămână
Pungi vidate, în congelator	- 10°C	Un an
Pungi vidate, în congelator	-15°C	Doi ani
Pungi vidate, în congelator	-25°C	4 ani >

Rezultatele prezentate în tabelul 3.22 denotă, că modul de păstrare în pungi vidate în congelator la temperaturi de (-15 – -25°C) asigură condițiile optimele, ceea ce constituie păstrarea de la o săptămână în frigider până la patru ani și mai mult în congelator.

3.6. Particularitățile identificării VPN și VG la *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 cea mai veridică despre structura lor poate fi obținută la aplicarea metodelor microscopiei optice și electronice. Luând în considerare importanța acestor cercetări în diverse domenii de investigație și ținând cont de diversitatea baculovirusurilor care afectează *H. cunea*, au fost

aplicate un șir de metode, în baza cărora s-au efectuat lucrări de pregătire a materialului biologic, a grilelor, soluțiilor și peliculelor.

În procesul de identificare a baculovirusurilor absolut necesară este purificarea lor. Procesul de purificare este determinat de proprietățile hidrodinamice și fizico-chimice ale incluziunilor. La fazele inițiale purificarea VPN și VG nu se deosebește esențial. Larvele moarte se macerează cu ajutorul omogenizatorului sau se fărâmițează în piuliță. Masa biologică amestecată cu bidistilat steril se filtrează prin plasa de capron.

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 metodologic obținut s-a spalat de 3 ori cu apă. Suspensia obținută este supusă centrifugării în gradientul de zaharoză în concentrațiile 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 se obținut fracții practic pure de SPVC. Pentru purificarea VG au fost verificate mai multe metode, care prevăd aplicarea procedeele de centrifugare diferențială, diverse concentrații a gradientului de zaharoză precum și alternarea lor. Rezultate valoroase au fost obținute la centrifugarea timp de 45 min în gradientul densității zaharozei la 13 200 g. Stratul de granule după fracționare s-au spalat pentru eliberarea de zaharoză.

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. Pentru fixarea materialului biologic s-a realizat soluția de 2% de aldehidă glutarică pregătită pe soluția de tampon cacodilat. Spălarea probelor s-a efectuat în soluție tampon cu conținutul următor: 50% tampon cacodilat, 50% apă bidistilată și 5 g zaharoză. Postfixarea probelor s-a efectuat în soluție de 4% de OsO₄.

Pentru cercetarea particularităților morfologice și biochimice ale virionilor încapsulați în cadrul SVC sau SPVC s-au aplicat 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 (Figurile 3.29-3.34).

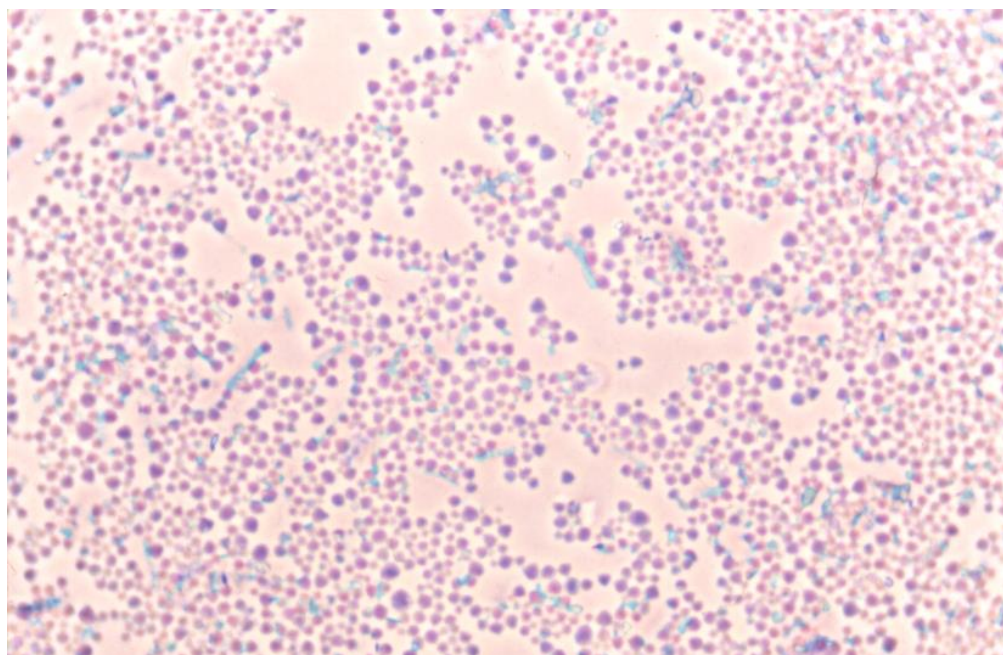


Fig. 3.29. Aspectul virusului poliedrozei nucleare la *H. cunea* în frotiuri colorate cu fuxina și cercetate la microscopul optic (1800^x)

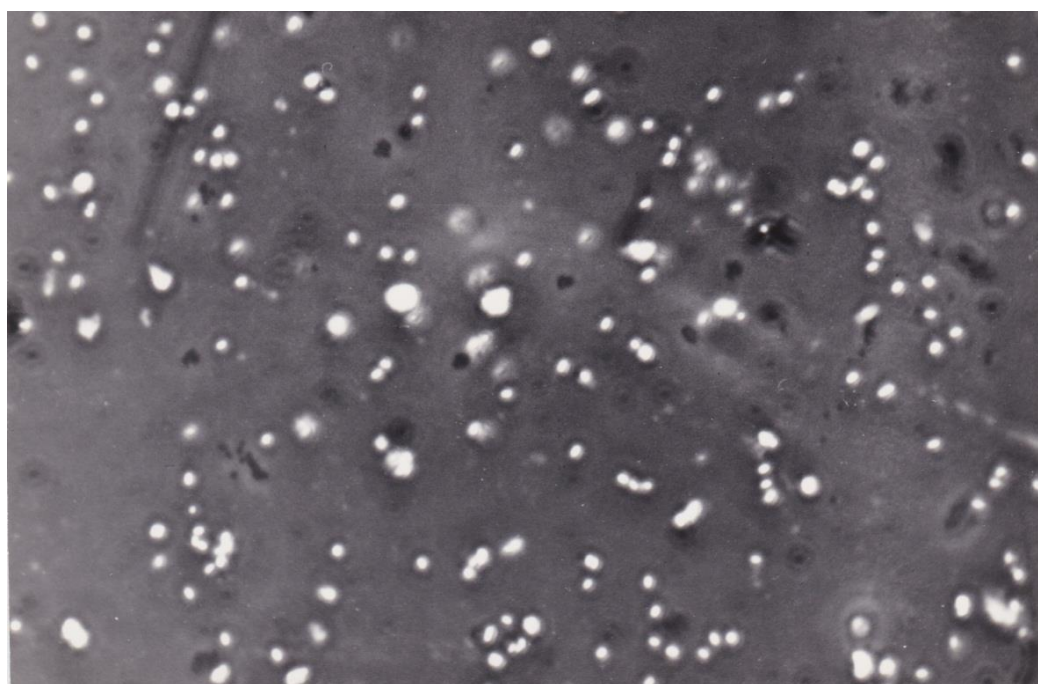


Fig. 3.30. Particularitățile virusului granulozei la *H. cunea* la microscopul cu contrast de fază (2000^x)

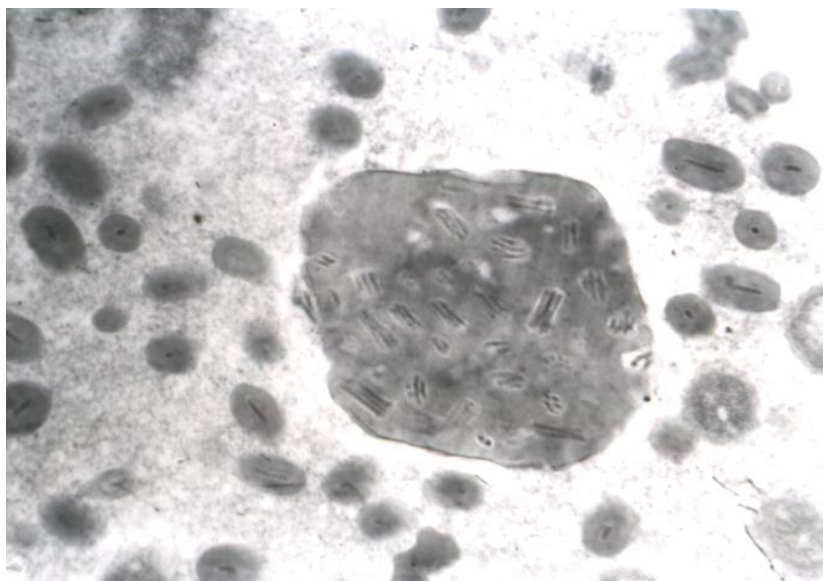


Fig. 3.31. Ultrastructura larvelor de *H. cunea* infectate cu virusul poliedrozei nucleare și virusul granulozei în infecția mixtă la această insectă

Materialul fixat în așa mod s-a deshidratat în serii de acetonă (20%-100%), iar apoi s-a turnat 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-Jung (Austria), au fost contrastate cu soluție acvatică de 2% de uranil-acetat timp de 30 min, iar apoi contrastate cu citrat de plumb după Reynolds.

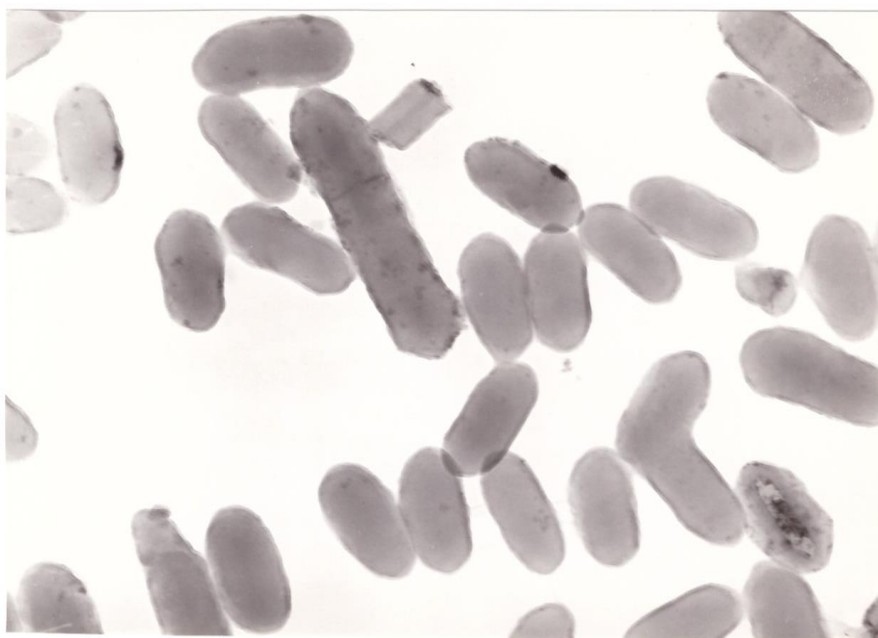


Fig. 3.32. Particularitățile morfologice ale granulelor la *H. cunea* cercetate la contrastarea pozitivă cu uranil acetat (21500^x)

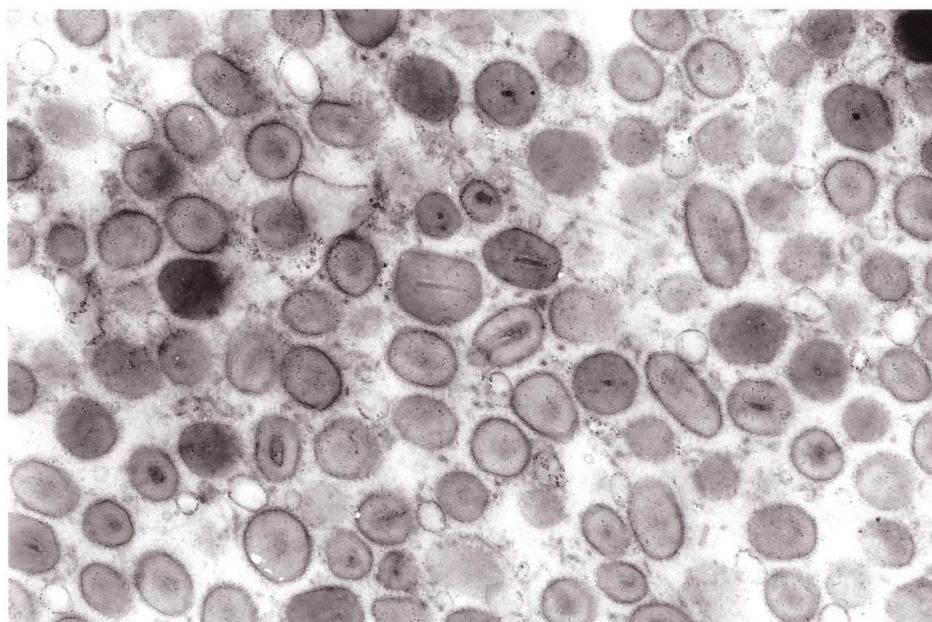


Fig. 3.33. Particularitățile morfologice ale granulelor la *H. cunea* cercetate în secțiunile ultrafine la microscopul electronic cu transmisie (20000^x)

Analiza morfometrică a incluziunilor baculovirusurilor *H. cunea*, demonstrează că poliedrele VPN caracteristice acestei insecte au dimensiuni medii ($11,2-13,1 \times 0,7-0,8$ mcm), ceea ce corespunde cu rezultatele înregistrate în cercetările altor savanți [10].

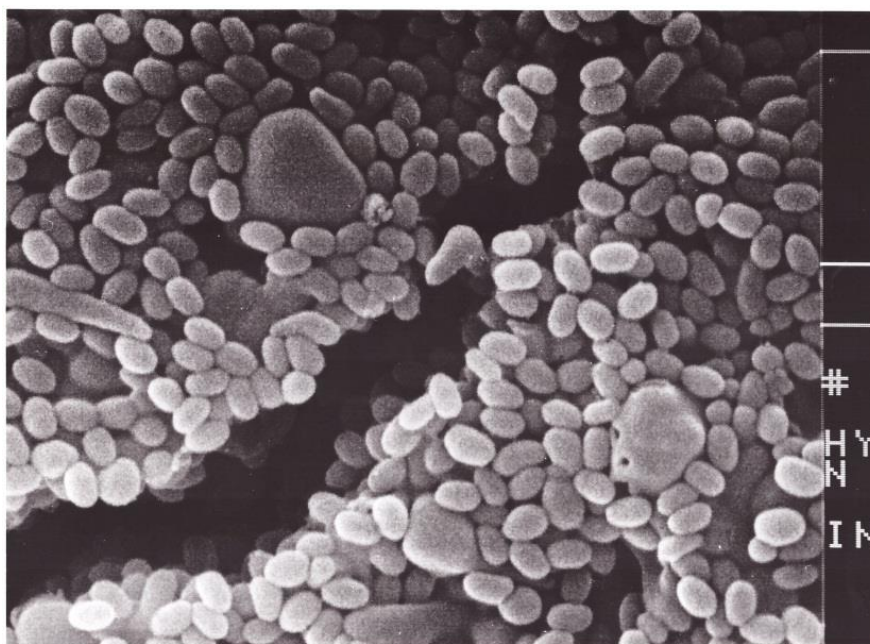


Fig. 3.34. Aspectul morfologic al infecției baculovirale mixte (Granule și Poliedre) la *H. cunea* cercetate la microscopul electronic cu baleaj

Dimensiunile nucleocapsizilor din componența suprapoliviocapsizilor extrași din larvele moarte de *H. cunea* se caracterizează prin valori medii ($215-222 \times 35-38$ nm) și coincid cu datele altor investigații 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 este înglobat câte un nucleocapsid, dimensiunile cărora constituie $270-275 \times 25-27$ nm.

3.7. Concluzii la capitolul 3

1. Au fost izolate și identificate 3 sușe de baculovirusuri la *H. cunea* provenite din trei surse naturale pe teritoriul României și Republicii Moldova.

2. Au fost identificate 124 specii de plante din 43 de familii cu care se hrănesc larvele de *H. cunea* și acceptate în laborator ca gazdă 26 specii de plante pentru creșterea larvelor *H. cunea* în Republica Moldova, ceea ce confirmă spectrul trofic menționat pentru țările din Europa și care se încadrează în lista celor peste 630 specii de plante cunoscute ca substrat trofic pentru această specie.

3. Au fost optimizate procedeele tehnologice de creștere a larvelor pe medii nutritive și optimizate formulările existente prin adăugarea unor substanțe, ceea ce asigură îmbunătățirea parametrilor biologici (reducerea duratei dezvoltării larvare, reducerea mortalității în stadiul larvar, creșterea prolificității femelelor).

4. S-a demonstrat dependența calității materialului biologic de valorile temperaturii, durata zilei, fotoperioadă și calitatea hranei în stadiul larvar.

5. A fost stabilită dependența greutatei crisalidelor asupra viabilității lor, frecvenței cazurilor de teratogeneză, prolificității femelelor obținute, ceea ce a permis recomandarea eliminării materialului biologic de calitate inferioară (subponderal, cu deformări morfologice).

6. Comparând cerințele trofice ale adulților de *H. cunea* cu cele ale altor specii de lepidoptere s-a constatat că aceștia nu sunt pretențioși: o soluție de zahăr sau de miere în concentrație de 10-15% este suficientă pentru menținerea viabilității și fertilității la parametri normali.

7. S-a determinat că durata de păstrare în pungi vidate în congelator la temperatura -15°C – -20°C a larvelor infectate cu baculovirus asigură condiții optime de păstrare până la 6 ani.

8. Au fost determinate dimensiunile nucleocapsizilor din componența suprapoliviriocapsizilor, extrași din larvele moarte de *H. cunea*, valori medii ($215-222 \times 35-38$ nm) și coincid cu datele altor investigații științifice. Supraviriocapsizii (granulele) la *H. cunea* reprezintă incluziuni oval-alungite cu dimensiuni de $0,35-0,5 \times 0,25-0,3$ mcm, în capsida cărora este înglobat câte un nucleocapsid, dimensiunile cărora s-au încadrat $270-275 \times 25-27$ nm.

4. ESTIMAREA EFICACITĂȚII PREPARATULUI VIRAL VIRIN-ABB-3 ÎN COMBATEREA 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 supravirio capsidă.

Purificarea incluziunilor virale din materialul biologic obținut s-a efectuat în două faze. Pentru obținerea pulberii de granule în stare pură filtratul a fost supus unei centrifugări la 6000 rotații/min timp de 10 minute (Figura 4.1). Sedimentul a fost reluat într-un amestec de alcool și eter etilic în volume egale și supus unei noi centrifugări timp de 10 minute la 6000 rotații/min. Sedimentul rezultat a fost reluat în alcool și recentrifugat în aceleași condiții. Sedimentul ultimei centrifugări, o pulbere fină de granule virale, a fost suspendat în eter etilic și lăsat să se evapore eterul la aer. În acest mod se obține o pulbere de granule în stare pură.

O altă metodă folosită pentru obținerea poliedrelor, constă în introducerea larvelor moarte într-o soluție SDS de 0,1% conținând 50 mg/l de mertiolat, filtrarea maceratului, urmată

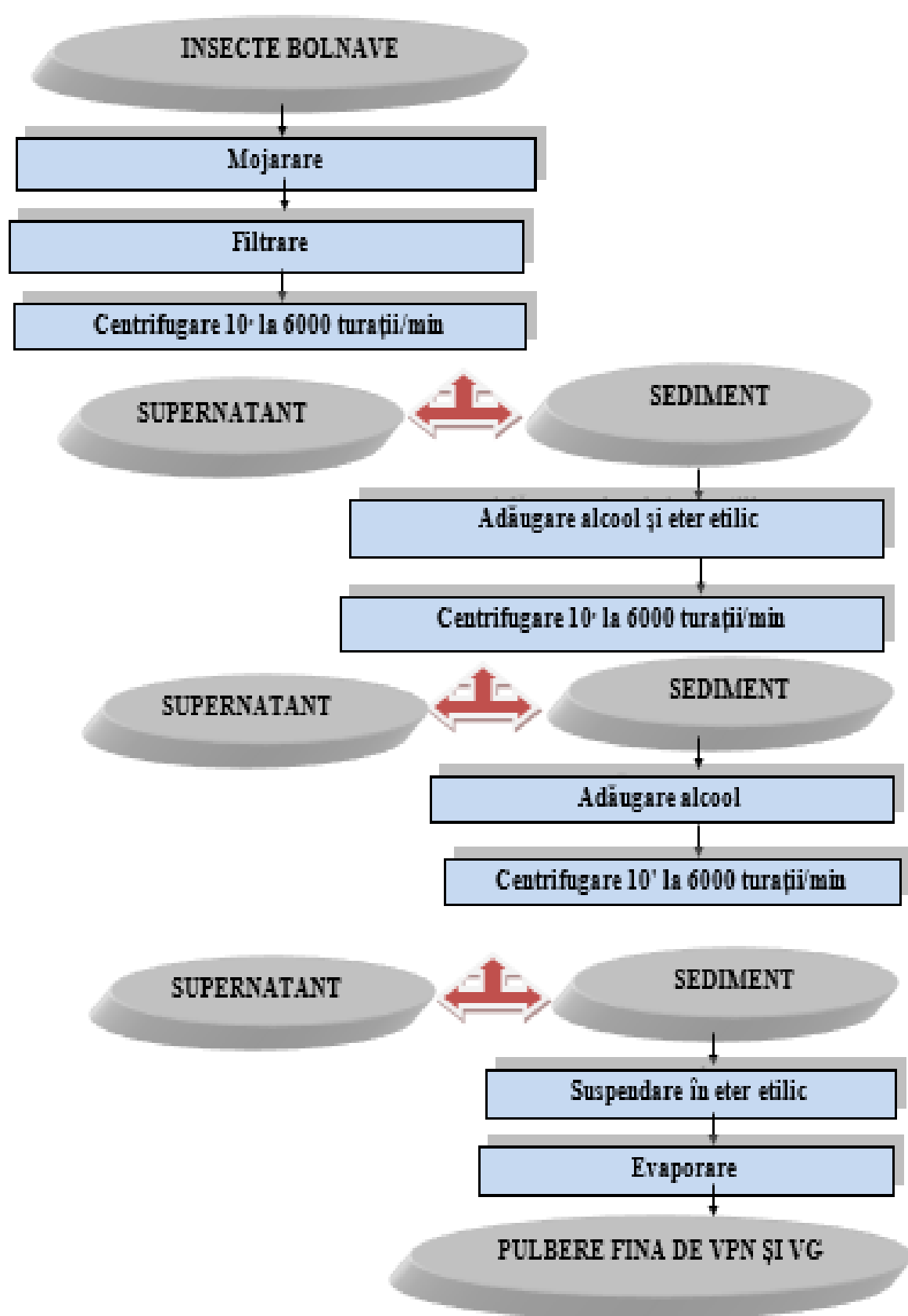


Fig. 4.1. Schema de obținere a pulberii virale de VPN și VG în stare pură

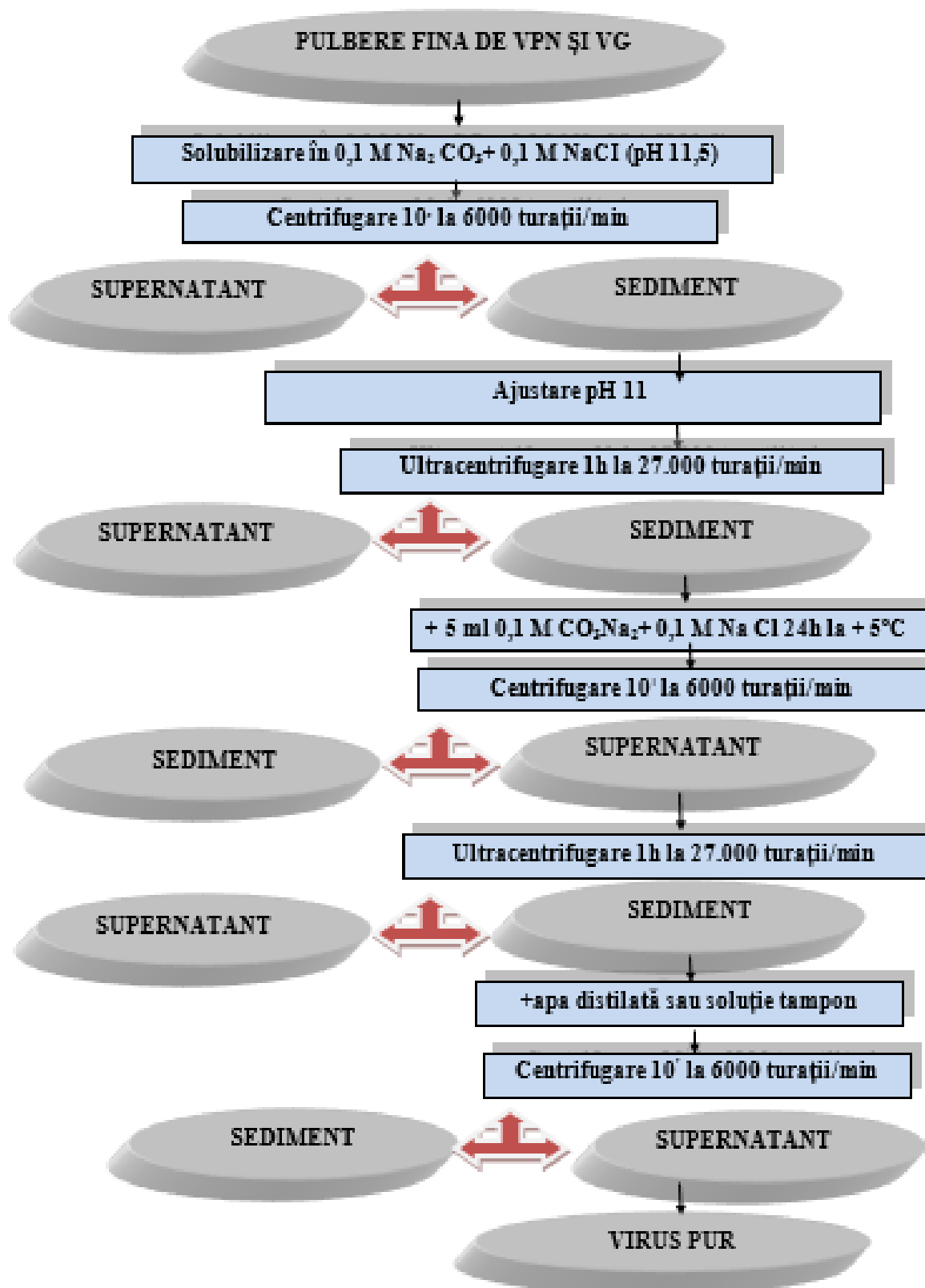


Fig. 4.2. Schema modificată de purificare a VPN și VG

de sedimentarea prin centrifugare la 6000 rotații/minut. După trei spălări și centrifugări, sedimentul final de poliedre a fost suspendat într-o soluție de NaCl de 0,6%.

A doua fază de obținere a virusului în stare pură, are loc în 5 etape (Figura 4.2). Pulberea este solubilizată într-un amestec de 0,1 M Na_2CO_3 și 0,1 M NaCl și centrifugată timp de 10 minute la 6000 rotații/min. Valoarea pH-ului este ajustată la 3 și supernatantul este supus ultracentrifugării timp de o oră la 27000 rotații./min. Sedimentul este reluat în soluția de 0,1 M Na_2CO_3 și 0,1 M NaCl, în care este ținut timp de 24 de ore și apoi centrifugat timp de 10 minute la 6000 rotații/min. Supernatantul obținut este ultracentrifugat timp de o oră la 27000 rotații/min.

Sedimentul obținut în urma ultracentrifugării este reluat în apă sau soluție tampon și supus centrifugării la 5000 rotații/min timp de 10 minute. Virusul în stare pură se găsește în supernatantul ultimei centrifugări și poate fi folosit în cercetările de microscopie electronică. Alte cercetări de microscopie electronică s-au realizat pe preparate purificate depuse pe grile-suport, acoperite cu o peliculă de carbon, și pe secțiuni ultrafine.

Titarea baculovirusurilor în suspensia virală. În vederea stabilirii dozelor de preparat viral aplicat în diferite condiții, s-a determinat capacitatea de infectare a preparatului viral prin metoda titrajului biologic. Au fost folosite 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 intacte calitățile inițiale, au fost utilizate trei moduri 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. Acesta funcționează pe principiul alimentării cu lichid, care se realizează prin gravitație sau cu o pompă specială. Sub influența temperaturii și datorită forței centrifuge rezultate din rotația turbinei (24000 rotații pe minut) are loc evaporarea rapidă (aproape instantanee) a apei din filtrat și depunerea baculovirusului sub formă de viriocapside, în stare uscată, în rezervorul de captare și parțial pe pereții atomizorului. Principala preocupare în cazul atomizării materialului a fost identificarea unor praguri de temperatură în atomizor, care să excludă pericolul inactivării virusului.

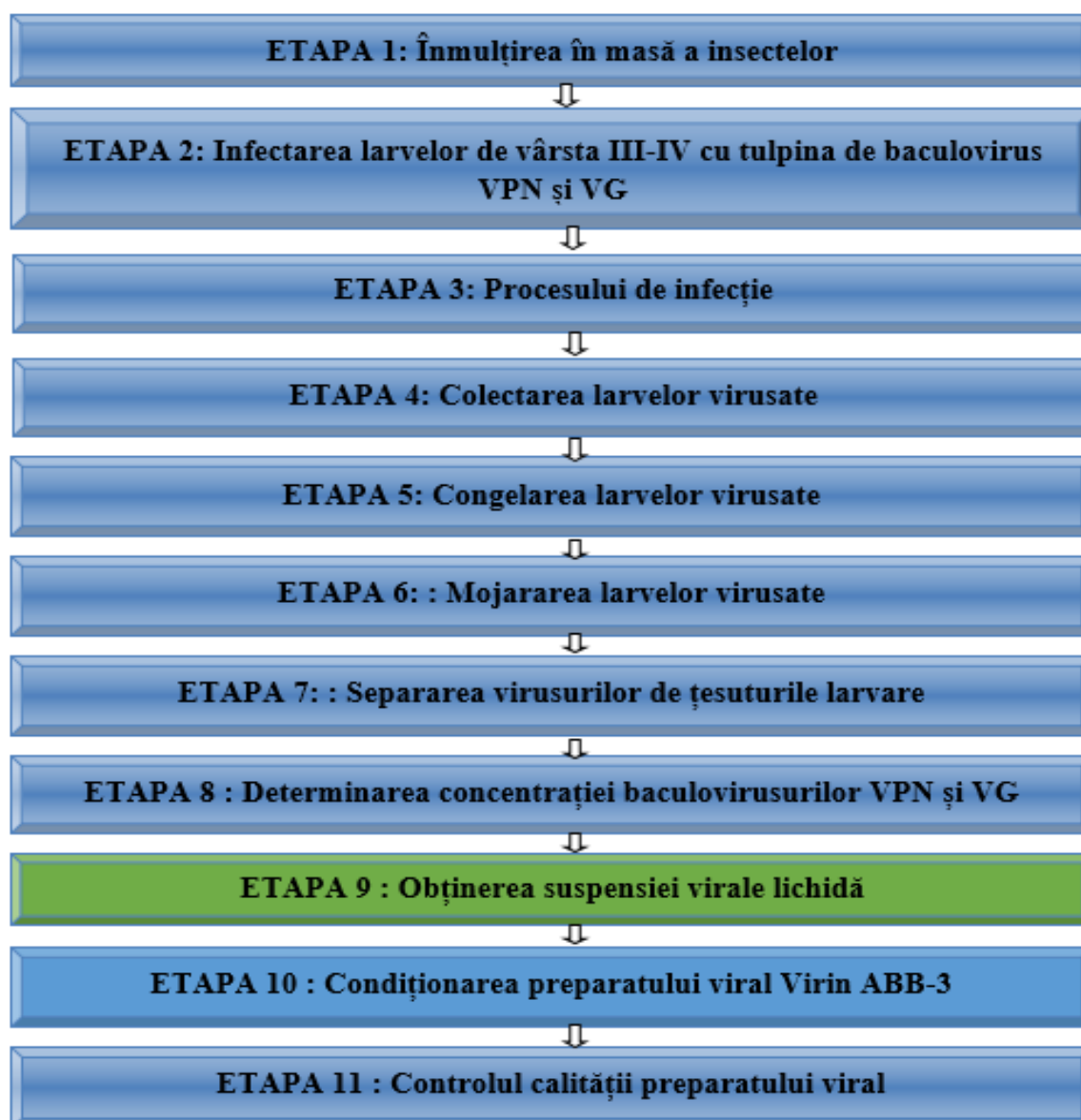


Fig. 4.3. Schema tehnologică a variantei I de producere a preparatului Virin-ABB-3

Extragerea apei prin liofilizarea materialului viral s-a efectuat cu ajutorul unui liofilizator de tip Bechman-101. În acest dispozitiv suspensia s-a ținut timp de 48 de ore într-un vas sub formă de tavă, în vid, la temperaturi scăzute (-20 și -30°C) și umiditatea constantă (6-8%). Pulberea obținută s-a depozitat în borcane cu dop rodat cu capacitatea de 1 litru care s-au ținut în frigider până la condiționarea preparatului.

Modul de condiționare al agentului activ a demonstrat diferențe în cele trei variante tehnologice de obținere a preparatului viral, prezentate în următoarele scheme (Figura 4.3, 4.4, 4.5). Pentru a afla care este cel mai indicat mod de condiționare a substanței active, au fost testate cele trei variante după păstrarea timp de un an la temperatura de -23°C a suspensiei în apă distilată a pulberelor rezultate în urma atomizării și liofilizării celor trei variante. Varianta

martor a reprezentat o suspensie de preparat proaspăt obținută. Testările s-au efectuat în trei repetări, a câte 100 de larve în fiecare variantă prin administrarea de mediu tratat.

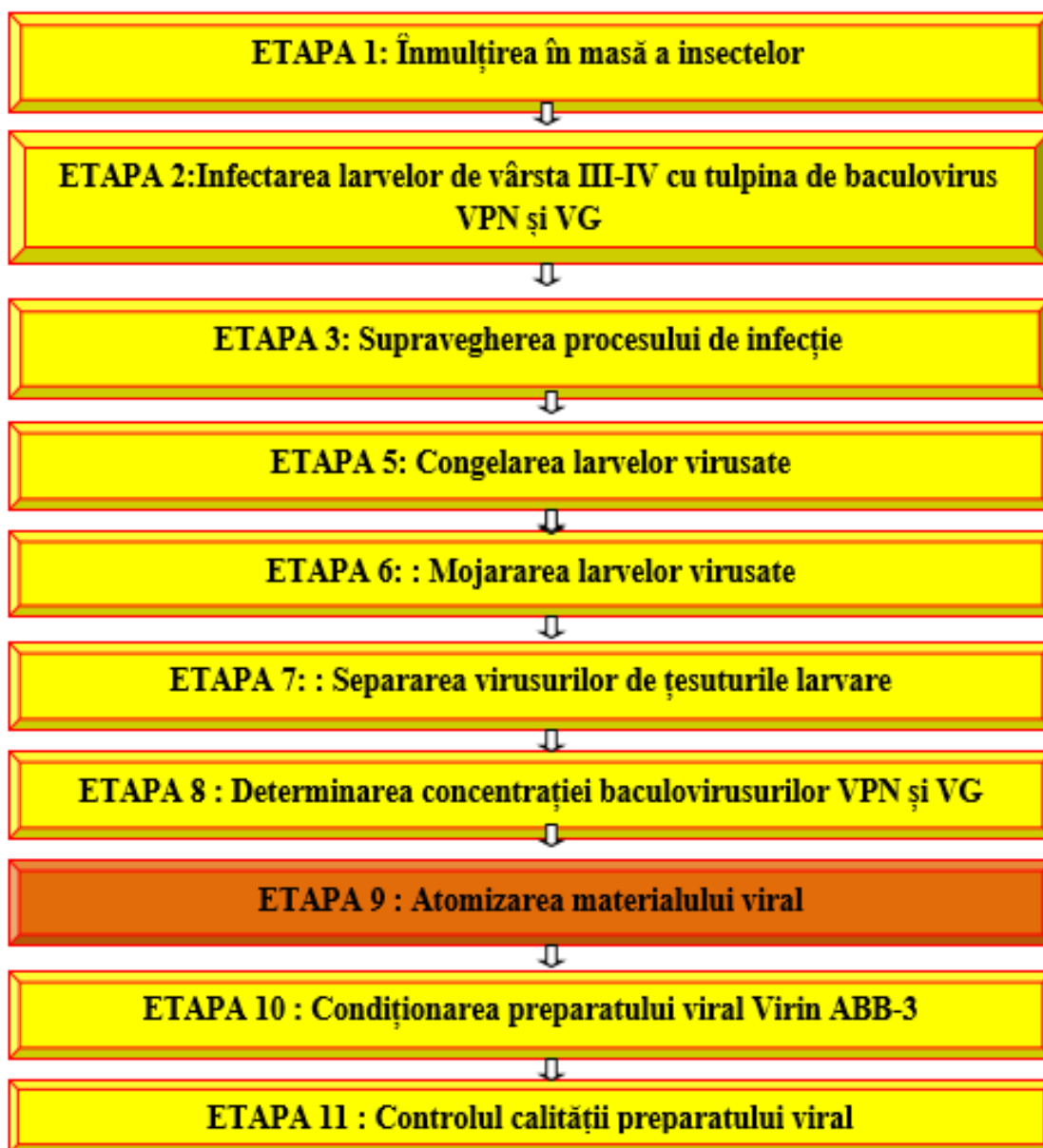


Fig. 4.4. Schema tehnologică a variantei II de producere a preparatului Virin-ABB-3

Stadiul testat a fost cel de larve de vârstă a doua proaspăt năpârlite. Mortalitatea naturală și cea generată de alte cauze a fost înregistrată zilnic, iar larvele, prezentând simptomele infecției cu baculovirusuri, au fost izolate și analizate. Cercetările de microscopie electronică au fost realizate pe secțiuni ultrafine.

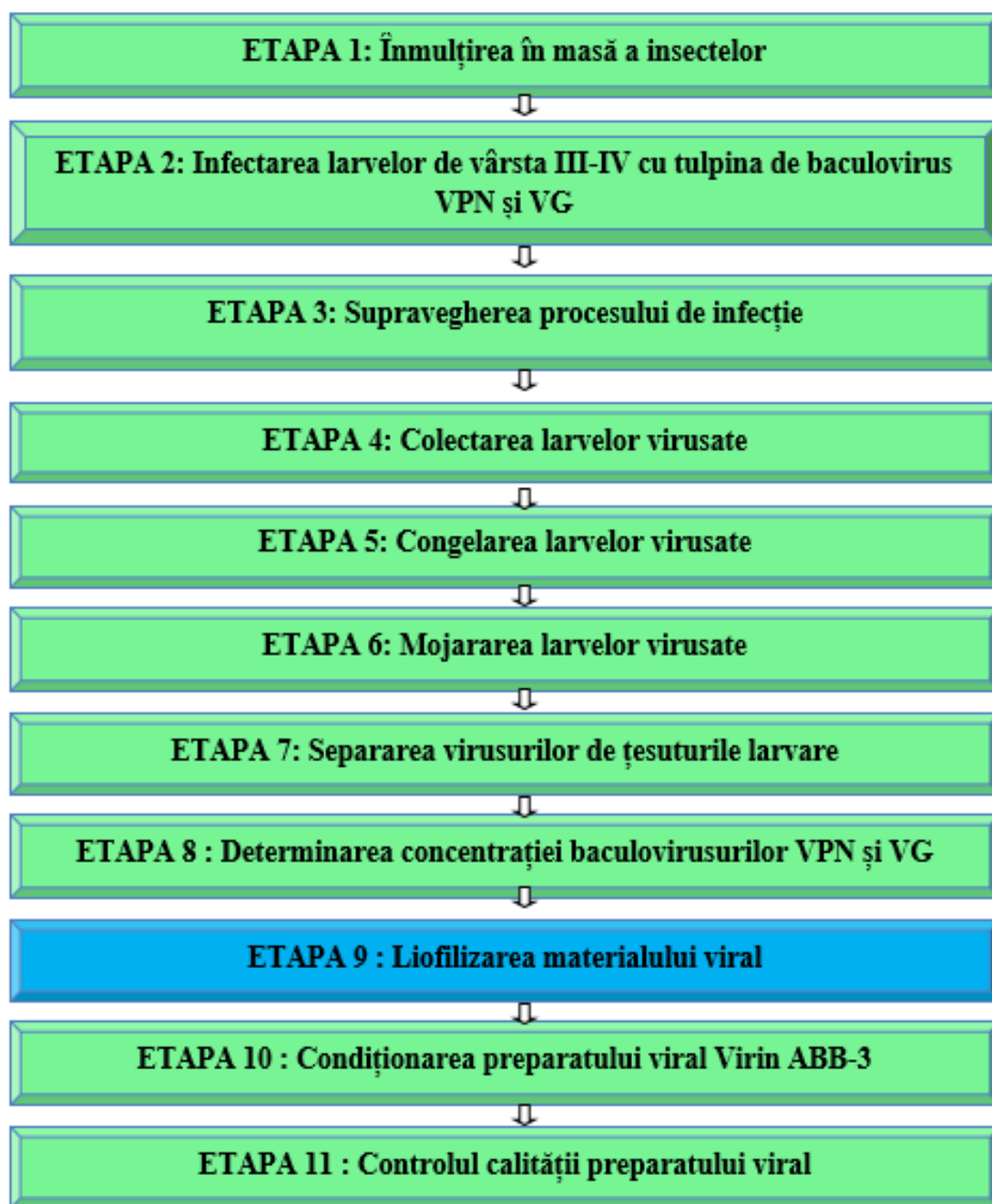


Fig. 4.5. Schema tehnologică a variantei III de producere a preparatului Virin-ABB-3

După recoltare, materialul biologic se păstrează în condiții de temperatură scăzută, în acest fel prevenindu-se dezvoltarea microorganismelor de putrefacție. În cazul, în care prelucrarea materialului biologic și extragerea virusului se efectuează la scurt timp de la recoltare (10-15 zile), păstrarea acestuia se poate face la temperaturi de 0-4°C. Dacă prelucrarea materialului se efectuează la perioade mai lungi de la recoltare (5-6 luni), păstrarea trebuie făcută la temperaturi mult mai scăzute (-20°C).

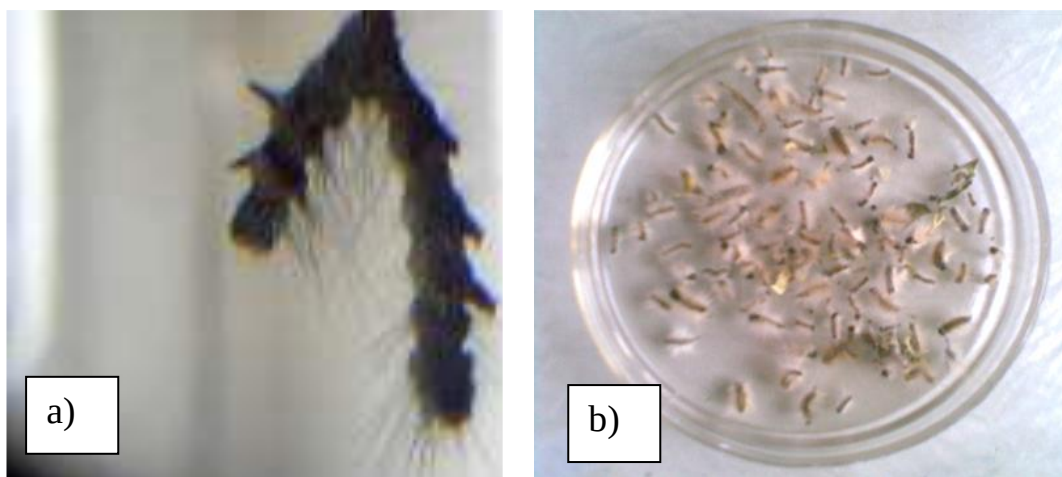


Fig. 4.6. Particularitățile larvei virusate (a) și colectate pentru cercetări (b)



Fig. 4.7. Acumularea larvelor virusate (c) în timpul experimentelor și colectate pentru cercetări (d)

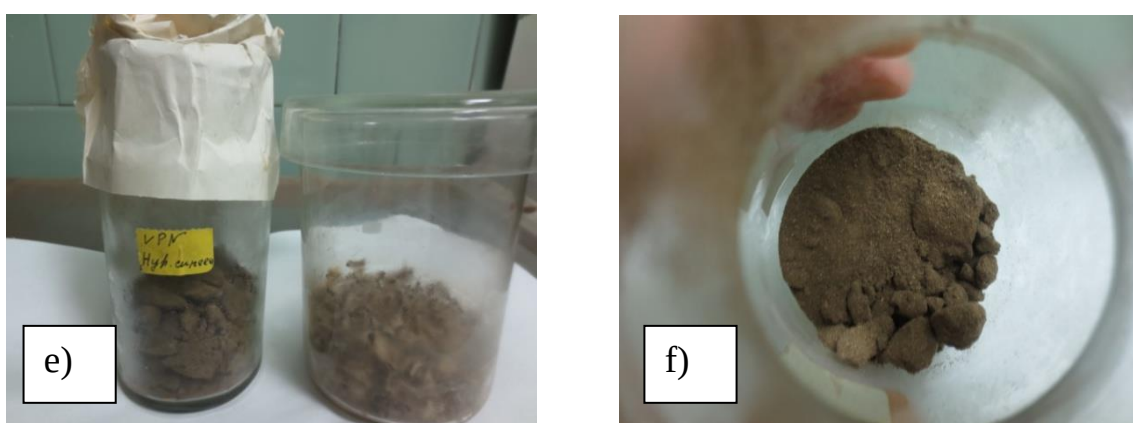


Fig. 4.8. Pregătirea preparatului viral Virin-ABB-3 pentru titrare (e) și conservare (f)

Păstrarea larvelor virozate în condiții de temperatură ridicată, o perioadă mai îndelungată poate duce la inactivarea virusului și apariția proceselor de fermentație și putrefacție, care pot compromite materialul biologic. Perfecționarea și determinarea calității preparatului viral se

efectuează pentru asigurarea titrului preparatului la nivel de 6×10^6 poliedre sau granule/ml. Pulberea respectivă se amestecă în matricea preparatului, care trebuie să îndeplinească o serie de condiții: să includă substanțe aderente; să asigure rezistentă la acțiunea razelor ultraviolete particulele să nu depășească mărimea duzelor aparatelor de stropit; să formeze o suspensie stabilă. În Tabelul 4.1. sunt prezentate principalele componente în patru dintre variantele de matrice a preparatului viral.

Tabelul 4.1. Componentele matricei preparatului viral Virin-ABB-3

Componenta matricei	Conținutul în preparatul baculoviral			
Zahăr	80%	-	-	-
Melasă atomizată	-	80%	-	-
Pudră de semințe de struguri			80%	
Șlam	-	-	-	80%
Cărbune aciv	5%	5%	5%	5%
Acid ascorbic	1%	1%	1%	1%
Acid sorbic	1%	1%	1%	1%
Lapte praf	12%	12%	12%	12%
Altele	1%	1%	1%	1%

În cercetările efectuate privind compoziția matricei au fost studiate amestecuri în diferite proporții (%) ale unei serii de elemente precum: zahăr, melasă atomizată, cărbune activ, acid ascorbic, acid boric, acid sorbic, lapte praf, germeni de grâu ș.a. Au fost optimizate procedeele tehnologice de producere ale preparatului baculoviral prin aplicarea în premieră a unui ingredient nou – 5% de cărbune activat pentru perfecționarea matricei preparatului și sporirea rezistenței la acțiunea razelor ultraviolete.

Matricele din fiecare variantă au fost amestecate cu agentul activ (pulbere atomizată în proporție de 1:9) din care s-au preparat suspensii în apă distilată, testate apoi în vederea stabilirii parametrilor menționați anterior sunt prezentate în Tabelul 4.2.

Tabelul 4.2. Determinarea principalilor indici tehnologici ai componentelor matricei preparatului viral

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

În varianta martor agentul activ a fost diluat în apă distilată. Aceste rezultate au condus la selecția primei variante drept matrice în obținerea preparatului viral. În compoziția preparatului, agentul activ constituie 10%. Au fost stabiliți următorii indicatorii: viteza de înmuiere (în secunde); pH-ul suspensiei; stabilitatea; aderența preparatului la substrat; rezistența la spălare.

Variante de condiționare a preparatului viral Virin-ABB-3. Matricele din fiecare variantă au fost amestecate cu substanța activă (pulbere atomizată) și s-au făcut suspensii în apă distilată, testate apoi în vederea stabilirii principalilor parametri menționați anterior. Indicii calității preparatului Virin-ABB-3 sunt prezentați în Tabelul 4.3.

Tabelul 4.3. Indicii principali ai preparatului Virin-ABB-3

Nr.	Indicii	Unitatea de măsură	Proprietățile calitative ale preparatului
1	Activitatea biologică	TL ₅₀	4,8 zile
2	Concentrația SVC-urilor într-un gram de preparat	număr	9×10^{11}
3	Concentrația microflorei străine	nr. de microorg./g	2×10^4
4	Consistența	-	Pulbere
5	Culoarea	-	Brună
6	Umiditatea	%	5-6
7	Mirosul	-	de chitină
8	pH	-	7,0-7,5
10	Fitotoxicitatea	-	Netoxic
11	Mărimea particulelor	nm	<90
12	Rezistența la acțiunea radiațiilor UV	ore	>60
13	Omogenitatea	sec.	60
14	Aderența	%	85-92
15	Identitatea tulpinii cu cea inițială	%	88-90
16	Inflamabilitatea	-	Neinflamabil
17	Termen de păstrare	ani	4 >

Indicii principali ai preparatului Virin-ABB-3 se caracterizează cu pH cuprinse în intervalul 6,5-7,5, fiind optime pentru conservarea virusurilor. O aderență sporită s-a înregistrat în variantele, în care componentele majoritare au fost zaharoza și melasa atomizată. Rezistența la spălare, de asemenea a fost în primele două variante, iar rezistența la acțiunea radiației ultraviolete s-a înregistrat în varianta, în care zaharoza constituie componentul majoritar al matricei.

Producerea preparatelor baculovirale necesită elaborarea formelor preparative, care ar asigura menținerea activității biologice a patogenului, cât și a indicilor tehnologici necesari la folosirea lor în combaterea *H. cunea*. Rezultatele infectării larvelor de *H. cunea* cu Virin-ABB-3 la folosirea diferitor forme preparative sunt reprezentate în Tabelul 4.4.

Tabelul 4.4. Activitatea biologică a baculovirusurilor în diferite forme preparative

Variante	Specia de arbore	Numărul de larve	Concetrația preparatului, ml	Vârsta larvelor	Mortalitatea (după Abbot)	
					ex.	%
1.Suspensie virală + melasă (1:1)	Măr	100	10 ⁶	II-III	79	75,58
	Arțar	100	10 ⁶	II-III	69	63,95
	Dud	100	10 ⁶	II-III	85	84,2
2. Suspensie virală + tărațe de grâu (1:1)	Măr	100	10 ⁶	II-III	79	73,95
	Arțar	100	10 ⁶	II-III	75	74,2
	Dud	100	10 ⁶	II-III	58	52,27
3. Suspensie virală + făină din semințe de struguri (1:1)	Măr	100	10 ⁶	II-III	89	87,21
	Arțar	100	10 ⁶	II-III	100	99,75
	Dud	100	10 ⁶	II-III	79	76,13
4. Suspensie virală + extract de porumb (1:10)	Măr	100	10 ⁶	II-III	49	42,04
	Arțar	100	10 ⁶	II-III	64	58,13
	Dud	100	10 ⁶	II-III	80	78,9
5. Martor (apă distilată sterilă)	Măr	100	10 ⁶	II-III	1	-
	Arțar	100	10 ⁶	II-III	2	-
	Dud	100	10 ⁶	II-III	2	-

Rezultatele prezentate în tabel denotă, că aplicarea ingredientelor condiționează cerințe suplimentare față de procesele tehnologice de producere și elaborare a formelor preparative ale insecticidelor baculovirale. Este necesar de menționat că cele mai semnificative rezultate au fost înregistrate la aplicarea suspensiei virale + făină de semințe de struguri (1:1), când mortalitatea pe dud a fost de 76, 13%, pe arțar – 99,75%, pe măr – 87, 21%.

Cercetări privind identitatea tulpinii de baculovirus VPN și VG cu cea inițială. S-au efectuat infectări ale mediului de creștere a larvelor. Din larvele moarte a fost reizolat virusul și s-au efectuat măsurări (Tabelul 4.5).

Tabelul 4.5. Dimensiunile supravirio capsidelor virale izolate din larvele de *H. cunea* infectate cu virusul granulozei

Anul	Lungimea (nm)			Lățimea (nm)		
	minimă	maximă	medie	minimă	maximă	medie
2011	252	619	402,1	209	432	324,4
2012	218	591	388,1	199	316	283,3
2013	258	706	421,3	221	493	359,4

Datele cercetărilor au demonstrat, că SVC al *H. cunea* au o lungime medie de 388,1-421,3 nm și o lățime medie cuprinsă între 283,3 și 359,4 nm. În preparatele analizate pe lângă SVC normal constituite s-au observat și unele diferite ca formă și dimensiuni.

4.2. Evidențierea legităților 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. Recunoașterea necesității aplicării virusurilor entomopatogene și a insecticidelor baculovirale, elaborate în baza lor, este determinată de originalitatea calitativă a agenților patogeni, printre care specificitatea, iar caracterul epizootic al lor constituie un avantaj principal față de insecticidele chimice. Manifestarea caracterului epizootic al baculovirusurilor, fiind o determinantă polifactorială, are loc periodic și este condiționată de un șir de factori biotici și abiotici. În scopul utilizării raționale a acestor pârgii eficiente, este necesară cunoașterea profundă a mecanismelor și legităților ce determină reglarea densității populațiilor de insecte dăunătoare sub acțiunea baculovirusurilor. Avantajele enumerate mai sus determină, în mare măsură, necesitatea aplicării în condițiile de producere a preparatelor virale, însă, este necesar de recunoscut că deocamdată volumul de folosire a lor rămâne redus. Una dintre multiplele cauze care determină stagnarea în domeniul aplicării pe larg a insecticidelor virale este lipsa unor cercetări detaliate în ceea ce privește caracterul epizootic al virusurilor entomopatogene. Paralel cu efectul protector al baculovirusurilor este necesar de menționat și caracterul biocenotic de reglare a lor. Mecanismele de declanșare și dezvoltare a epizootiilor cauzate de baculovirusuri în momentul actual rămân cercetate insuficient [4].

Deși cercetările anterioare în domeniul patologiei insectelor au fost orientate spre cunoașterea acțiunii microorganismelor și, în special, a virusurilor asupra țesuturilor și celulelor și a relațiilor virus-celulă, în ultimii ani, se remarcă orientarea cercetărilor spre problemele legate de raporturile dintre maladii, mediul exterior și organismul gazdă. Aceste cercetări au drept scop elucidarea unor aspecte în raport cu factorii care determină apariția infecției virale în populațiile de insecte, dependența virozelor de condițiile de mediu, conservarea și menținerea în stare activă a virusurilor în afara organismului insectelor, căile de transmitere a virusurilor, starea de latență a virusurilor etc. Dintre factorii de mediu care au influență directă asupra maladiilor virale rolul cel mai important se atribuie factorilor climatici, alimentari și densității populațiilor insectelor-gazdă. Este cert faptul că cunoașterea mai profundă a legităților de răspândire a infecțiilor virale condiționează în mare măsură sporirea eficienței metodelor microbiologice în protecția biologică a plantelor. Analiza stării patologice a populațiilor de insecte dăunătoare a permis de a constata că larvele, la majoritatea speciilor de lepidoptere, sunt purtători ai mai

multor tipuri de infecție. Momentul declanșării fenomenelor epizootice se află în dependență strânsă de starea patogenului în insectă și factorii mediului exterior. Cercetarea sistemului „virus – gazdă” a permis de a elucida legăturile principale de interacțiune dintre patogen și insectă și de a stabili condițiile optime de desfășurare a procesului de patogeneză și dirijare a mortalității insectelor-gazdă. A fost demonstrată transmiterea transovarială a patogenilor, fapt ce determină transmiterea virusurilor de la o generație la alta și asigură păstrarea îndelungată a infecției în cadrul populației, reglând astfel densitatea ei.

Într-un complex biocenotic, populația insectei-gazdă reprezintă unul din elementele ecosistemului, în care alături de gazdă, se găsesc dispersate într-un număr mai mare sau mai mic și microorganisme entomopatogene. Acestea, printr-o înmulțire mai rapidă se pot acumula în masă în populația *H. cunea*, provocând epizootii în urma cărora gradația insectei se poate stinge pe cale naturală. Dintre toate tipurile de epizootii care apar în populația *H. cunea*, prin rolul lor limitativ, prezintă semnificație virozele provocate de virusul poliedrozei nucleare și virusul granulozei, care constituie factorul determinant al stingerii gradațiilor insectelor. Importanța epizootiilor de tipul poliedrozelor nucleare și virusului granulozei rezultă atât din frecvența cu care acestea apar în ecosisteme, cât și din amploarea cu care se manifestă în unele perioade, când practic populația dăunătorului poate fi redusă sub nivelul pragurilor de dăunare.

Transmiterea baculovirusurilor poate fi orizontală între indivizi prin infectarea mediului, sau verticală de la părinți la descendenți. La moartea unei larve infectate, virionii sunt eliberați și larvele sănătoase devin infectate în cazul, în care ingerau virușii pe frunzele contaminate. Adulții sunt infectați subletal ca larvele să poată transmite virusul descendenților fie pe ouă, fie în ouă. Acest lucru conduce la o infecție activă, adică nimicirea descendenților sau eventual a unei infecții ascunse, care este transmisă la descendenții ce vor supraviețui.

Baculovirusurile pot supraviețui numai, dacă acestea sunt protejate de radiația ultravioletă. Astfel, transmiterea pe orizontală din acest rezervor ecologic ar putea fi principala cale de transmitere a infecției. Transmiterea pe orizontală este strâns legată de densitatea gazdei și de 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 [17].

Transmiterea pe orizontală a infecției depinde în mare parte de rezistența agenților patogeni și de gradul de acțiune a factorilor mediului înconjurător. În condițiile optime ale mediului în cadrul populației de insecte dăunătoare persistă permanent, pe lângă insectele sănătoase și bolnave sau purtătoare de infecții. Aceasta asigură formarea focarelor de infecție, unde se stabilește un fondal de infecție virală și se înregistrează transmiterea patogenului. În componența biocenozelor au fost relateate epizootii însoțite de moartea în masă a insectelor dăunătoare (Figura 4.9).

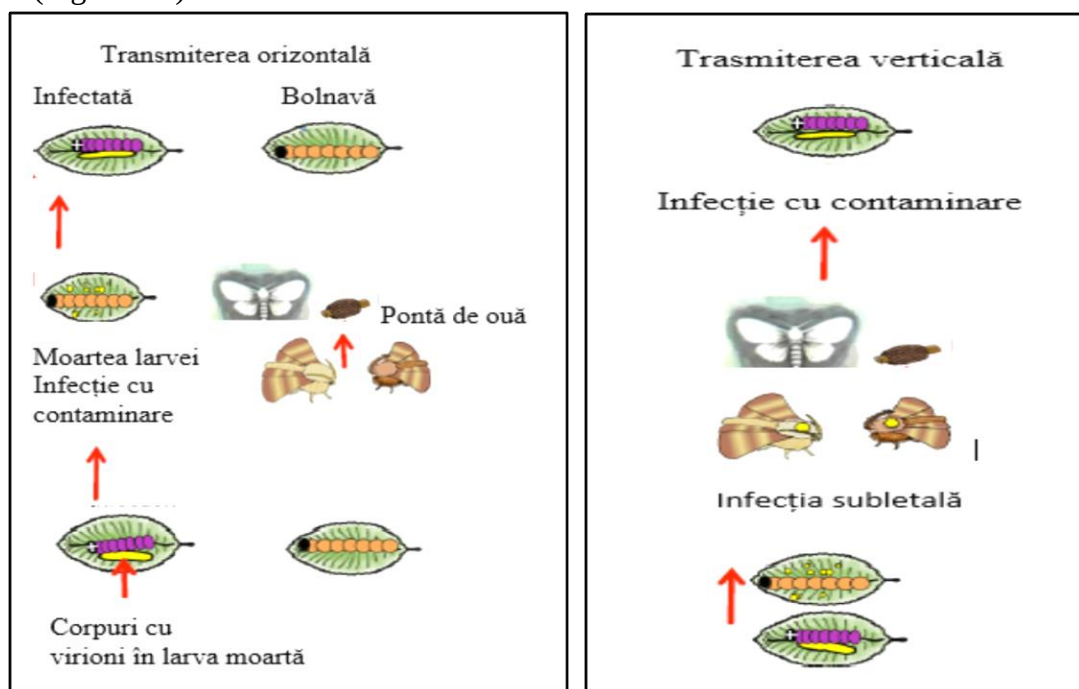


Fig. 4.9. Trasmiterea pe orizontală și verticală a virusului granulozei și poliedrozei la *H. cunea*.

După moarte larvele infectate eliberează un număr mare de virioni în mediul înconjurător cu care se produce infecția. Larvele se infectează, dacă ele ingeră frunze infectate. Conservarea mediului sau contactul direct cu cadavrele virulente virusate conduc la transmiterea pe orizontală, care va apărea în populațiile cu gradație înaltă, ca și în cazul larvelor din populațiile cu densitate scăzută, când virusul este transmis pe verticală de la adulți (Figura 4.9). Acest lucru denotă despre 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 entomopatogenilor ca agenți de combatere a dăunătorilor. Transmiterea pe orizontală evoluează în funcție de condițiile de mediu și persistența dăunătorului [16].

Deosebit de importantă este modelarea căilor de transmitere pe orizontală a infecției

virale în populația *H. cunea*, fiind investigat pentru prima dată trei modele posibile de transmitere a virusului de la larvele infectate la cele neinfectate:

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 infectate, accentul fiind pus pe transmiterea orală.

Rezultate studiului privind căile de transmitere orizontală a infecției este prezentat în Figura 4.8.

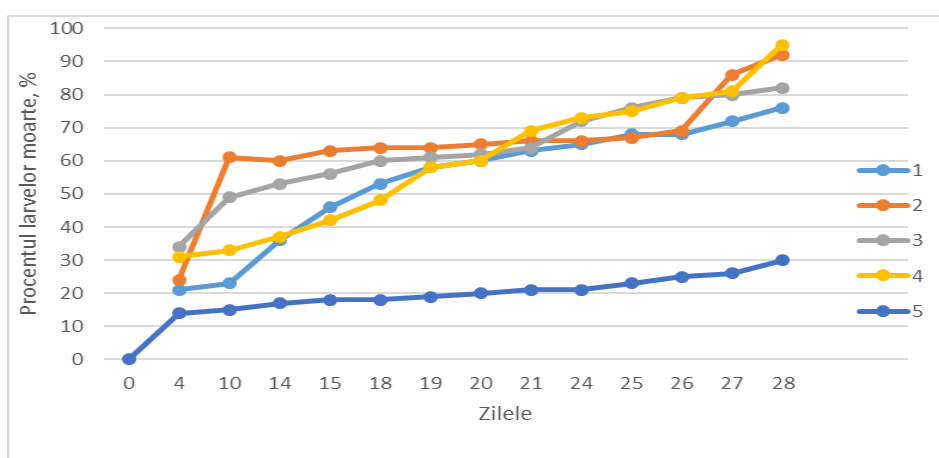


Fig. 4.10. Dinamica mortalității larvelor infectate cu VPN în funcție de modelele de transmitere a patogenului: 1 - variantă 1, modul complex de transmitere a infecției: larve infestate și neinfestate au fost ținute și hrănite împreună; 2 - variantă 2, transmiterea infecției prin cale aeriană: larvele neinfestate s-au păstrat în apropiere, dar fără contact cu larvele infestate; 3 - variantă 3, calea orală de infecție: larvele neinfestate hrănite pe frunze pe care se aflau anterior larve infestate; 4 - control "+": larve infestate cu virus; 5 - martor "-": larve neinfestate cu virus

Evaluarea eficacității modalităților de transmitere a unei infecții virale a fost efectuată în trei etape: 1) pregătirea larvelor purtătoare de infecție; 2) modelarea opțiunilor enumerate; 3) evidența mortalității insectelor în condiții de laborator.

Etiologia larvelor moarte, din cauza baculovirusurilor, a fost determinată cu ajutorul microscopului optic și prin analiza conținutului omizilor moarte. La martor cu reacție pozitivă s-a constatat o dinamică tipică a mortalității larvelor de poliedroză. În eșantioanele de testare a fost depistată mortalitatea nu numai de poliedroză, dar și de infecții secundare. Mortalitatea larvelor la martorul "-" a fost mai mare comparativ cu alte variante. În cazul insectelor neinfestate (martor "-"), și în varianta 2, nu au fost identificate larve neinfestate cu virus. 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.

Rezultatele înregistrate nu numai că demonstrează caracterul epizootic al baculovirusurilor *H. cunea*, ci și servesc în calitate de dovezi incontestabile privind necesitatea elaborării și aplicării preparatelor baculovirale în protecția integrată a culturilor agricole și silvice.

Cercetări privind activitatea biologică a biopreparatului. Investigațiile virusurilor la insecte dăunătoare, necesitau cercetări profunde ale relațiilor dintre agentul patogen și celula-gazdă, precum și elaborarea metodelor de identificare a virusurilor (Tabelul 4.6).

Tabelul 4.6. Determinarea valorilor TL₅₀ la diferitele vârste ale larvelor în rezultatul tratamentului cu preparatul viral

Vârsta larvelor	TL ₅₀ (zile)	
	2008	2015
Larve de vârstă I (L ₁)	4,5	4,7
Larve de vârstă a II-a (L ₂)	5,7	5,3
Larve de vârstă a III-a (L ₃)	6,8	7,7
Larve de vârstă a IV-a (L ₄)	9,6	8,8
Larve de vârstă V-a (L ₅)	12,9	14,5
Larve de vârstă VI-a (L ₆)	14,8	15,2
Larve de vârstă VII-a (L ₇)	15,1	15,4
DEM 0,05	2,3	2,5

Drept rezultat al investigațiilor multianuale au fost elaborate metode de sporire a activității biologice, de producere și bioconservare a biomasei virale, precum și de obținere a formelor preparative eficiente și tehnologice. Rezultatele obținute privind activitatea biologică în baza determinării TL₅₀ la diferite vârste larvare ale *H. cunea* în condiții dirijate au demonstrat că în primul an de cercetare valorile TL₅₀ au fost cuprinse între 4,5 zile în cazul larvelor L₁ și 12,9 zile în varianta larvelor de vârstă a V-a. Comparând datele prezentate în tabelul 4.6, s-a depistat lipsa diferenței semnificative a rezultatelor înregistrate. Rezultatele din tabel denotă că valorile TL₅₀

obținute în anul 2015 au confirmat rezultatele din primul an care au constituit 4,7 zile la L₁ și 15,4 zile la L₇.

Rezultatele experiențelor de combatere pe scară largă a larvelor de lepidoptere defoliatoare cu ajutorul biopreparatului Virin-ABB-3 obținut pe diferite specii de plante cărora sunt prezentate în Tabelul 4.7.

Tabelul 4.7. Activitatea biologică la biopreparatului Virin-ABB-3 asupra *H. cunea* pe diferite specii de plante

Cultura	Nr. larve	Concetraț.	Numărul larvelor moarte, zile					Procentul mortalității, zile			Eficiența biologică, %
			3	5	7	10	15	5 zi	10 zi	15 zi	
Dud (<i>Morus L.</i>)	40	10 ⁶	0	12	19	34	39	30,0	85,0	97,5	97,3
Arțar (<i>Acer negundo L.</i>)	40	10 ⁶	0	8	16	29	38	20,0	72,0	95,5	95,2
Nuc (<i>Juglans regia L.</i>)	40	10 ⁶	0	6	9	28	38	15,0	70,0	85,0	84,2
Cireș (<i>Cerasus avium L.</i>)	40	10 ⁶	0	5	10	27	32	12,0	65,0	80,0	78,9
Salcâmul (<i>Robinia pseudoacacia L.</i>)	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 tabelul 4.7 demonstrează că mortalitatea Omizii-păroase-a-dudului de toate vârstele a fost mai mare (97,3%) la dud, iar cea mai scăzută – la salcâm (73,8%). Factorul trofic are o influență pozitivă asupra populației dăunătorului (Tabelul 4.8).

Tabelul 4.8. Activitatea biologică a baculovirusului asupra *H. cunea* la aplicarea frunzelor de dud

Varianta	Repetiții	No. de larve	Vârsta larvelor	Concetrația suspensiei poliedri/ml	Mortalitatea după			
					7 zile		15 zile	
					larve moarte	%	larve moarte	%
VG 2011	I	50	II-III	10 ⁷	24	48,0	39	78,1
VG 2012	II	50	II-III	10 ⁷	25	50,0	41	82,2
VPN 2011	I	50	II-III	10 ⁷	26	52,0	37	74,5
VPN 2012	II	50	II-III	10 ⁷	27	54,0	40	80,3
VPN±VG (1:1)	I	50	II-III	10 ⁷	28	56,0	46	92,6
VPN±VG (1:1)	II	50	II-III	10 ⁷	28	56,0	44	88,2
Martor	I	50	II-III	10 ⁷	0	-	1	4,0
Martor	II	50	II-III	10 ⁷	0	-	2	6,6
DEM _{0,05}								3,2

Deosebit de fructuoase au fost investigațiile legate de elaborarea tehnologiilor de producere a preparatelor baculovirale. Au fost elaborate metode de sporire a activității biologice,

de producere și bioconservare a biomasei virale precum și obținere a formelor preparative eficiente. Datele prezentate în tabelul 4.8 demonstrează că mortalitatea larvelor la aplicarea VG 2011 în ziua a 15-a a fost 78-82%, iar al VPN – 74-80%. La aplicarea ambelor virusuri, VG și VPN mortalitatea a crescut de la 74,5% până la 92,6%. Materialul a fost utilizat pentru pregătirea preparatului Virin-ABB-3. Rezultatele obținute confirmă că baculovirusurile în biocenoză își păstrează activitatea biologică suficientă pentru dezvoltarea fenomenelor epizootice.

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. 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. Rezultate privind eficacitatea tratamentelor cu virus, sunt reprezentate în tabelele 4.9 și 4.10.

Tabelul 4.9. Eficacitatea tratamentelor cu preparat viral în combaterea larvelor de *H. cunea* în arboret, stabilită la ultimul control al mortalității

Cultura	Densitatea ouălor viabile pe arbore	Nr. de larve la data stabilirii eficacității	Nr. de larve vii	Mortalitatea pe arbore, %	Mortalitatea medie, %
Arțar (<i>Acer negundo</i> L.)	1500	1,150	36	96,2	95,6
Dud (<i>Morus</i> L.)	4000	3,600	342	90,5	
Nuc (<i>Juglans regia</i> L.)	1500	1,150	36	96,9	
Cireș (<i>Cerasus avium</i> L.)	2000	1,400	47	96,6	
Tei (<i>Tilia cordata</i> L.)	2000	1,400	19	98,1	
DEM _{0,05}					1,02

Rezultatele prezentate în tabelul 4.9, scot în evidență faptul că tratamentele virologice cu doze relativ scăzute de preparat, aplicate în două reprize, în perioada foarte favorabile (vârstele I-a și II-a ale larvelor) permit să se realizeze o eficacitate biologică (95,6%), ce poate fi comparată cu nivelul combaterii chimice. 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 4.10).

Tabelul 4.10. Eficacitatea tratamentelor cu preparat viral stabilită în funcție de densitatea pontelor de ouă

Specia de arbore	Numărul arborilor analizați	Numărul mediu de ponte		Eficacitatea biologică, %
		înainte de tratament	după tratament	
Stejar (<i>Quercus pedunculiflora</i> L.)	50	0,51	-	100,0
Arțar (<i>Acer negundo</i> L.)	50	3,73	0,1	97,31
Lemn cânesc (<i>Ligustrum vulgare</i> L.)	50	4,50	-	100,0
Nuc (<i>Juglans regia</i> L.)	50	5,01	0,05	99,00
Ulm (<i>Ulmus americana</i> L.)	50	2,10	-	100,0
Tei (<i>Tilia cordata</i> L.)	50	2,34	-	100,0
Media	-	3,03	0,02	99,33
Martor	50	0,5	2,1	-
DEM _{0,05}				2,3

Datele din tabelul 4.10 ne indică că, în urma tratamentelor efectuate eficacitatea biologică a constituit (97-100%). Eficacitatea combaterii virologice s-a determinat prin compararea densității depunerilor de ouă pe suprafața tratată cu cea din varianta martor. În baza rezultatelor obținute se poate concluziona, că pe lângă dozele de preparat viral o importanță deosebită o are și alegerea celor mai favorabile momente de tratare ce poate fi comparată cu nivelul combaterii chimice referitor la dezvoltarea larvară și înfrunzirea arborilor (Tabelul 4.11).

Tabelul 4.11. 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 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 4.11 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 pomicole. Tratamentele trebuie aplicate numai în perioada, când larvele sunt în primele două vârste de dezvoltare, iar arborii sunt înfrunziți. Aplicarea tratamentelor virologice la perioade mai târzii, necesită majorarea cantității de preparat viral, fapt care poate influența negativ eficiența acestor tratamente din punct de vedere economic (Tabelul 4.12).

Tabelul 4.12. Eficacitatea biologică a preparatului viral în combaterea *H. cunea* la măr, soiul *Golden Delicious*

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. Reeșind din rezultatele obținute menționăm, că tratamentele de protecție trebuie efectuate înaintea eclozării a larvelor din ponte. În această perioadă, doar o mică parte a larvelor este în vârsta a treia, majoritatea populației fiind la vârsta a doua (Tabelul 4.13).

Tabelul 4.13. Eficacitatea biologică a suspensiei virale obținute din larvele moarte la diferite zile de la infectarea cu baculovirusuri

Varianta	Concentrația, poliedre/ml	Nr. de larve	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 obținute din tabelul de mai sus demonstrează diferența dintre indicii activității biologice a biomasei obținute la diferite zile de la infectarea cu baculovirusuri. Tot odată nu au

fost observate deosebiri semnificative ale activității biologice nu se observă în cazul aplicării suspensiei virale cu aceeași concentrație am obținut eficacitate biologică se află în limitele 91,4%-100%. Rezultate îmbucurătoare au fost înregistrate la analiza timpului letal necesar pentru atingerea mortalității a 50% de larve (TL₅₀). Acest indiciu are valori minime în primele 5 zile de la infectare. Pe baza acestor studii în combaterea defoliatorului, a fost întocmită fișa tehnologică pentru prelucrarea cu preparatul viral Virin-ABB-3 (Tabelul 4.14).

Tabelul 4.14. Fișa tehnologică pentru combaterea *H. cunea* cu preparatul viral Virin-ABB-3 pe teritoriul Republicii Moldova

APRILIE			MAI			IUNIE			IULIE			AUGUST			SEPTEMBRI E			OCTOMBRI E		
Decada			Decada			Decada			Decada			Decada			Decada			Decada		
1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
P	P	P	P	P	P	P														
			A	A	A	A	A													
				O	O	O	O													
				L	L	L	L	L												
				DĂUNAREA																
				ABB-3																
				150 ML/ha																
				Temperatura																
				15 °C																
								P	P	P										
									A	A	A	A	A							
										O	O	O	O							
										L	L	L	L	L	L	L				
										DĂUNAREA										
										ABB-3										
										150 ML/ha										
										Temperatura										
										25 °C										
															P	P	P	P		

Notă: **P** - Pupă, **A** - Adult, **O** - Ou, **L** - Larvă

Reieșind din această constatare, biomasa obținută din larvele moarte după aceste zile se caracterizează prin indici specifici sușelor sălbatice, obținute din condiții naturale și acest fapt indică la deosebirea activității biologice a biomasei obținute din larvele moarte la diferite zile de la infectare și denotă posibilitatea aplicării acestei măsuri în procesele de ameliorare a sușelor de baculovirusuri aplicate pentru elaborarea insecticidelor virale. Pentru asigurarea eficacității înalte a preparatului este necesară întocmirea fișei tehnologice pentru depistarea timpurie a Omizii-păroase-a-dudului, lichidarea focarelor și prevenirea răspândirii, ceea ce permite soluționarea unor probleme ecologice.

În acest sens este rațională prognoza momentului copulării perechilor dăunătorului și administrarea mijloacelor de protecție împotriva omizii-păroase-a-dudului. La tăierea cuiburilor împăienjenite din coroana copacului înainte de acest termen, cuiburile eclozate cu întârziere nu vor fi observate și nu vor fi distruse.

Așadar, fișa tehnologică oferă posibilitatea de a folosi cele mai adecvate mijloace de protecție împotriva omizii-păroase-a-dudului, precum și de a efectua măsuri de combatere mecanică, tăierea cuiburilor, înaintea răspândirii larvelor de vârste mari. Utilizând acest calendar putem anticipa tratamentele de protecție, ceea ce permite nu numai de a pregăti din timp echipamentul necesar, dar și de a preveni populația locală.

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

Aplicarea pe scară largă a preparatelor baculovirale în combaterea insectelor dăunătoare este în dependență directă de progresul înregistrat în elaborarea metodelor de determinare a calității lor. Importanța investigațiilor în această direcție este dictată și de necesitatea perfecționării metodelor de titrare a baculovirusurilor, atât la diferite etape de producere a masei virotice, cât și la efectuarea diferitor operațiuni de inginerie genetică, în care baculovirusurile își găsesc o aplicare tot mai largă.

Deși au fost propuse un șir de metode de determinare a calității preparatelor baculovirale, totuși foarte des atât cercetătorii, cât și specialiștii implicați în producerea preparatelor baculovirale se confruntă cu lipsa metodelor-expres de determinare primară a calității, precum și a metodelor precise de apreciere a potențialului biologic al preparatelor baculovirotoice. În acest aspect au fost întreprinse acțiuni concrete de elaborare a metodelor de determinare a calității preparatelor baculovirotoice nu numai după numărul de poliedre, ci și după cantitatea de nucleocapsizi înglobați în structura lor.

Selectarea metodelor de determinare a calității preparatelor baculovirotoice se realizează în funcție de particularitățile morfologice ale virusurilor și de scopul urmărit. Pentru titrarea VPN pot fi aplicate metodele microscopiei fotonice, electronice și biochimice, iar pentru VG – doar metodele microscopiei electronice, biochimice și cele nefelometrice.

Determinarea titrului în camera Goreaiev. Folosind camera Goreaiev, a fost aplicată formula de determinare a concentrației:

$$T = \frac{\text{Suma poliedrelor în 100 pătrate mici} \cdot 4000000}{100} \cdot K, \text{ unde}$$

T – titrul poliedrelor exprimat în SPVC/ml,

K – gradul de diluție a suspensiei inițiale.

Pentru titrarea rapidă a VPN s-a elaborat o formulă simplă de determinare a concentrației baculovirusurilor. Pentru aceasta în camera Goreaiev se determină numărul de SPVC în 40 de pătrate mici. Titrul baculovirusurilor se determină după formula:

$$T = 10^5 * a * b, \text{ unde}$$

T – titrul suspensiei virale,

a – suma SPVC în 40 de pătrate mici,

b – gradul de diluție a suspensiei inițiale.

Formula prezentată permite de a determina rapid concentrația baculovirusurilor atât pentru aprecierea proceselor tehnologice de producere a masei biologice, cât și de determinare a titrului preparatelor baculovirotice.

Titarea baculovirusurilor în frotiuri colorate. Pentru păstrarea îndelungată a preparatelor microscopice este rațională fixarea și colorarea frotiurilor. Pentru aceasta preparatele microscopice pregătite și uscate la aer se fixează cu amestec de alcool cu formalină (90 ml alcool de 70% și 10 ml formalină de 40%). Determinarea titrului a fost efectuată după modificarea noastră a formulei Vinogradski-Șulghina-Brid.

$$T = \frac{4 \cdot 10^6 \cdot a \cdot K}{S \cdot 0,01}, \text{ unde}$$

T – titrul suspensiei virale,

a – numărul mediu de particule virale într-un pătrat a grilei oculare;

K – gradul de diluție a suspensiei inițiale;

S – suprafața pătratului grilei oculare la mărirea dată a obiectivului.

Determinarea concentrației granulelor cu ajutorul microscopiei electronice. 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 microscopice fotonice pentru titrarea lor a fost propusă aplicarea microscopiei electronice. Este necesar de menționat faptul că asupra rezultatelor influențează și tipul peliculelor de suport, precum și dimensiunile ecranului sau a plăcilor fotografice.

În acest scop a fost aplicată metoda de determinare a potențialului de infecție cu ajutorul microscopiei electronice. După un șir de calcule matematice devine posibilă determinarea numărului de nucleocapsizi înglobați în matricea proteică a poliedrilor. S-a constatat, că acest indice variază în funcție de specie de la 24 de nucleocapsizi (*Operophtera brumata*) până la 2520 (*Leucoma salicis*). Cercetările ulterioare au demonstrat că folosind această metodă se poate

de determinat nu numai potențialul de infecție a VPN, dar și procesul de identificare a baculovirusurilor [54, 4].

Avantajul al 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 nesemnificative (Figura 4.12, 4.13).

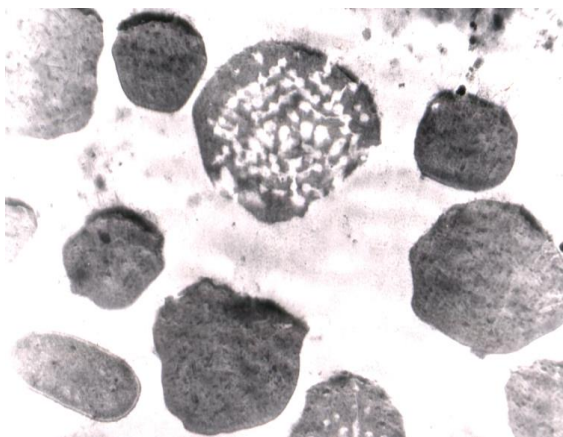


Fig. 4.12. Evidențierea potențialului de infecție a baculovirusurilor cu ajutorul microscopiei electronice. VPN a *H.cunea*, la care se înregistrează distrugerea nucleocapsizilor și supraviriocapsizilor

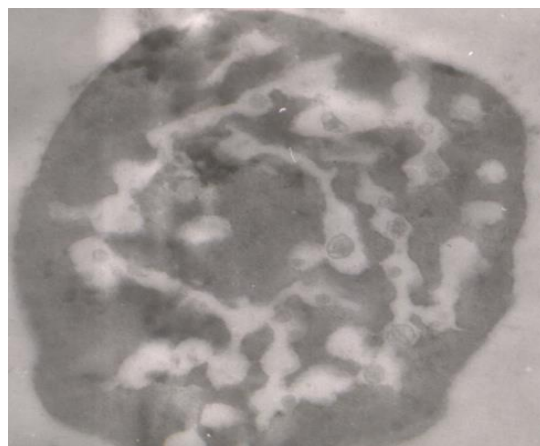


Fig. 4.13. Particularitățile ultrastructurale ale unui poliedru a VPN *H.cunea* din structura preparatului păstrat incorect iar la examinarea electrono-microscopică a unii nucleocapsizi lipsesc

Analiza ulterioară a secțiunilor ultrafine a demonstrat că deși titrul poliedrilor în preparat corespunde prevederilor standardului, totuși în componența lor nucleocapsizii lipsesc. Aceasta ne 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. La acțiunea condițiilor nefavorabile (fluctuarea nivelului termic și a umidității preparatului, prezența fermenților hidrolitici) pentru menținerea activității biologice a baculovirusurilor în structura elementelor genomice ale virusurilor și prezența unor goluri în locul supraviriocapsizilor înglobați în matricea poliedrilor Figura 4.2 suprapoliviriocapsizilor au fost relatate unele consecințe distructive, manifestate prin lipsa lor. Preparatele, la care au fost prezente asemenea schimbări structurale ale poliedrilor, se caracterizează printr-o activitate biologică scăzută în comparație cu preparatele păstrate în condiții optime.

4.5. Concluzii la capitolul 4

1. Au fost stabilite dimensiunile SVC (lungimea medie 398,2-414,5 nm și lățimea medie 293,4-339,5 nm), izolate din larvele de *H. cunea* infectate cu virusul granulozei din loturile preparatului viral obținute în anii 2008-2014. Acest fapt demonstrează că acestea sunt similare cu cele provenite din tulpina inițială. În preparatele analizate, pe lângă SVC-urile normale constituite s-au depistat și unele diferite ca formă și dimensiuni (SVC-uri mult mai lungi, altele de 2-5 ori mai mari decât cele normale, de formă neregulată).

2. A fost determinată eficacitatea biologică a preparatului asupra larvelor de *H. cunea* în câmp, sub izolator. S-a demonstrat că aceasta este mai mare (87,23%) la primele vârste, fapt ce are o importanță practică deosebită la aplicarea în condiții naturale a preparatului, asigurând o reducere eficientă a populațiilor dăunătorului înainte de producerea unor defolieri masive.

3. Rezultatele testărilor efectuate pe larvele de diferite vârste au indicat că larvele de vârstă avansate, chiar și la doza cea mai ridicată a preparatului (6×10^9 particule/g), mortalitatea de 92,6 % se atinge doar după 15 zile de la aplicarea tratamentelor, ceea ce determină necesitatea aplicării preparatului doar la vârste medii (L₂-L₄).

4. Rezultatele testărilor au demonstrat că cele mai eficiente modele de transmitere a infecției baculovirale sunt considerate cele complexe și este suficient să se creeze mai multe focare de infecție, care nu vor constitui doar sursa răspândirii epizootiei, dar vor contribui și la scăderea generală a viabilității populației dăunătorului.

5. A fost aplicată metoda de determinare a potențialului de infecție cu ajutorul microscopiei electronice, care a demonstrat că, deși titrul poliedrilor în preparat corespunde prevederilor standardului, totuși în componența lor nucleocapsizii lipsesc și doar aplicând metodele microscopiei electronice poate fi determinat potențialul de infecție a VPN exprimat prin numărul de nucleocapsizi într-o unitate de volum sau de masă virală.

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 [16, 18], (3.2).

2. 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 [17, 18], (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 [6, 7], (3.4, 3.5).

4. A fost modificată schema tehnologică existentă de obținere a preparatului baculoviral Virin-ABB-3, care este mai optimă în aplicare, iar preparatul obținut este mai eficient în diminuarea densității populației dăunătorului *H.cunea* [14, 186], (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 [12], (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% de 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 [9, 10], (4.1).

7. A fost optimizată tehnologia de producere a larvelor *H.cunea* prin aplicarea metodei influenței selective la diferite niveluri spațiale asupra indicilor biologici a descendenților, care contribuie la selectarea unor indivizi mai viabili și productivi pentru obținerea materialului calitativ de reproducere [9, 13, 14], (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 apreciere a calității preparatului viral [13, 15], (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%-92,0% [15, 186, 195, 196]. [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 se recomandă 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} particule/g. Eficacitatea biologică a preparatului baculoviral Virin-ABB-3 pentru diminuarea populației de *H. cunea* se află în limitele de 84,0%-91,8% . Se efectuează 1-2 tratamente împotriva dăunătorului în perioada de vegetație.

BIBLIOGRAFIE

În limba română:

1. BERATLIEF, C. ș. a. Activitatea sezonieră a adulților de *Hyphantria cunea* Drury (Lepidoptera: Arctiidae). În: *Analele ICDPP*, 2005, vol. 12, pp. 217-227. ISBN 978-973-668-413-5.
2. 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.
3. CIUHRIL, M., ARMENESCU-CIUHRIL, E. *Virusul spaimă și speranța omenirii*. București: Mirabilis, 2008. 248 p. ISBN 978-973-85972-2-8.
4. STÎNGACI, A. Virin-ABB-3 o pârghie eficientă a agriculturii ecologice. Simpozionul științific internațional 40 ani „Protecția Plantelor Realizări și Perspective”. Информационный бюллетень ВПРС МОББ. nr.40, Chișinău. 2009, p. 155-157. ISBN 978-9975-106-44-3.
5. STÎNGACI, A. Virin-ABB-3 – o pârghie eficientă a agriculturii ecologice. In: *Universitatea de Stat din Moldova*, Editure Studia Universitas Moldaviae, Chisinau, 2010, nr. 6 (36), pp. 82-86. ISSN 1857-1735.
6. 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 Moldaviae, Chisinau, 2010, nr. 6 (36), pp. 87-93. ISSN 1857-1735.
7. STÎNGA, A. Influența factorului trofic asupra Omizii-păroase-a-dudului (*Hyphantria cunea* Drury) și controlul biologic al acestui dăunător. În: *Protecția plantelor – probleme și perspective. Materialele simpozionului științific intern., 30-31 octombrie, 2012*. Chișinău, 2012, pp. 509-513. ISBN 978-9975-56-069-6.
8. STÎNGACI, A. Virin ABB-3 mijloc ecologic și eficient împotriva Omizii-păroase-a-dudului (*Hyphantria cunea* Drury). În: *Protecția plantelor-probleme și perspective. Materialele simpozionului științific internațional, 30-31 octombrie, 2012*. Chișinău, 2012, pp. 506-509. ISBN 978-9975-56-069-6.
9. STÎNGACI, A. Procedeele biotehnologice de producere a preparatelor virale pentru combaterea defoliatorului *H. cunea*. În: *Studia Universitatis Moldaviae*, Chișinău, 2013, nr. 6 (66), pp. 98-104. ISSN 1814-3237.

10. **STÎNGACI, A.** Bioinsectecidele pentru combaterea lepidopterului *H. cunea*. În: *Culegere de lucrări științifice ale simpozionului internațional „100 ani M.Sidorov”*. Chisinau: Universitatea Agrară de Stat din Moldova, 2014, vol. 41, pp. 222-226. ISBN 978-9975-64-125-7.
11. **STÎNGACI, A., VOLOȘCIUC, L., ZAVTONI, P.** Utilizarea biopesticidului Virin-ABB-3 în ecosistemele forestiere în controlul speciei *Hyphantria cunea* Drury. În: *Probleme ecologice și geografice în contextul dezvoltării durabile a Republicii Moldova: Realizări și perspective. Materialele conferinței științifice cu participare internațională consacrată aniversării a 150 ani de la apariția ecologiei ca știință, a 70 ani de la fondarea primelor instituții științifice academice și 20 ani de la înființarea USPEE „C. Stere”, 14-15 septembrie 2016, Chișinău, 2016*, pp 262-265. ISBN 978-9975-9611-3-4.
12. **STINGACI, A.,** CHIUHRIL, 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.
13. **STINGACI, A.,** CHIUHRIL, 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.
14. **STÎNGACI, A.,** CHIUHRIL, M. Evaluarea estimării eficacității insecticide a baculovirusului în combaterea Omizii-păroase-a-dudului. În: *Agricultura durabilă în Republica Moldova: Provocări și perspective. Materialele conferinței științifice internaționale, 22 iunie. Bălți: Indigo Color, 2017*, pp. 352-356 ISBN 978-9975-3156-2-3.
15. **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.
16. **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.
17. **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 978-9975-64-296-5.
 18. **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*, Chișinău, 2018, pp. 633-637. ISBN 978-9975-64-296-5. (p. 180-186).
 19. VOLOȘCIUC, L.T. *Bazele teoretico-metodologice ale biotehnologiei producerii aplicării preparatelor baculovirotice în protecția plantelor*: aut. tz. de doc. hab. în științe biologice. Chișinău, 2000. 40 p.
 20. VOLOȘCIUC, L.T. *Probleme ecologice în agricultură*. În: Chișinău: Bons Offices, 2009. 264 p. ISBN 978-9975-9774-5-6.
 21. VOLOȘCIUC, L.T. Problemele identificării și ameliorării baculovirusurilor. În: *Buletinul AȘM, Științele vieții*, Chișinău, 2010, nr.1 (310), pp. 96-106. ISSN 1857-064X.
 22. VOLOȘCIUC, L.T. Agricultura ecologică. Problemele identificării și ameliorării baculovirusurilor. În: *Akados, Revistă de Știință, Inovare, Cultură și Artă*, Chișinău, 2010, vol. 1, nr. 31, pp. 96-106. ISSN 1857-0461.
 23. VOLOȘCIUC, L., ZAVTONI, P., **STÎNGACI, A.**, MAGHER, M., BUȘMACHIU, G., NISTREANU, V., PASCARI, A., CALDARI, V., VOLOȘCIUC, E. In: *Biogeocoenotic approaches to promote biological protection of plants in Mircea Ciuhrii reserches. International simpoziu „Actual problems of zoology and parasitology: achievements and 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*, Chișinău, 13 octombrie 2017, pp. 63-73. ISBN 978-9975-66-590.
 24. VOLOȘCIUC, L.T, JOSU, V. Conceptul de agricultură ecologică-suport al agriculturii durabile în Republica Moldova În: *Noosfera*, 2016, nr. 17, pp. 89-98.
 25. 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.

În limba rusă:

26. ГАР, К.А. *Методы испытания токсичности и эффективности инсектицидов* / под ред. Э.Э. Савдарга. В: Москва: С/х лит., журн. и плакатов, 1963. 288 с.
27. ГНИНЕНКО, Ю.И. Массовые размножения инвазивных насекомых в лесу. В: *Известия Санкт-Петербургской лесотехнической академии*, Санкт Петербург. 2011, пр. 196, с. 209-216. ISSN-2079-4304.
28. ГНИНЕНКО Ю.И. Новые инвазивные вредители леса в России, проникшие в леса в начале XXI века. В: *Лесной вестник*, Москва. 2011, пр. 4, с. 74-77. ISSN- 2542-1468.
29. ГОЛЬДИН, Е.Б. Американская белая бабочка в Крыму: реальность угрозы и пути ее устранения. В: *VIII з'їзд ГО "Українське ентомологічне товариство"*. Симферополь. 2014, с. 36-37. ISSN 2309-7663.
30. ДОСПЕХОВ, Б.А. *Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований)*. Москва: Агропромиздат, 1985. 351 с.
31. ЗАВТОНИ П., ВОЛОЩУК, Л.Ф., ПЫНЗАРУ, Б.В., **СТЫНГАЧ, А.Н.** Бакуловирусные препараты – эффективные средства биологической защиты растений. Экологическая безопасность защиты растений. В: *Environmental Safety of Plant Protection*. Материалы междунар. науч.конф., посвящ. 105-летию со дня рожд. чл.-корр. А. Л. Амбросова и 80-летию со дня рожд. акад. В. Ф. Самарсова, 24-26 июля 2017. Минск: Беларуская навука, с. 215- 219. ISBN 978-985-08-2164-5.
32. ИЖЕВСКИЙ, С.С. О возможности вывода Американской белой бабочки *Hyphantria cunea* Drury (Lepidoptera: Arctiidae) из числа карантинных объектов в Казахстане. В: *Защита и карантин растений*, Москва, 2008, пр. 12. С. 14-17. ISSN 1026-8634.
33. ИСИН, М.М., ШАНИМОВ, Х.И., КОПЖАСАРОВ, Б.К. Американская белая бабочка в Казахстане. В: *Защита и карантин растений*, Москва, 2008, пр. 9, с. 39. ISSN 1026-8634.
34. КЛЕЧКОВСКИЙ, Ю.Е., ЧЕРНЕЙ Л.Б. *Защита садов от американской белой бабочки: методические рекомендации*. Киев, 2011. 16 с.
35. КОБЗАРЬ, М.И. Биологический метод борьбы с Американской белой бабочкой (*Hyphantria cunea* Dr.) в лесах Кабардино-Балкарии. Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем. В: *Всероссийский науч.-исслед. ин-т биологической защиты растений*. Краснодар, 2008, вып. 5, с. 493-494. ISBN 978-5-91131-679-2.

36. КОПЖАСАРОВ, Б.К. *Биологические особенности Американской белой бабочки (Hyphantria cunea) на юго-востоке Казахстана и разработка защитных мероприятий против нее*. Автореф. дисс. на соиск. уч. степ. канд. биол. наук. Алма-Ата, 2007. 21 с.
37. КРИВОШЕЕВ, С.П. Американская белая бабочка на Украине. В: *Защита и карантин растений*, Москва, 2009, пр. 5, с. 36-38. ISSN 1026-8634.
38. КУЗНЕЦОВА, Л.Н. Оценка лепидоцидной активности биологических препаратов на основе штаммов *Bacillus thuringiensis*. В: *Технология пищевой и перерабатывающей промышленности апк – продукты здорового питания*, Воронеж, 2014, пр. 4, с. 82-87. ISSN 2311-6447.
39. КАНДЫБИН, Н. В. *Микробиологический контроль численности насекомых и его доминанта Bacillus thuringiensis*. В: Санкт-Петербург, Пушкин, 2009. 244 с. ISBN 978-9975-4126-1-2.
40. КУЛИЕВА, Х.Ф. Фотопериодические особенности летней диапаузы у апшеронской популяции Американской белой бабочки (*Hyphantria cunea* Drury.). В: *Вестник Бакинского Государственного Университет*, Баку, 2009, пр. 4, с. 70-78. ISSN 1997-292X.
41. МАСЛЯКОВ, В.Ю., ИЖЕВСКИЙ, С.С. *Инвазии растительноядных насекомых в европейскую часть России*. В: Москва: ИГРАН, 2011. 289 с. ISSN 1996–1499.
42. МАРКИНА, Т. Ю. Интенсивность проявления таксисов и жизнеспособность насекомых: общебиологические закономерности. В: *Известия Харьковского энтомологического общества*, Харьков, 2010, Т. XVIII, Вып. 2, с. 66-71. ISSN 1726–8028.
43. ОСТАПЕНКО, Л. Н. Отбор высокожизнеспособных гусениц тутового шелкопряда *Bombyx mori* L. (Lepidoptera, Bombycidae) по реакции хемотаксиса / Л. Н. Остапенко, А. З. Злотин. В: *Известия Харьковского энтомологического общества*, 2000, Т. 8, вып. 2, с. 171-173. ISSN 1726–8028.
44. СИКУРА, А.И., КРАСНИЦКАЯ, Р.С. Репродукция вируса гранулеза американской белой бабочки. В: *Вопросы биологической защиты растений*. М., 1972, с. 123-127.
45. СТЫНГАЧ, А. *Биологический препарат ВИРИН-АББ-3 эффективное средство против Американской белой бабочки (Hyphantria cunea Drury) для сохранения биоразнообразия*. В: *Зоологические чтения 2012. Материалы республиканской науч. практ. конф., посвящ. 250-летию проф. С.Б. Юндзилла (1761-1847)*, 2-4 марта 2012 г. Гродно, 2012, с. 147-149. ISBN 978-985-496-948-0.

46. **СТЫНГАЧ, А.Н., ВОЛОЩУК Л.Ф.** *Биологический препарат ВИРИН-АББ-3 – эффективное средство против Американской белой бабочки (*Hyphantria cunea* Drury).* В: Биологическая защита растений на путях инноваций. Матер. Междунар. науч.-практ. симп. Черновцы-Бояны: ВПРС МОББ, 2012, пр.43, с. 92-95. ISBN-978-617-652-037.
47. **СТЫНГАЧ, А.Н.** *Использование энтомопатогенного бакуловирусного препарата для биологического контроля вредителя в Республике Молдова.* Использование энтомопатогенного бакуловирусного препарата для биологического контроля вредителя в Республике Молдова. В: Аграрная наука. Материалы международной научно-практической конференции, Международной научно-практической конференции «Иммунитет растений к инфекционным заболеваниям», посвященной 100-летию монографии Н.И. Вавилова 25-28 июня 2019 г, с. 142-145. ISSN 0869-8155. с. 142-145. ISSN 0869-8155.
48. **СТАРЕЦ, В.А.** *Биология Американской белой бабочки и меры борьбы с ней (обзор).* Кишинёв: Штиинца, 1968. 40 с.
49. **ЧУРАЕВ, И.А.** *Американская белая бабочка.* Изд-во сельхоз. литературы, журналов и плакатов, Москва, 1962. 102 с.
50. **ЧУХРИЙ, М.Г., КИТИК, В.С., ВОЛОЩУК, Л.Ф.** *Вирусные препараты: их производство и применение для защиты растений.* Кишинев: МолдНИИНТИ, 1990.36 с
51. **ЧУХРИЙ, М.Г.** *Биология бакуловирозов и вирусов цитоплазматического полиедроза.* Кишинёв: Штиинца, 1988. 237 с.
52. **ЧУХРИЙ, М.Г.** Электронно-микроскопическое изучение супервириокапсидов вирусов ядерного и цитоплазматического полиедрозов некоторых вредных насекомых. В: Доклады ВАСХНИЛ, 1977, с. 15-19.
53. **ЧУХРИЙ, М.Г., ВОЛОЩУК, Л.Ф.** Разработка метода определения инфекционного потенциала у вирусов ядерного полиедроза. В: *Первый болгаро-советский симпозиум по микробным пестицидам.* Пловдив, 1988, с. 123.
54. **ЧУХРИЙ, М.Г., ЩЕГЕЛЬСКАЯ, Е.А., ВОЛОЩУК, Л.Ф.** Активность бакуловирозов, выделенных из разных популяций Американской белой бабочки. В: *Микробиология в сельском хозяйстве.* Кишинёв: Штиинца, 1991, с. 97.
55. **ЧУХРИЙ, М.Г., ВОЛОЩУК Л.Ф.** Регуляция численности популяций вредных насекомых путем применения вирусных инсектицидов. В: *Микробиология в сельском хозяйстве. Тезисы республ. конф., Кишинев, 1991, с. 76.*

56. ЧУХРИЙ, М.Г., ВОЛОЩУК, Л.Ф., НЕЩАРЕТ, А.С. Сохранение активности Вирина АББ-3 на растениях. В: *Проблемы сохранения и применения микробиологических средств защиты растений*. Часть II. 1989, с. 193.
57. ШАМИЛОВ, А.С. *Американская белая бабочка и система защитных мероприятий в очагах ее массового размножения*. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Москва, 2011. 22 с.

În limba engleză:

58. 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.
59. ADAMS, M.J., et al. 50 years of the International Committee on Taxonomy of Viruses: progress and prospects. In: *Archives Virology*, Springer Science, 2017, vol. 162, pp. 1441–1446. ISSN 0304-8608.
60. AIRENNE, K. J., MAKONEN, K. E, MÄHÖNEN, A. J., HERTTUALA, S.Y. In vivo application and tracking of baculovirus. In: *Current Gene Therapy*, 2010, vol. 10, pp. 1-8. ISSN 1566-5232.
61. 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>.
62. AJAMHASSANI, M., et.al. Immunological responses of *Hyphantria cunea* (Drury) (Lepidoptera: Arctiidae) to entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* (bals.-criy) and *Isaria farinosae* (holmsk.) fr. In: *Journal of Plant Protection Research, Elsevier*, 2013, vol. 53, nr. 2, pp. 110-118. ISSN 1899-007X(online).
63. AUCOIN, M.G., MENA, J.A., KAMEN, A.A. Bioprocessing of baculovirus vectors: a review. In: *Current Gene Therapy*, 2010, vol. 10, pp. 174-186. ISSN 1566-5232.
64. BYERS, N.M., VANDERGAAS, R.L., FRIESEN, P.D. Baculovirus Inhibitor-of-Apoptosis Op-IAP3 Blocks Apoptosis by Interaction with and Stabilization of a Host Insect Cellular IAP. In: *Journal of Virology, American society for microbiology*, 2015, vol. 90, pp. 533-544. ISSN 0022-538X,
65. BAO Y., et.al. Encyclopedia of Virology. In: Boston, Elsevier, 2008, pp. 342–348. ISBN-10: 0122270304.

66. BALE J.S., et al. The state of commercial augmentative biological control: plenty of natural enemies, but a frustrating lack of uptake. In: *Biocontrol, Springer Netherlands*, 2012, vol. 57, nr. 1, pp. 1 - 20. ISSN 1573-8248.
67. BEAS-CATENA, A. Baculovirus biopesticides: an overview. In: *Journal Animal Plant Science*, 2014, vol. 24, nr. 2, pp. 362 - 373. ISSN 2071 – 7024.
68. BEAS-CATENA, A et al. The effect of spent medium recycle on cell proliferation, metabolism and baculovirus production by the lepidopteran Se301 cell line infected at very low MOI. In: *Journal Microbiology Biotechnology*, 2013, vol.23, nr. 12, pp. 1747-1756. ISBN 978-3-318-02454-8.
69. BECKAGE, N.E., DREZEN, J.M. Polydnviruses as Endocrine Regulators. In: *Parasitoid Viruses*, London: Editura Academic Press, UK, 2012, pp. 163-168. ISBN 9780123848581.
70. *Biopesticides Market by Active Ingredient (Microbials & Biorationals), by Types (Bioinsecticides, Biofungicides, Bionematicides & Bioherbicides), by Application, by Formulation, by Crop Type & by Geography - Global trends & forecasts to 2019*. In: *Markets and Markets Inc.*, 2015 [citat 21.08.2018]. Disponibil: <http://www.marketreportshub.com>.
71. BOCAROV-STANCIC, A., VUKOVIC, S., SLAVIC D., GOLOSIN, B. Biološki insekticidi u proizvodnji zdravstveno bezbedne hrane Zdravstveno bezbedna hrana. In: *Novi Sad, Serbia*, 2002, nr. 1, pp. 353-358. ISBN 978-86-80417-15-8.
72. BRAUNAGEL, S.C., SUMMERS, M.D. Molecular biology of the baculovirus occlusion-derived virus envelope. In: *Current Drug Targets*, USA, 2008, vol. 8, p. 1084-1095. ISSN (Print): 1389-4501, ISSN (Online): 1873-5592.
73. BRUDEA, V. ș.a. Efficacy of some biopesticides and plant secondary metabolites against fall webworm *Hyphantria cunea* Drury (F. Arctiidae-Lepidoptera) in the lab conditions. In: *Cercetări Agronomice în Moldova*, Chișinău, 2012. vol. XLV, nr. 1, pp. 149. ISBN 978-9975-79-801-3.
74. BRYONY, C., BONNING, N., ARDANI, T. Introduction to the Use of Baculoviruses as Biological Insecticides. Humana Press. In: *Methods in Molecular Biology*, Springer Nature Switzerland AG, 2007, vol. 388, pp. 359-366. ISSN 1064-3745.
75. BRAASCH, D. Zur Überwinterungsmöglichkeit des Weißen Bärenspinners (*Hyphantria cunea* Drury), Arctiidae, Lepidoptera) in der Deutschen Demokratischen Republik. In: *Nachr.-Bl. Pflanzenschutz DDR*, 1976, vol. 30, nr. 11, pp. 223-225. ISBN-13: 978-3-930037-35-3 .

76. BUSZKO, J., NOWACKI, J. The Lepidoptera of Poland. A distributional checklist. In: *Polish Entomological Monographs*, Polskie Towarzystwo Entomologiczne, 2000, vol. 1, pp. 1-178. ISSN 1230-7777.
77. CORY, J. S., MYERS, J. H. Within and between population variation in disease resistance in cyclic populations of western tent caterpillars: a test of the disease defence hypothesis. In: *Journal Animal Ecology*, British Ecological Society, 2009, vol. 78, pp. 646–655. ISSN 1365-2656.
78. CORY, J. S. Insect virus transmission: different routes to persistence. In: *Current Opinion in Insect Science*, Elsevier, 2015, pp. 8130–8135. ISSN, 2214-5745.
79. CONTRERAS-GÓMEZ, A., et al. Protein production using the baculovirus-insect cell expression system. In: *Journal Overview. Biotechnology Progress.*, American Institute of Chemical Engineers, 2014, vol. 30, nr.1, pp. 1-18.
80. CPL Business Consultants. *The 2010 Worldwide Biopesticides Market Summary*, vol. 1, June 5, 2010 - Pub ID: BGEQ2703518. In: *Market Research.com*, Rockville, MD, USA.[citat 1.01. 2018] Disponibil: <https://www.intechopen.com/>
81. CHANDLER, D. The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. In: *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Biological Sciences, Series B*, 2011, vol. 366, pp. 1987-1998. ISSN 1471-2970
82. CHAO, CHEN, et al. *Diapause Induction and Termination in Hyphantria cunea (Drury) (Lepidoptera: Arctidae)*. In: *PLOS ONE*, 2014, vol. 9, nr. 5 [citat 30.05.2014]. ISSN: 1932-6203. Disponibil: www.plosone.org.
83. CHUKHRIL, M., VOLOSHCHUK, L., POPUSHOI, I. Identification of nuclear polyhedrosis viruses according to morphological parametrs. YI Intern. Colloquium on invertebrate pathology and microbial Control. In: *Montpellier*, 1994, v. 2, pp. 250.
84. CUDDLEFORD, V. Managing editor. Surveys gauge attitude of Canadian public.[online]. In: *Biocontrol Files*, Ed. Canada's Bulletin on Ecological Pest Management, 2006, vol. 5, [citat.23.07.2017]. Disponibil: <http://biocontrol.ca>.
85. DAVIDSON, E.W. Chapter 2 - History of Insect Pathology. In: *Vega, F.E., Kaya, H.K. (Eds.), Insect Pathology (Second Edition)*. Academic Press, San Diego, 2012, pp. 13-28. ISBN: 978-0-12-803527-6
86. DAWSON, J. R. Moths of interest from Cambridgeshire. In: *British Journal of Entomology and Natural History*, 2015, vol. 28, nr. 2, pp. 80-87. ISSN 0952-7583.
87. DAVID, I. et al. Principles of Epizootiology and Microbial Control. In: *Insect Pathology*, 2012, vol. 108, nr. 4, pp. 29-72. ISBN: 9780123849847.

88. DRUGMAND, J. C., SCHNEIDER, Y. J., AGATHOS, S. N. Insect cells as factories for biomanufacturing. In: *Biotechnology Advances, Elsevier*, 2011, vol. 30, p. 1140-1157. ISBN 978-0-19-928901-1.
89. DUFFY, S. T et. al. In vivo replication kinetics and transcription patterns of the nucleopolyhedrovirus (NeabNPV) of the balsam fir sawfly, *Neodiprion abietis*. In: *Journal of General Virology, University of Cambridge*, 2007, vol. 88, pp. 1945-1951. ISSN 0022-1317.
90. DU, JUAN, et. al. Optimization and Preliminary Application of SSR Analysis System in *Hyphantria cunea*. In: *Scientia Silvae Sinicae, Chinese Society of Forestry (CSF)*, 2010, vol. 46, nr. 3, pp. 173-177. ISSN 1001-7488.
91. DWIJENDA, S. *Advances in Plant Biopesticides*. Springer, India, 2014. 407 p. ISBN-13 978-8132220053.
92. EHLER, L.E., BOTTRELL, D.G. The illusion of Integrated Pest Management. In: *Issues in Science and Technology, University Texas at Dallas*, 2000, vol. 16, nr 3, pp. 61-64. ISBN 978-1-84826-912-5.
93. EL-SAYED, A.M., GIBB, A.R., SUCKLING, D.M. Chemistry of the sex pheromone gland of the fall webworm, *Hyphantria cunea*, discovered in New Zealand. In: *New Zealand plant protection*, 2005, vol. 58, pp. 31-36. ISBN 1-904375-16-2.
94. ELVIRA, S., WILLIAMS, T., CABALLERO, P. Juvenile hormone analog technology: effects on larval cannibalism and the production of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) nucleopolyhedrovirus. In: *Journal of Economic Entomology, Oxford Academic Journal*, 2010, vol. 103, pp. 577-582. ISSN 0250-541X.
95. EARP, L. J. The many mechanisms of viral membrane fusion proteins. In: *Current Topics Microbiology and Immunology, United States Federal Government*, 2005, vol. 285, pp. 25-66. ISSN 0070-217X.
96. ELIAS, C.B., JARDIN, B., KAMEN, A. Recombinant protein production in large-scale agitated bioreactors using the baculovirus expression vector system. In: *Methods in Molecular Biology, Springer*, 2007, vol. 388, pp. 225 – 245. ISBN 978-1-58829-537-8.
97. *Facts and figures on organic agriculture in the European Union. Comisia Europeană*, 2013. [citat22.04.2014].Disponibil:http://epp.eurostat.ec.europa.eu/portal/page/portal/statistics/search_database.
98. FIRIDIN, B, et.al. The effect of nutritional quality of some plant's leaf on the feeding and development of *Hyphantria cunea* (Drury) (Lepidoptera: Arctiidae). In: *International Journal of Natural and Engineering Sciences, Elsevier*, 2008, vol. 2, nr. 3, p. 61-68. ISSN: 2249-8958.

99. FAUQUET, C.M., FARGETTE, D. International Committee on Taxonomy of Viruses and the 3,142 unassigned species. In: *Virology Journal, University of California*, 2005, nr 2, pp. 64. ISSN 1743-422X.
100. FOKIN, A.V. American fall webworm as a pest... of bricks. In: *Zashchita i Karantin Rastenii*, 2008, nr. 9, pp. 41-42. ISSN 1026-8634.
101. FRIESEN, P.D. Insect Viruses. In: *Fields Virology 5th ed.*, D.M. Knipe and P.M. Howley (Eds.), Philadelphia, PA, USA, 2007, pp. 707-736. ISBN 0781760607.
102. GELERNTER W. D. Biological pest control: a realistic outlook. In: *Golf Course Management, Association of America (GCSAA)*, 2009, vol. 77, nr. 4, pp. 110-115.
103. GOLDSMITH, M. R., FRANTISEK, M. *Molecular Biology and Genetics of the Lepidoptera*. In: CRC Pres, Los Angeles, 2009. 368 p. ISBN 9781138111721.
104. GOMI, T., NAGASAKA, M., HIROCHIKA, M., HAGIHARA H. Effects of diet on life-history traits in a trivoltine Kobe population of *Hyphantria cunea* (Drury) (Lepidoptera: Arctiidae). In: *Applied Entomology and Zoology, Springer*, 2006, vol. 41, nr 2, p. 303-307. ISSN 0003-6862.
105. GOMI, T., et. al. Northerly shift in voltinism watershed in *Hyphantria cunea* (Drury) (Lepidoptera: Arctiidae) along the Japan Sea coast: Evidence of global warming?. In: *Applied Entomology and Zoology, Springer*, 2009, vol. 44, nr. 3, pp. 357-362. ISSN 0003-6862.
106. GRANADOS, R.R., et.al. Insect cell culture and biotechnology. In: *Virologica Sinica, Springer*, 2008, vol. 22, pp. 83-93. ISSN 1995-820X.
107. GRAHAM, M., NICHOLSON. Fighting the global pest problem: Preface to the special Toxicon issue on insecticidal toxins and their potential for insect pest control. In: *Journal Toxicon, Elsevier Ltd, London UK*, 2007, vol. 49, nr. 4, p. 413-422. ISSN 0041-0101.
108. GRAHAM, R. I., et. al. Wolbachia in a major African crop pest increases susceptibility to viral disease rather than protects. In: *Ecology Letters, French National Centre for Scientific Research*, 2012, vol. 15, p. 993-1000. ISSN 1461-0248.
109. GRAMKOW, A.W et al. Insecticidal activity of two proteases against *Spodoptera frugiperda* larvae infected with recombinant baculoviruses. In: *Virology Journal, Elsevier, UK*, vol. 7, pp. 143-147. ISSN 0042-6822.
110. GRZYWACZ, D., MOORE, D., RABINDRA, R.J. Mass production of entomopathogens in less industrialized countries. In: *Mass Production of Beneficial Organisms, Elsevier, Amsterdam*, 2014, pp. 519-553. ISBN: 978-0-12-803527-6.

111. GRZYWACZ, D. et al. The use of indigenous ecological resources for pest control in Africa. In: *Food Security*, 2014, vol. 6, nr.1. pp. 71-86. ISSN 1876-4517.
112. HAASE, S., SCIOCCO-CAP, A., ROMANOWSKI, V. Baculovirus Insecticides in Latin America: Historical Overview, Current Status and Future Perspectives. In: *Viruses*, Academic Editor: John Burand, 2015, vol. 7, pp. 2230-2267. ISSN 1999-4915.
113. HAJEK, A, SHAPIRO-ILAN, DAVID I. Ecology of Invertebrate Diseases. In: *Ecology letters*, John Wiley and Sons, 2017, pp. 215-258. ISBN-13: 978-1119256076.
114. HAUSCHILD, R., SPEISER, B., TAMM, L. Regulation according to EU Directive 91/414: Data requirements and procedure compared with regulation practice in other OECD countries. In: *Regulation of Biological Control Agents*, Ehlers, R.-U. (Editor). Springer Science-Business Media Dordrecht Heidelberg London, New York, 2011, p. 25-77. ISBN 978-94-007-0436-7.
115. HARRISON, R et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Baculoviridae. In: *Journal of General Virology*, 2018, vol.99, pp.1185–1186. ISSN 1465-2099.
116. HERNIOU, E.A. et al. Ancient coevolution of baculoviruses and their insect hosts. In: *Journal Virology*, Elsevier, UK, 2004, vol. 78, p. 3244-3251. ISSN 0042-6822.
117. HERNIOU, E. A., JEHLE, J. A. Baculovirus phylogeny and evolution. In: *Current Drug Targets*, Bentham Science Publishers, 2008, vol. 8, p. 1043-1050. ISSN 1389-4501.
118. HERRERA, C.M., PELLMYR, O. *Plant-animal interactions an evolutionary approach*. In: Blackwell Science Ltd., Oxford, United Kingdom book, 2002. 328 p. ISBN 0-85238-283-9.
119. HEWSON, I. Nucleopolyhedrovirus detection and distribution in terrestrial, freshwater, and marine habitats of Appledore Island, Gulf of Maine. In: *Microbial Ecology*, Springer US, 2011, vol. 62, pp. 48-57. ISSN 0095-3628.
120. HRUBIK, P. Alian insect pests on introduced woody plants in Slovakia. In: *Acta Entomologica Serbica*, 2007, vol. 12, nr. 1, pp. 81-85. ISSN 0374-1036.
121. HILL, A.S., KOVALEV, B.G., NICOLAEVA, L.N., ROELOFS, W.L. Sex pheromone of the fall webworm moth, *Hyphantria cunea*. In: *Journal of Chemical Ecology*, Springer US, 1989, vol. 8, nr. 2, pp. 383-396. ISSN: 0098-0331.
122. HOOVER, K., et al. Impact of viral enhancin genes on potency of *Lymantria dispar* multiple nucleopolyhedrovirus in *L. dispar* following disruption of the peritrophic matrix. In: *Journal of Invertebrate Pathology*, Elsevier Science Publishers, USA, 2010, vol. 104, p. 150-125. ISSN 0022-2011.
123. HUYNH, H. T. et al. Improving the robustness of a low-cost insect cell medium for baculovirus biopesticides production, via streamlining using a tube bioreactor-based

- statistical optimization routine. In: *Biotechnology Progress, Pittsburgh*, 2012, vol. 28, nr. 3, p. 788-802. ISSN 8756-7938.
124. ICTV Virus Taxonomy: 2013. [vizitat 21.09.2017] Disponibil: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>
 125. IKEDA, M., et al. Gene organization and complete sequence of the *Hyphantria cunea* nucleopolyhedrovirus genome. In: *Journal of General Virology, Microbiology Society, London*, 2006, vol. 87, pp. 2549-2562. ISSN 0022-1317.
 126. IAMANDEI, M., MANOLE, T., TEODORESCU, I. Evaluation of a Baculoviral Product Efficacy on Biological Control of *Hyphantria cunea* Drury (Lepidoptera: Arctiidae) in Romania. In: *Review Roumain de Biologie Animals*, București, 2004, vol. 49, nr. 1, pp. 41-46. ISSN 0377-8142.
 127. IGNOFFO, C.M. Environmental factors affecting persistence of entomopathogens. In: *Florida Entomology*, 1992, vol. 75, pp. 516-525. ISSN 1938-5102.
 128. ISIN, M., SHANIMOV, K., KOPZHASAROV, B. American fall webworm in Kazakhstan. In: *Zashchita i Karantin Rastenii*, 2008, nr. 9, pp. 39. [vizitat 21.08.2015]. ISSN 1026-8634, <http://www.z-i-k-r.ru>.
 129. JACKSON, D. M., et al. Efficacy of entomopathogenic viruses on pickleworm larvae and cell lines. In: *Journal Agriculture Urban Entomology, South Carolina Entomological Society*, 2008, vol. 25, nr. 2, pp. 81-97. ISSN 1523-5475.
 130. JAMES, S., LI, Z. Chapter 12 - From Silkworms to Bees: Diseases of Beneficial Insects. In: *Insect Pathology (Second Edition), Academic Press, San Diego*, 2012, pp. 425-459. ISBN 9780123849847.
 131. JANG, T., et al. Host-plant quality alters herbivore responses to temperature: a case study using the generalist *Hyphantria cunea*. In: *Entomologia Experimentalis et Applicata, The Netherlands Entomological Society*, 2015, vol. 154, nr. 2, pp. 120-130. ISSN 1570-7458.
 132. JEHLE, J. A., et al. Molecular identification and phylogenetic analysis of baculoviruses from Lepidoptera. In: *Journal Virology, Washington*, 2006, vol. 346, pp. 180-193. ISSN 2347-3584.
 133. JEYARANI, S., SATHIAH, N., KARUPPUCHAMY, P. An *in vitro* method for increasing UV-tolerance in a strain of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) nucleopolyhedrovirus. In: *Biocontrol Science and Technology, Boulder United States*, 2013, vol. 23, nr. 3, pp. 305-316. ISSN 0958-3157.

134. JURIC, M., et al. Potentially important insect pest of celtis Australis, in Slovenia, Croatia and Hungary. In: *Pregledni članci – Reviews Šumarski list*, 2016, vol. 11, nr. 12, pp. 577-588.
135. KABALUK, J.T., et al. The Use and Regulation of Micoarobial Pesticides in Representative Jurisdictions Worldwide. In: *IOBC Global*, 2010, 99 p. [citat 10.04.2017]. ISBN 92-9067-138-2, Disponibil: www.IOBC-Global.org.
136. KAMEN, A.A., et al. An initiative to manufacture and characterize baculovirus reference material. In: *Journal of Invertebrate Pathology, Elsevier, University of Illinois at Urbana-Champaign, USA*, 2011, vol. 107, pp. 113-117. ISSN 10960805.
137. KAMIYA, K., et. al. Genotypic variation of a wild isolate of *Hyphantria cunea* nucleopolyhedrovirus. In: *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, 2003, vol. 72, pp. 57-64. ISSN 1346-8073.
138. KE PENG, JAN, et al. Characterization of Novel Components of the Baculovirus *Per Os* Infectivity Factor Complex. In: *Journal Virology, Elsevier UK*, 2012, vol. 86, p. 4981-4988. ISSN 1386-6532.
139. KEAN, J.M., KUMARASHINGE, L.B. Predicting the seasonal phenology of fall webworm (*Hyphantria cunea*) in New Zealand. In: *New Zealand Plant Protection*, 2007, vol. 60, pp. 279-285. ISSN 11759003.
140. KEAN, et al. *Global Eradication and Response Database*, 2015, [citat 08.12.2017]. Disponibil: <http://b3.net.nz/gerda/index.php>.
141. KRIŠTÍN, A. Invázne živočíchy. In: *Život. Prostr, Poland*, 2001, vol. 35, nr. 2, pp. 68-72. ISSN 0548-7110.
142. KREHAN, H., STEYRER. Amerikanischer Webepar *Hyphantria cunea* im Burgenland. In: *Forstschutz Aktuell, Forest Protection, BFW, Vienna*, 2009, vol. 47, pp. 28-29. ISSN 1815-5103.
143. LACEY, L.A. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. In: *Journal of Invertebrate Pathology, Elsevier, UK*, 2015, vol. 132, pp. 1-41. ISSN 0022-2011.
144. LASA, R., ET. al. The attractiveness of phagostimulant formulations of a nucleopolyhedrovirus-based insecticide depends on prior insect diet. In: *Journal of Pest Science, Springer*, 2009, vol. 82, pp. 247-250. ISSN 1612-4758.
145. LASA, R., et. al Insecticidal properties and microbial contaminants in a *Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus (SeMNPV, Baculoviridae) formulation stored at different temperatures. In: *Journal of Economic Entomology, Entomological Society of America*, 2008 vol. 101, pp. 42-49. ISSN 0022-0493.

146. LACEY, L. A., HEADRICK, H. L., ARTHURS, S. P. Effect of temperature on long-term storage of codling moth granulovirus formulations. In: *Journal Economic Entomology*, 2008, vol. 101, pp. 288-294. ISSN 0022-0493.
147. LENG, P., ZHANG, P., ZHAO, M. Applications and development trends in biopesticides. In: *African Journal of. Biotechnology, Academic Journal, Delta State University Abraka*, Nigeria, 2011, vol.10, nr. 86, pp. 19864-19873. ISSN 1684-5315.
148. LETICIA F., et al. *The Baculoviral Genome, Viral Genomes - Molecular Structure, Diversity, Gene Expression Mechanisms and Host-Virus Interactions*. In: INTEH, Prof. Maria Garcia (Ed.), 2012, 302 p. [cititat 08.12.2017], <http://www.intechopen.com>
149. LEUSCHNER, R.G., et al. Qualified presumption of safety (QPS): a generic risk assessment approach for biological agents notified to the European Food Safety Authority (EFSA). In: *Trends in Food Science Technology*, Elsevier, UK, 2010, vol. 21, pp. 425-435. ISSN 0924-2244.
150. LOLADZE, Z.P., PARTSVANYA, M.S., LOBZHANIDZE, T.D. American white batterfly in the Republic of Georgia. In: *Zashicta I Karantin Rastenii*, Moscva, 2003, nr. 1, pp. 30-35. ISSN 1026-8634.
151. MARTÍNEZ, A. M., et al. Los baculovirus como bioinsecticidas: evaluación de un nucleopoliedrovirus para el combate de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) en México y Honduras. In: *Ciencia Nicolaita*, 2012, vol. 56, pp. 35-47. ISSN 1018-7081.
152. MOSCARDI, F., SANTOS, B. Produção comercial do nucleopoliedrovirus de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lep.: Noctuidae) emlaboratorio. In: *Proceedings of the IX Simposiade Controle Biologico, Recife*, Brasil, 15 a 19 de Maio, 2005, pp. 42-46. ISBN 1-56665-053-4.
153. MOJSCARDI, F., et al. Baculovirus pesticides: present state and future perspectives. In: *Microbes and Microbial Technology*, Springer, Dordrecht, 2011, pp. 415-445. ISSN 0095-3628.
154. MARRONE, P.G. Barriers to adoption of biological control agents and biological pesticides. In: *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 2007, vol. 2, nr. 051, pp. 1-12. ISSN 1749-8848.
155. MATTIAS, J., et al. Recent advances in conservation biological control of arthropods by arthropods. In: *Biological Control*, Elsever 2008, vol. 45, nr. 2, pp. 172-175. ISSN 1049-9644.
156. MCWILLIAM, A. *Environmental impact of baculoviruses*. In: FAO, 2008, R7299_FTR_anx3. [citat 05.09.2008]. Disponibil: http://www.fao.org/docs/eims/upload/agrotech/2003/R7299_FTR_anx3.pdf (visit23.04.201).

157. MAZZON, L., MARTINI, S. Fall Webworm *Hyphantria cunea* (Drury). In: *Sherwood Foreste ed Alberi Oggi, Milano*, 2000, vol. 6, nr. 11, pp. 27-28. ISBN 978-88-900865-5-7.
158. MIELE, S.A., et al. Baculovirus: molecular insights on their diversity and conservation. In: *International Journal of Evolutionary Biology Society for the Study of Evolution*, USA, 2011 [citat 11.03.] article ID 379424, 15 p. Disponibil: <http://dx.doi.org/10.4061/2011/379424>.
159. MOREAU, G., LUCAROTTI, C.J. A brief review of the past use of baculoviruses for the management of eruptive forest defoliators and recent developments on a sawfly virus in Canada. In: *The Forestry Chronicle, Institute of Forestry, Canada*, 2007, vol. 83, pp. 105-112. ISBN 978-1-100-10225-2.
160. MUNDARGI, R. Novel Sensor-Enabled Ex Vivo Bioreactor: A New Approach towards Physiological Parameters and Porcine Artery Viability. In: Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International Volume, 2015. Article ID 958170, 8 p. [citat 03.03.2019] Disponibil: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/958170>.
161. Natural Resources Canada. Fall Webworm. In: *Natural Resources Forest Health*, 2014. [citat 23.04.2017]. Disponibil: <http://tidcf.nrcan.gc.ca/en/insects/factsheet/8125>.
162. O'CALLAGHAN, M., BROWNBRIDGE, M. Environmental impacts of microbial control agents used for control of invasive pests. In: *Use of Microbes for Control and Eradication of Invasive Arthropods*, Springer, Dordrecht, The Netherlands, 2009, pp. 305-327. ISBN 978-1-4020-8559-8.
163. OSTRAUSKAS, H. Moths caught in pheromone traps during search for *Dendrolimus pini* and *D. sibiricus* (Lepidoptera, Lasiocampidae) in Lithuania. In: *Acta Zoologica Lituanica*, Vilnius, 2011, vol. 21, nr 3, pp. 238-243. ISBN 978-9955-28-826-8.
164. 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.
165. PLANT, C., SALE B. *Hyphantria cunea* exhibit. In: *British Journal of Entomology and Natural History*, Entomological and Natural History Society and incorporating its Proceedings and Transactions, 2015, vol. 28, nr. 2, pp. 82. ISSN 0952-7583.
166. PASSARELLI, A.L. Barriers to success: how baculovirus establish efficient systemic infections. In: *Journal of Virology*, Elsevier, Academic Press, 2011, vol. 411, pp. 383-392. ISSN 0042-6822.

167. PENG, K., et al. Baculovirus per os infectivity factors form a complex on the surface of occlusion-derived virus. In: *Journal of Virology*, Elsevier Academic Press, 2010, vol. 84, pp. 497-504. ISSN 0042-6822.
168. PEDRINI, M., et al. Importance of virusmedium interactions on the biological activity of wild-type Heliothine nucleopolyhedroviruses propagated via suspension insect cell cultures. In: *Journal Virology*, Methods Elsevier, Academic Press, 2006, vol. 136, pp. 267-272. ISSN 0042-6822.
169. PFLSCHG. Plant Protection Act of 6 February 2012, which was last amended by Article 4, paragraph 84 of the Act of 18 July 2016, pp. 1666 [citat 07.08. 2018] Disponibil: http://www.gesetze-im-internet.de/budessrecht/pflschg_2012/gesamt.pdf.
170. RANGA RAO, G.V., et al. Role of Nucleopolyhedroviruses (NPVs) in the Management of Lepidopteran Pests in Asia. In: *Springer International Publishing Switzerland*, Biocontrol of Lepidopteran Pests, Soil Biology, 2015, v. 43, pp. 11-52. ISSN 1613-3382.
171. RAVIV, M, ANTIGNUS, Y. UV radiation effects on pathogens and insect pests of greenhouse-grown crops. In: *Photochemistry Photobiology*, American Society of Photobiology, 2004, vol. 79, nr. 3, pp. 219-226. ISSN 0031-8655.
172. RAVENSBERG, W.J. Progress in Biological Control. A Roadmap to the Successful Development and Commercialization of Microbial Pest Control Products for the Control of Arthropods. In: *Springer Science*, Business Media, London, 2011, vol. 10, pp. 452-460. ISBN 978-94-007-0436-7.
173. RIPKA, G. Recent data to the knowledge of the phytophagous arthropod species of invasive tree and shrub species. In: *Novenyvedelem*, 2005, vol. 41, nr. 3, pp. 93-97. ISBN 978-0842523103. 9.
174. ROHRMANN, G. Baculovirus Molecular Biology. In: Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), NCBI 2008, pp. 165-167 (US), National Center for Biotechnology Information; 2013. [citat 15.11.2014] Disbonibil: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=bacvir>.
175. REID, S., CHAN, L., MONIQUE, M. VAN, OERS. Production of Entomopathogenic Viruses. In: *Mass Production of Beneficial Organisms*, Elsevier, Academic Press, 2014, pp. 437-482. ISBN 9780123914156.
176. SANDHU, H.S., WRATTEN, S.D., CULLEN, R. Field evaluation of ecosystem services in arable land. In: *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 2007, nr. 5, pp. 39-50. ISSN 0167-8809.

177. SCOTT, C. WEAVER. *Virus Evolution: Current Research and Future Directions*. In: Caister Academic Press, UK, 2016. 366 p. ISBN 978-1-910190-23-4.
178. SCHAECHTER, M. *Desk Encyclopedia of Microbiology*. 2nd Edition. In: Academic Press Amsterdam, Elseve, 2010. 1259 p. ISBN 9780080961286.
179. SIREESHA, K. et al. Effect of different storage conditions on the virulence of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus (HaNPV). In: *Journal of the Entomological Research Society*, Turkey, 2010, vol. 34, nr.1, pp. 65-69. ISSN 1302-0250.
180. SLACK, J., ARIF, B. The baculoviruses occlusion-derived virus: virion structure and function. In: *Advances in Virus Research*, Brazil, 2007, vol. 69, pp. 99-165. ISBN 978-0-12-373712-0.
181. SMITH, A. E., HELENIUS, A. How viruses enter animal cells. In: *Science*, Springer Nature, 2004, vol. 304, pp. 237-242. ISSN 1386-9620 (Print) 1572-9389 (Online).
182. SOURAKOV, A, THOMSON, P. Fall webworm *Hyphantria cunea* (Drury) (Insecta:Lepidoptera: Arctiidae: Arctiinae). In: *Entomology and Nematology Department*, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, 2011. [citat 11.05.2017]. Disponibil: <http://entomology.ifas.ufl.edu/creatures>.
183. SOWJANYA SREE, K., AJIT, V. *Biocontrol of Lepidopteran Pests: Use of Soil Microbes and their Metabolites*. In: Springer, Dordrecht, The Netherlands, 2015. 344 p. ISBN 978-3-319-14499-3.
184. SOSA-GÓMEZ, D. R. et al. Produção e uso de vírus para o controle de pragas na América Latina. In: *Controle Microbiano de Pragas na América Latina: abanicos e desafios*. FEALQ, Piracicaba, Brazil, 2008, pp. 49-68. ISSN 1999-491.
185. STINGACI, A., VOLOSCHYUK, L., ZAVTONY, P. Role of bioinsecticides in control of the *Hyphantria cunea* Drury to restore and construct stable natural and antropinated ecosystem the Republic of Moldova. In: Environmental Safety of Plant Protection. Материалы Междунар. науч.конф., посвящ. 105-летию со дня рожд. чл.-корр. А. Л. Амбросова и 80-летию со дня рожд. акад. В. Ф. Самерсова, Прилуки, 24–26 июля 2017 г. Минск. In: *Беларуская навука*, с. 280-285. ISBN 978-985-08-2164-5.
186. STINGACI, A., CHIUHRII, 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: Тенденции развития агрофизики: от актуальных проблем земледелия и растениеводства к технологиям будущего. Материалы Международной научной

- конференции, посвященной 85-летию Агрофизического НИИ, 27-29 сентября 2017. In: *СПб.: ФГБНУ АФИ*, 2017, с.103-107. ISBN 978-5-905200-34-2.
187. **STÎNGACI, A.** Possibilities of application bioinsecticides for biological control of Lepidoptera in agriculture and forestry. In: Proceedings of the III-th International Scientific Conference of Microbial Biotechnology, dedicated to the 70 th anniversary from the creation of the first research institutions and 55th of the inauguration and foundation of the Academy of sciences of Moldova. In: *Elan Poligraf*, Chisinau, 2016, pp. 157-160. ISBN 978-9975-3022-7-2.
 188. **STÎNGACI, A.** Baculovirus – based product for biological control of the species *Hyphantria cunea* Drury in the agricultural, ornamental and forest plantations. Sustainable use, protection of animal world and forest management in the context of climate change. The materials of IX-th Internat. Conference of Zoologists, dedicated to the 70th anniversary from the creation of the first research institutions and 55th of the inauguration and foundation of the Academy of sciences of Moldova. In: *Elan Poligraf*, Chişinău, 2016, pp.162-163. ISBN 978-9975-3022-7-2.
 189. **STINGACI A.N., VOLOŞCHIUC L.F.** Baculoviruses a sustainable way of pest control. B: *Состоянии и перспективы защиты растений*. Материалы Международной Научной конференции. Минск – Прилуки, 17-19 мая 2016, с. 299-300 ISBN978-985-6972-77-8.
 190. **STÎNGACI, A.** Biological activity of the baculovirus for control the Fall webworm moth (*Hyphantria cunea* Drury). In: Protecția plantelor – probleme și perspective. Materialele simpozionului științific internațional. In: *Chişinău: Информационный бюллетень ВПРС МОББ*, 47, 2015, pp. 282-286. ISBN 978-9975-56-111-2.
 191. **STINGACI, A.** Using virus to restore and construct stable forest ecosystem for control of the species *Hyphantria cunea* Drury. In: *Journal of Botany*, 2015, vol. VII, nr. 10, pp. 121-125. ISSN 1016–9652.
 192. **STINGACI, A., VOLOSCHIUC, L., ZAVTONY, P., CLINCIU RADU, R.A.** Using baculovirus to restore and construct stable natural and antropinated ecosystem for control of the *Hyphantria cunea* Drury. In: *Universitatea „Al. Ion Cuza” din Iași*, Editure “Ion Ionescu de la Brad” seria Agronomie Iasi, România, Iași, 2015, vol. 58, nr. 1, pp. 69-73. PRINT ISSN 1454-7414; ELECTRONIC ISSN 2069-6727.
 193. **STINGACI, A.** Improvng baculoviral preparation for control of the webworm moth (*Hyphantria cunea* Drury). Oltenia studii și comunicări științele naturii. In: *Oltenia Journal for Studies in Natural Sciences*, 2013, vol. 29, nr. 2, pp. 161-165. ISSN 1454-6914.

194. **STINGACI, A.** Ecological control of the webworm moth. (*Hyphantria cunea* Drury). B: *Информационный бюллетень ВПРС МОББ*, 2013. nr. 45, pp. 108-109 ISBN 978-966-2430-38-7.
195. **STINGACI, 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 Journal for Studies in Natural Sciences*, 2012, vol. VXXVIII, nr 2, pp. 93-98. ISSN 1454-6914.
196. **STINGACI, 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, România, Iași*, 2008, vol. 51, pp. 1187-1191. ISSN 1454-7376.
197. **STEINKRAUS, D.C.** Documentation of naturally occurring pathogens and their impact in agroecosystems. In: *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology: Application and Evaluation of Pathogens for Control of Insects and Other Invertebrate Pests*, second ed. Springer, Dordrecht, The Netherlands, 2007, pp. 267–281. ISBN 978-94-017-1547-8.
198. **SUN, X.** History and current status of development and use of viral insecticides in China. In: *Viruses*, 2015, vol. 7, pp. 306–319. ISSN 1999-4915.
199. **SULLIVAN, G.** Chalcidoid parasitoids of overwintered pupae of *Hyphantria cunea* Drury (Lep.:Arctidae) in hazelnut plantations of Turke's central Black Sea region. In: *Canadian Entomologist*, Entomological Society of Canada, Ottawa, Canada, 2011, vol. 143, nr. 4, pp. 411-414. ISSN 0008-347X.
200. **SZEWCZYK, B., et al.** Detection and identification of baculovirus pesticides by multi temperature single-strand conformational polymorphism. In: *Journal of Environmental Science and Health, Part B. Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, Bordeaux, France, 2008, nr. 43, pp. 539-545. ISSN 1532-4109.
201. **SZEWCZYK, B., et al.** Baculoviruses-re-emerging biopesticides. In: *Biotechnology Advances*, Elsevier Academic Press, 2009, vol. 24, pp. 143-160. ISSN 0734-9750.
202. **SZEWCZYK, B, et.al.** *Baculovirus Biopesticides*. In: *Pesticides - Formulations, Effects, Fate InTech*, 2011. 808 p. ISSN 1018-7081.
203. **TANG, R., MAO WEN, SU., ZHONG NING, YANG.** Electroantennogram responses of an invasive species fall webworm (*Hyphantria cunea*) to host volatile compounds. In: *Chinise Science Buletin*, Peking University, China, 2012, vol. 54, nr. 35, pp. 4560-4568. ISSN 1001-6538.
204. **TANG, R., JIN PING, ZHANG, ZHONG NING, ZHANG.** Electrophysiological and Behavioral Responses of MaleFall Webworm Moths (*Hyphantria cunea*) to Herbivory-

- Induced Mulberry (*Morus alba*). In: *Leaf Volatiles*, 2012, vol. 7, nr. 11 [citat 24.05.18]
Disponibil: <https://www.researchgate.net/.../233725532>.
205. THIEM, S.M., CHENG, X.W. Baculovirus host-range. In: *Virology Since*, 2009, vol. 24, pp. 436-457. ISBN 0 896 035611.
206. 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.
207. THEILMANN, D.A, et al. Family *Baculoviridae*. In: *Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee of Taxonomy of Viruses Elsevier Academic Press*, 2005, pp. 177-185.
208. THOMSON, D., JENKINS, J. Successes with area-wide mating disruption: moving from crisis management to sustainable pheromone-based pest management, 2014, In: *IOBC/WPRS Bull.* 99, pp. 9-11. Working Group “Pheromones and other semiochemicals in integrated production”, Bursa, Turkey, 01 – 05 October, 2012. ISBN 978-92-9067-279-1.
209. The World of Organic Agriculture. *Statistic trend, Fible & IFOAM*, 2015. 306 p. [citat 1.04.2017]. Disponibil: <http://www.organic-world.net/yearbook/yearbook2015.html>.
210. VAN BEEK, N., DAVIES, D.C. Baculovirus production in insect larvae. In: *Methods in Molecular Biology, Baculovirus and Insect Cell Expression Protocols. Humana Press*, Towata, USA, 2009, vol. 338, pp. 367-378. ISBN 978-1-59745-457-5.
211. VAN OERS, M.M. Opportunities and challenges for the baculovirus expression system. In: *Journal of Invertebrate Pathology*, Dorset, UK, 2011, vol. 107, pp. 3-15. ISSN 0022-2011.
212. VOLOȘCHIUC, L., ZAVTONI, P., STÎNGACI, A., MAGHE, R. M., BUȘMACHIU, G., NISTREANU, V., PASCARI, A., CALDARI, V., VOLOȘCHIUC, E. Biogeocoenotic approaches to promote biological protection of plants in Mircea Ciuhrii reserches. In: Actual problems of zoology and parasitology: achievements adn 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. In: *Elan Poligrag*, Chișinău, 13 octombrie 2017, pp. 63-73. ISBN 978-9975-66-590-2.
213. VIRTO, C., et. al. Gender-mediated differences in vertical transmission of a nucleopolyhedrovirus, 2013, PLoS ONE 8:e70932 [citat 08.03.2019]. Disponibil: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070932>.

214. VIRTO, C., et. al. The role of chemical and biological stress factors on the activation of nucleopolyhedrovirus infections in covertly infected *Spodoptera exigua* larvae. In: *Journal Applied Entomology*, Springer Nature, 2017, vol. 141, pp. 384-392. ISSN 1347-605X.
215. WAGNER, D.L. *Caterpillars of Eastern North America. A guide to Identification and natural history*. In: Princeton University Press, Princeton, NJ, 2010, 513 p. ISBN 9781400834143.
216. WOOLHOUSE, M.E., et al. Biological and biomedical implications of the co-evolution of pathogens and their hosts. In: *Nature Genetics*, New York, USA, 2002, vol. 32, pp. 569-577.
217. 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>.
218. WILLER, H., KILCHER, L (eds.). *The World of Organic Agriculture – Statistics and Emerging Trends 2012*. In: Research Institute of Organic Agriculture (FiBL), Frick, and International Federation of Organic Agriculture Movements (IFOAM), 2012, vol. 20, 340 pp. ISBN 978-3-944372-00-6.
219. WILLIAMS, T., et. al. Biological Pest Control in Mexico. In: *Annual Review of Entomology*, Palo Alto, California, 2013, vol. 58, pp. 119-140. ISSN 1545-4487.
220. WILLIAMS, T., et. al. Covert Infection of Insects by Baculoviruses. In: *Frontiers in Microbiology*, Tokushima University, Japan, 2017, vol. 8, pp. 1337-1342. ISSN 1664-302X.
221. WILLIAMS, P. D. New insights into virulence evolution in multigroup hosts. In: *Amazon Natura*, 2012, vol. 179, pp. 228-239.
222. WITTENBERG, R. *An inventory of alien species and their threat to biodiversity and economy in Switzerland*. In: CABI Bioscience Switzerland Centre report to the Swiss Agency for Environment, Forests and Landscape, 2005, 416 p. [citat 12.03.2018]. Disponibil: https://www.nobanis.org/files/invasives_inch.pdf.
223. WON IL, HEO, et. al. Hyphantria cunea Nucleopolyhedrovirus, a Novel Baculovirus Isolated from Fall Webworm in Korea. In: *International Journal of Industrial Entomology*, Korean Society of Sericultural Science, 2011, vol. 22, nr. 2, pp. 75-82. ISSN 1598-3579.
224. YAO, L., et. al. The *Heliothis armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus envelope protein P74 is required for infection of the host midgut. In: *Virus Research*, Elsevier Academic Press, 2004, vol. 104, pp. 111-121. ISSN 0065-3527.

225. YAMANAKA, T., et al. Adaptation to the new land or effect of global warming? An age-structured model for rapid voltinism change in an alien lepidopteran pest. In: *Journal of Animal Ecology*, UK, 2008, vol. 77, nr. 3, pp. 585-596. ISSN 0021-8790.
226. ZÚBRIK, M., et al. Invasive and quarantine pests in forests in Slovakia. In: *OEPP/EPPO Bulletin*, Slovakia 2006, vol. 36, pp. 402-408. ISSN 0250-8052.
227. ZAMORA-AVILIS, N. et al. Effects of a nucleopolyhedrovirus in mixtures with azadirachtin on *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae and viral occlusion body production. In: *Biocontrol Science and Technology*, Elsevier, Academic Press, 2013, vol. 23, pp. 521-534. ISSN 0958-3157.
228. ZHENG, G.L., et al. Mass production of *Hyphantria cunea* nucleopolyhedrovirus isolated in Qingdao (in Chinese). In: *Forest Pest Diseases*, University of California, Berkeley, 2011, vol. 30, pp. 36-38. ISBN: 978-3-319-24742-7
229. ZHAO, H.Y., et al. Field efficacy test of *Hyphantria cunea* nucleopolyhedrovirus against larvae of *Hyphantria cunea* (in Chinese). In: *Forest Pest Diseases*, University of California, Berkeley, 2012, vol. 31, pp. 38-39. ISBN 978-3-319-24742-7.
230. ZAVTONY, P., VOLOSCHIUC, L., STÎNGACI, A., CLINCIU RADU, ROXANA ALEXANDRINA. Baculoviruses in noctuids combatting in organic farming. In: Universitatea „Al. I. Cuza” din Iași, Editura „Ion Ionescu de la Brad”, seria Agronomie Iași, 2015, vol. 58, nr.1, pp. 79-82. PRINT ISSN: 1454-7414; ELECTRONIC ISSN 2069-6727.

ANEXE

ANEXA 1

Tabelul A 1.1. Spectrul culturilor atacate de *H. cunea* în diferite țări.

Nr	Țara	Număr specii	Speciile preferate, Suprafața de răspândire	Autori, ani
America de Nord				
1.	Canada	435	arbori ornamentali, forestieri și pomi fructiferi, cu excepția coniferelor	Humphreys, 1983, Gomi, 2007
2.	Mexica	450	arbori ornamentali, forestieri și pomi fructiferi, cu excepția coniferelor	Humphreys, 1983
3.	SUA	120	arbori ornamentali, forestieri și pomi fructiferi cu excepția coniferelor	Douce 2003, Wagner 2005
Europa				
4.	Austria	220	arbori ornamentali, forestieri și pomi fructiferi 2530 ha	Boehm, 1976; Smith et al., 1992
5.	Bulgaria	220	arbori ornamentali, forestieri și pomi fructiferi	Encheva, 1977; Smith et al., 1992; Tschorsnig, Herting, 1994
6.	Serbia și Muntenegru	220	arbori ornamentali, forestieri și pomi fructiferi	Miklos, 1987
7.	Croația	200	arbori ornamentali, forestieri și pomi fructiferi	Zúbrik et al., 2006
8.	Grecia	200	arbori ornamentali, forestieri și pomi fructiferi	Avtzis, 2001.
9.	Franța	200	arbori ornamentali, forestieri și pomi fructiferi	Jermini et al., 1995
10.	Germania	200	arbori ornamentali, forestieri și pomi fructiferi	Smith et al., 1992, Larsen, 1995; Jermini et al., 1996
11.	Italia	150	arbori ornamentali, forestieri și pomi fructiferi	Jermini, 1995; Marchesini, Tosi, Galbero, 1998; Mazzon et Martini, 2000
12.	Polonia	250	arbori ornamentali, forestieri și pomi fructiferi	Buszko, Nowacki, 2000
13.	Ungaria	103	arbori ornamentali, forestieri și pomi fructiferi	Zúbrik et al., 2006
14.	Slovenia	85	arbori ornamentali, forestieri și pomi fructiferi	Jasie, 1964; Hrubik, 2007
15.	Moldova	250	arbori ornamentali, forestieri și pomi fructiferi (dudul, frasinul, arțarul, plopul, salcia, socul, mărul, gutuiul, cireșul, prunul, nukul, vița de vie etc.)	Ciuraev, 1962; Stareț, 1968; Stingaci, 2012
16.	Romania	600	arbori ornamentali, forestieri și pomi fructiferi (dudul, frasinul, arțarul,	Smith et al., 1992; Iamandei et al., 2004;

			plopul, salcia, socul, mărul, gutuiul, cireșul, vișinul, prunul, nucul,vița de vie,trandafirul, ulmul, etc.)1600 ha	Wittenberg, 2005
17.	Rusia	270	arbori ornamentali, forestieri și pomi fructiferi	И жевский, 2002, 2003; Vasyutin, 2000, 2003
18.	Ucraina	300	arbori ornamentali, forestieri și pomi fructiferi (dudul, frasinul, arțarul, plopul, salcia, socul, mărul, gutuiul, cireșul, vișinul, prunul, nucul,vița de vie,trandafirul, ulmul, etc.) 67,5 mii ha.	Stareț, 1968; Чупаев, 1953; Sicura, 2005
19.	Lituania	220	arbori ornamentali, forestieri și pomi fructiferi	Ivinsic <i>et al.</i> ,1988
Asia				
20.	China	335	arbori ornamentali, forestieri și pomi fructiferi. Alte culturi care pot fi atacate; viță-de-vie, porumbul sau soia . 300000 ha, mai mult de 50000 de copaci atacați, (<i>Zea mays</i> L.) cotton (<i>Gossypium hirsutum</i> L.), cabbage (<i>Brassica</i> spp.), <i>Populus</i> spp., <i>Salix</i> spp., <i>Fraxinus</i> spp., <i>Betula</i> spp., <i>Alnus</i> spp., <i>Carya</i> spp., <i>Juglans</i> spp., <i>Ulmus</i> spp., <i>Acer</i> spp., <i>Diospyros</i> spp. and <i>Liquidambar</i> spp	Qu,1987; Yang Wei and Wang , 2006; Jia, 2006
21.	Japonia	Peste 100	arbori ornamentali, forestieri, pomi fructiferi și legume. Alte plante cultivate care pot fi atacate: pinul, viță-de-vie, porumbul, orezul, soia	Hasegawa, 1966; Masaki, 1975; Gomi, 1997; Gomi, 2000; Takehiko Yet, 2001
22.	Korea	300	arbori ornamentali, forestieri și pomi fructiferi	Jasinka, 1984; Choi et al., 1986; Smith et al., 1992; Chung et al., 1995.
23.	Turcia	200	arbori ornamentali, forestieri și pomi fructiferi, alunul.	Smith et al., 1992; Isik, Yanilmaz, 1992; Yaman et al, 2002
24.	Iran	250	arbori ornamentali, forestieri și pomi fructiferi	Rezaei et al., 2003
25.	Georgia	250	arbori ornamentali, forestieri și pomi fructiferi	Loladze, 2003, 2011

Tabelul A 2.1. Specii de insecte controlate cu ajutorul virusurilor

Specia de insecte	Virusul	Cultura	Țara (anul)
<i>Diprion hercyniae</i>	VPN	Conifere	Canada (2000)
<i>Neodiprion sertifer</i>	VPN	Pin	Canada (2003); Austria (2012) Anglia (2009); Germania (2004); Italia (2013), Polonia (2012); Yugoslavia (2000,2004)
<i>Neodiprion pratti</i>	VPN	Pin	SUA (2008)
<i>Neodiprion pratti banksiana</i>	VPN	Pin	Canada (2003)
<i>Neodiprion swaini</i>	VPN	Pin	Canada (2000)
<i>Neodiprion lecontei</i>	VPN	Pin	Canada (2005)
<i>Neodiprion taedae linearis</i>	VPN	Pin	SUA (2002)
<i>Choristoneura fumiferana</i>	VPN	Conifere	Canada (2011)
<i>Choristoneura fumiferana</i>	Entomopoxvirus	Conifere	Canada (2002)
<i>Choristoneura murinana</i>	VG	Brad	Germania (2006)
<i>Colias philodice</i>	VPN	Lucerna	SUA (1950)
<i>Heliothis armigera</i>	VPN	Bumbac	Uganda (2007); Australia; China; SUA; India (2004-2014)
<i>Heliothis armigera</i>	VPN	Lucerna	Spania (2010)
<i>Heliothis armigera</i>	Entomopoxvirus	Bumbac	Australia (2012)
<i>Heliothis armigera</i>	Tetravirus	Bumbac	Australia (2005)
<i>Heliothis zea</i>	VPN	Tutun	SUA (2005)
<i>Heliothis zea</i>	VPN	Porumb	SUA (2000-2012)
<i>Heliothis zea</i>	VPN	Bumbac	SUA (2003-2014)
<i>Heliothis zea</i>	VPN	Sorg	SUA (2009)
<i>Helicoverpa spp.</i>	VPN	Bumbac	Australia (2006)
<i>Helicoverpa spp.</i>	Ascovirus	Bumbac	Australia (1995)
<i>Hyphantria cunea</i>	VPN	arbori și arbuști în parcuri și aliniamente stradale	România (2002-2012)
<i>Hyphantria cunea</i>	VPN	arbori și arbuști în parcuri și aliniamente stradale -	China, Rusia (2011)
<i>Hyphantria cunea</i>	VPN VG	arbori și arbuști în parcuri și aliniamente stradale	Republica Moldova (2011-2014)

<i>Lymantria dispar</i>	VPN	Stejar	SUA (1963); Sardinia (1967); România (1995-2002)
<i>Lymantria fumida</i>	VPC	Brad	Japonia (1963-1966)
<i>Lymantria monacha</i>	VPN	Conifere	Germania, Italia, Danemarca, Suedia (anul)
<i>Malacosoma disstria</i>	VPN	Plop	Canada (1963, 1964); SUA; Italia; Rusia, Canada (1996)
<i>Malacosoma californicum</i>	VPN	Plop	Canada (1996)
<i>Mamestra brassicae</i>	VPN	Varză	Japonia (1965); Germania; Danemarca; Franța (1990-1996)
<i>Mamestra configurata</i>	VPN	Rapiță	Canada (1996)
<i>Orgyia pseudotsugata</i>	VPN	Conifere	SUA (1974, 1976); Canada și SUA (1995)
<i>Peridroma saucia</i>	VPN	Mentă	SUA (1968)
<i>Spodoptera exigua</i>	VPN	Pajiști	Kenya (1965, 1966), Thailanda; Germania (1996); Spania (1993-1995); Olanda, SUA (1995)
<i>Spodoptera litura</i>	VPN	Trifoi	Egipt (1954, 1955)
<i>Spodoptera litura</i>	VPN	Bumbac	Egipt (1958)
<i>Spodoptera frugiperda</i>	VPN	Porumb	SUA (1965, 1969)
<i>Spodoptera sunia</i>	VPN	Bumbac	Guatemala (1988)
<i>Spodoptera littoralis</i>	VPN	Bumbac	Creta (1980); Israel (1996); Egipt (1995)
<i>Stilpnotia salicis</i>	VPN	Plop	Belgia (1970)
<i>Trichoplusia ni</i>	VPN	Varză	SUA și Canada (1958-1975); SUA (1995)
<i>Trichoplusia ni</i>	VG	Varză	Canada (1958-1975); SUA (1995-1997)
<i>Trichoplusia orichalcea</i>	VPN	Soia	Zimbabwe (1988)
<i>Wiseana spp.</i>	VPN	Pajiști	Noua Zeelandă (1972)
<i>Wiseana spp.</i>	Entomopoxvirus	Pajiști	Noua Zeelandă (1972)
<i>Anagrapha falcifera</i>	VPN		SUA (1997)
<i>Adoxophies sp.</i>	VG	Ceai	Japonia (1997)
<i>Adoxophies sp.</i>	Entomopoxvirus	Ceai	Japonia (1997)
<i>Agrotis segetum</i>	VG	Porumb și bumbac	Rusia (1963); Pakistan, Danemarca (1971)
<i>Agrotis segetum</i>	VPN	Salată, porumb	Germania, China (1995)
<i>Dendrolimus sibiricus</i>	VG	Larix sibirica	Rusia (1961)
<i>Dendrolimus spectabilis</i>	VPC	Pin	Japonia (1960)

<i>Cydia pomonella</i>	VG	Măr	SUA (1966), Elveția (1972); Germania (1974, 1975), Chile, Japonia, Anglia, Italia (1995)
<i>Phthorimea operculella</i>	VG	Cartof	Australia (1970); Anglia; Chile
<i>Pieris brassicae</i>	VG	Varză	Franța (1956); Australia; Anglia
<i>Pieris rapae</i>	VG	Varză	Hawai (1953-1954); Australia (1957); Canada (1967-1975); China (1986)
<i>Pieris rapae</i>	VG	Rapiță	Noua Zeelandă (1957)
<i>Plathypena scabra</i>	VG	Rapiță	SUA (1972)
<i>Plodia interpunctella</i>	VG	Grâu și porumb	SUA (1973-1976)
<i>Plodia interpunctella</i>	VG	Nuci și alune	SUA (1973-1976)
<i>Thaumetopoea pityocampa</i>	VPC	Pin	Franța (1958-1959)
<i>Melolontha melolontha</i>	Entomopoxvirus	Pajiști	Franța (1963, 1970)
<i>Oryctes rhinoceros</i>	VN	Cocotier	Insulele Samoa (1969), Insulele Wallis (1970)
<i>Oryctes rhinoceros</i>	VN	Palmieri	Malaezia, Filipine (1995)
<i>Adoxophies orana</i>	VPN, VG	Măr	Germania, Olanda, Japonia (1995)
<i>Plutella xilostella</i>	VPN	Varză	Asia, Japonia (1995)
<i>Plutella xilostella</i>	VG	Legume	Kenya (2008)
<i>Anticarsia gemmatalis</i>	VPN	Soia	Brazilia (2014); Brazilia, SUA(2004)
<i>Cephalcia abietis</i>	VPN	Arbori	Austria (1980)
<i>Erinnyis ello</i>	GV	Manioc	Brazilia (2011)
<i>Gilpinia hercyniae</i>	VPN	Arbori	Canada 2011)
<i>Xestia c-nigrum</i>	VPN	Sfeclă	China (2005)
<i>Mythimna separata</i>	VPN	Diferite	China (2005)
<i>Dendrolimus punctatus</i>	CPV	Păduri	China (2005)
<i>Harrisina brillians</i>	VG	Viță de vie	SUA (2012)
<i>Epinotia aporema</i>	VG	Legume	Africa de Sud (2002)
<i>Calliptamus italicus</i>	Entomopoxvirus	Pajiști	China (2008-2013)
<i>Dociostaurus kraussi</i>	Entomopoxvirus	Pajiști	China (2002)
<i>Gomphocheus sibiricus</i>	Entomopoxvirus	Pajiști	China (2000-2010)
<i>Oedaleus asiaticus</i>	Entomopoxvirus	Pajiști	China (2004-2014)
<i>Oedaleus infernalis</i>	Entomopoxvirus	Pajiști	China (2004-2014)

Tabelul A 3.1. Specii de plante atacate în condiții naturale de *H. cunea* sau acceptate experimental în laborator ca gazdă pentru creșterea larvelor de *H. cunea*

Nr. crt	Planta	Familia	Natură	Acceptată ca hrană în laborator
1	<i>Agropyrum repens</i> Beauv.	GRAMINEAE	+	+
2	<i>Hordeum vulgare</i> L.		+	
3	<i>Lolium perenne</i> L.		+	
4	<i>Zea mays</i> L.		+	+
5	<i>Asparagus officinalis</i> L.	LILIACEAE	+	
6	<i>Iris germanica</i> L.	IRIDACEAE	+	
7	<i>Gladiolus imbricatus</i> L.		+	
8	<i>Populus alba</i> L.	SALICACEAE	+	
9	<i>Populus italica</i> Mnch.		+	+
10	<i>Populus nigra</i> L.		+	
11	<i>Populus tremula</i> L.		+	
5	<i>Asparagus officinalis</i> L.		+	
6	<i>Iris germanica</i> L.		+	
7	<i>Gladiolus imbricatus</i> L.		+	
8	<i>Populus alba</i> L.		+	
9	<i>Populus italica</i> Mnch.		+	
10	<i>Populus nigra</i> L.		+	
11	<i>Populus tremula</i> L.		+	
12	<i>Salix alba</i> L.		+	+
13	<i>Salix caprea</i> L.		+	
14	<i>Salix fragilis</i> L.		+	
15	<i>Salix triandra</i> L.		+	
16	<i>Juglans regia</i> L.	JUGLANDACEAE	+	+
17	<i>Juglans nigra</i> L.		+	
18	<i>Alnus glutinosa</i> Gaertn.	BETULACEAE	+	
19	<i>Betula verrucosa</i> L.		+	
20	<i>Corylus avellana</i> L.		+	
21	<i>Fagus silvatica</i> L.	FAGACEAE	+	
22	<i>Castanea saliva</i> Mill.		+	
23	<i>Quercus petraea</i> Liebl.		+	
24	<i>Quercus robur</i> L.		+	
25	<i>Quercus rubra</i> L.		+	+
26	<i>Celtis occidentalis</i> L.	ULMACEAE	+	
27	<i>Ulmus campestris</i> L.		+	
28	<i>Ulmus scabra</i> Mill.		+	
29	<i>Morus alba</i> L.	MORACEAE	+	+
30	<i>Morus nigra</i> L.		+	+
31	<i>Maclura aurantiaca</i>		+	
32	<i>Ficus elastica</i> Rorb.		+	+
33	<i>Amaranthus retroflexus</i> L.	AMARANTHACEAE	+	
34	<i>Clematis vitalba</i> L.	RANUNCULACEAE	+	
35	<i>Paeonia</i> sp.		+	
36	<i>Papaver</i> sp.	PAPAVERACEAE	+	
37	<i>Brassica oleracea</i> L.	CRUCIFERAE	+	+
38	<i>Ribes nigrum</i> L.	SAXIFRAGACEAE	+	
39	<i>Platanus orientalis</i> L.	PLATANACEAE	+	+
40	<i>Crataegus monogyna</i> L.	ROSACEAE	+	+

41	<i>Cydonia oblonga</i> Mill.		+	+
42	<i>Fragaria vesca</i> L.		+	
43	<i>Cerasus avium</i> Mnch.		+	
44	<i>Prunus domestica</i> L.		+	+
45	<i>Primus spinosa</i> L.		+	
46	<i>Pirus sativa</i> Lam. et Dc.		+	
47	<i>Pirus salicifolia</i> L.		+	
48	<i>Rosa canina</i> L.		+	+
49	<i>Rubus caesius</i> L.		+	
50	<i>Rubus idaeus</i> L.		+	
51	<i>Cercis siliquastrum</i> L.	LEGUMINOCAE	+	
52	<i>Gleditschia triacanthos</i> L.		+	
53	<i>Laburnum anagyroides</i> Medik.		+	
54	<i>Medicago sativa</i> L.		+	
55	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.		+	
56	<i>Pisum sativum</i> L.		+	
57	<i>Robinia pseudacacia</i> L.		+	
58	<i>Sophora japonica</i> L.		+	
59	<i>Vicia faba</i> L.		+	
60	<i>Trifolium pratense</i> L.		+	
61	<i>Pelargonium zonale</i> Ait.	GERANIACEAE	+	
62	<i>Geranium</i> sp.		+	
63	<i>Buxus sempervirens</i> L.	BUXACEAE	+	
64	<i>Ilex aquifolium</i> L.	AQUIFOLIACEAE	+	
65	<i>Acer campestre</i> L.	ACERACEAE	+	+
66	<i>Acer negundo</i> L.		+	+
67	<i>Acer platanoides</i> L.		+	+
68	<i>Acer pseudoplatanus</i> L.		+	+
69	<i>Acer saccharinum</i> L.		+	+
70	<i>Aesculus hippocastanum</i> L.	HIPPOCASTANACEAE	+	
71	<i>Vitis vinifera</i> L.	VITACEAE	+	+
72	<i>Parthenocisus tricuspidata</i> Planch.		+	+
73	<i>Parthenocisus quinquefolia</i> Planch.		+	
74	<i>Tilia cordata</i> Mill.	TILIACEAE	+	+
75	<i>Tilia platyphyllos</i> Scop.		+	+
76	<i>Althea rosea</i> Cav.	MALVACEAE	+	
77	<i>Hibiscus syriacus</i> L.		+	
78	<i>Tamarix</i> sp.	TAMARICACEAE	+	
79	<i>Begonia</i> sp.	BEGONIACEAE	+	
80	<i>Eleagnus angustifolia</i>	ELEAGNACEAE	+	
81	<i>Daucus carota</i> L.	UMBELIFERAE	+	
82	<i>Petroselinum hortense</i> Hoff.		+	
83	<i>Cornus mas</i> L.	CORNACEAE	+	
84	<i>Cornus sanguinea</i> L.		+	
85	<i>Fraxinus excelsior</i> L.	OLEACEAE	+	
86	<i>Fraxinus ornus</i> L.		+	
87	<i>Forsythia</i> sp.		+	
88	<i>Ligustrum vulgare</i> L.		+	
89	<i>Syringa vulgaris</i> L.		+	
90	<i>Jasminum</i> sp.		+	
91	<i>Lamium purpureum</i> L.	LABIATAE	+	
92	<i>Salvia pratensis</i> L.		+	
93	<i>Petunia hybrida</i> Hort.	SOLANACEAE	+	

94	<i>Solanum nigrum</i> L.		+	
95	<i>Solanum tuberosum</i> L.		+	
96	<i>Paulownia tomentosa</i> Sieb. et. Zucc	SCROPHULARIACEAE	+	+
97	<i>Catalpa bignonioides</i> Watt.	BIGNONIACEAE	+	+
98	<i>Catalpa bignonioides</i> Aurea			
99	<i>Catalpa ovata</i> G. Don.		+	+
100	<i>Catalpa speciosa</i>			
101	<i>Campsis radicans</i>		+	
102	<i>Plantago major</i> L.	AGINACEAE	+	
103	<i>Plantago lanceolata</i> L.		+	
104	<i>Sambucus nigra</i> L.	CAPRIFOLIACEAE	+	
105	<i>Viburnum</i> sp.		+	
106	<i>Chrysanthemum</i> sp.		+	
107	<i>Cichorium intybus</i> L.		+	
108	<i>Helianthus annuus</i> L.		+	
109	<i>Taraxacum officinale</i> Web.		+	
110	<i>Zinnia elegans</i> L.		+	
111	<i>Sambucus nigra</i> L.		+	
112	<i>Viburnum</i> sp.		+	
113	<i>Chrysanthemum</i> sp.	COMPOSITAE	+	
114	<i>Cichorium intybus</i> L.		+	
115	<i>Helianthus annuus</i> L.		+	
116	<i>Taraxacum officinale</i> Web.		+	
117	<i>Zinnia elegans</i> L.		+	
118	<i>Cotinus coggygria</i>	ANACARDIACEAE	+	
119	<i>Berberis vulgaris</i>	BERBERIDACEAE	+	
120	<i>Canna</i> spp.	CANNACEAE	+	
121	<i>Chenopodium album</i>	CHENOPODIACEAE	+	
122	<i>Spinacia oleracea</i>		+	
123	<i>Ailanthus altissima</i>	SIMAROUBACEAE	+	
124	<i>Cephalanthus occidentalis</i>	NAUCLEACEAE	+	

Tabelul A 4.1. Familiile și alte unități taxonomice ale virusurilor entomopatogene

Nr.	FAMILIA	GENUL/VIRUSUL	Acidul nucleic	Gazda
1	<i>Baculoviridae</i>	A.Poliedrosis Nuclear (VPN) Gen.Baculovirus B.Granulosis (VG) Gen. Baculovirus	ADN	Afectează numai nevertebratele ca control biologic
2	<i>Poxviridae</i>	Gen.Entomopoxvirus A- <i>Melolontha melolontha</i> entomopoxvirus	ADN	Afectează vertebratele și nevertebratele
3	<i>Ascoviridae</i>	<i>Ascovirus Spodoptera frugiperda</i> ascovirus	ADN	Afectează nevertebra
4	<i>Reoviridae</i>	Gen.Virusul poliedrozei citoplasmatică	ARN	Apare la Hymenoptera, Coleoptera
5	<i>Polydnaviridae</i>	Ichnovirus <i>Campoplex sinorensis</i> Bracovirus	ADN	Găsite în specile Hymenoptera
6	<i>Iridoviridae</i>	Gen.Iridovirus Gen.Chloriviridovirus	ADN	Vertebrate iridescens virus 6, RanavirusFrog virus 3
7	<i>Parvoviridae</i>	Gen.Densovirus - <i>Junonia coenia</i> Virus, Densonucleosus	ADN	Vertebrate Parvovirus
8	<i>Nimaviridae</i>	Whispovirus-	ADN	White spot syndrome virus
9	<i>Picornaviridae</i>	Gen.enterovirus nu este clasificat <i>Drosophila C</i> virus	ARN	Au asemănări cu virusurile vertebratelor și plantelor Picornavirus
10	<i>Caliciviridae</i>	Amyelosis chronic stunt virus	ARN	Vertebrate, Calicivirus
11	<i>Nodaviridae</i>	Nodavirus-Nodamura virus	ARN	Vertebrate, Betanodavirus
12	<i>Tetraviridae</i>	Betatetravirus- <i>Nudaurelia capensis</i> β virus	ARN	β virus
13	<i>Birnaviridae</i>	Entomobirnavirus- <i>Drosophila X</i> virus	ARN	Aquabirnavirus-Infectious pancreatic necrosis virus
14	<i>Metaviridae</i>	Errantivirus- <i>Drosophila melanogaster</i> gypsy virus	ARN	<i>Drosophila melanogaster</i> gypsy virus
15	<i>Flaviviridae</i>	Flavivirus	ARN	La țânțari ca gazdă intermediară

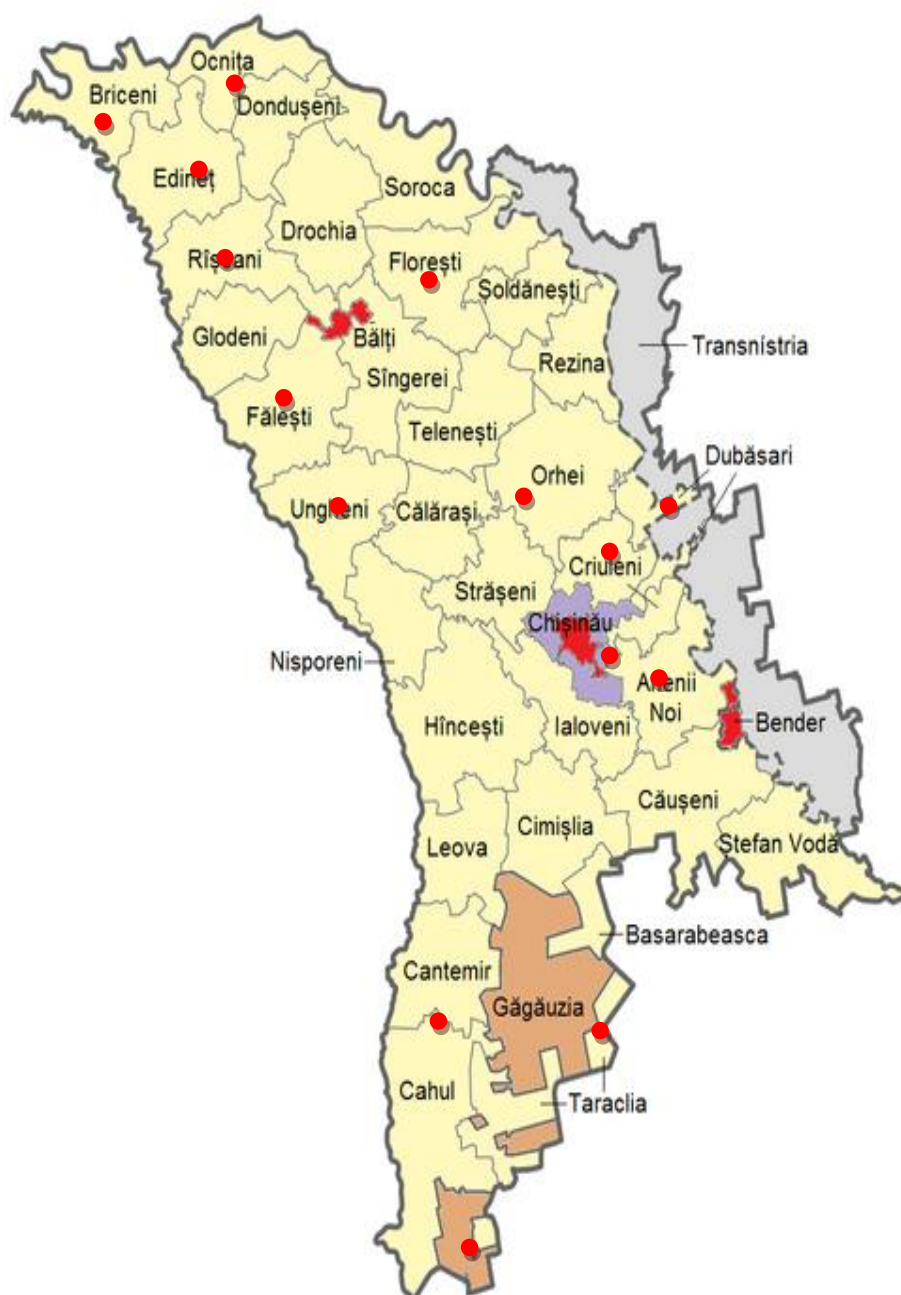


Figura A 5.1. Siturile de colectare a Omizii-păroase-a-dudului (*H. cunea*) în Republica Moldova

**ACTE DE IMPLEMENTARE:
Act de imlemnetare A. 6.1**

AGENȚIA
"MOLDSILVA"
Rezervația naturală „CODRII”
3721 com. Lozova, r-n Strășeni,
tel.(0237) 47-3-86,
fax(0237) 93-0-80
email:codri@mtc-st.md



АГЕНТСТВО
«МОЛДИСЛВА»
Природный заповедник
«КОДРИЙ»
3721 с. Лозова, Страшенского р-на
тел.(0237) 47-3-86,
факс (0237) 93-0-80
email:codri@mtc-st.md

14.10.2013 nr. 61-3/124

Act de implementare

Prin prezenta se confirmă, că rezultatele științifice obținute de D-na Aurelia Stângaci referitor la determinarea rolului preparatului viral Virin ABB-3 la combaterea dăunătorului *Hyphantria cunea* Drury (Lepidoptera Erebidac) au fost aplicate în masivele silvice Strășeni și liziera de pădure din Rezervația „Codrii”. În rezultatul executării experiențelor cu norma de consum a preparatului viral Virin ABB-3 -0,1 kg/ ha cu interval de 7 zile la fiecare generație a Omizii păroase a dudului s-a obținut eficacitatea biologică a preparatului viral Virin ABB-3- 83,3% I generație față de etalonul biologic Lepedocid-II generație care are o eficacitate biologică 85,2%. De aceea preparatul viral Virin ABB-3 în combaterea Omizii păroase a dudului cu norma de consum- 0,1 kg/ ha, este propus pentru includerea în registrul de Stat al produselor de uz fitosanitar și al fertilizanților.



Directorul Rezervației „Codrii

Gogu Vitalie

GOGU Vitalie

Act de implementare A. 6.2.



Aprob :
Directorul IPPAE AȘM,
Doctor habilitat în biologie
Vladimir Todiraș

septembrie 2013

Aprob :
Lider GT „ Oleg Timcu”
s.Petrunia r-n Glodeni
Oleg Timcu

septembrie 2013

A C T

De avizare a producției tehnico-științifice și a rezultatelor înregistrate

Denumirea temei: 10.04.038 F: Biotehnologia producerii și aplicării preparatelor biologice pentru combaterea organismelor dăunătoare

ETAPA: Elaborarea tehnologiilor de combatere în masă a larvelor Omizii păroase a dudului de *H.cunea* cu preparatul viral Virin ABB-3

Conducător științific: Doctor habilitat în biologie M.Ciuhrii

Consultant științific: Doctor habilitat în biologie L.Voloșciuc

Executorii:

Din partea IPPAE, AȘM- Cercetător științific Aurelia Stîngaci

Din partea GT „ Oleg Timcu” Oleg Timcu

Descrierea obiectului contractului - Rolul preparatului viral Virin ABB-3 în combaterea *H.cunea* în fașie forstieră de arțar .

L ocul executării experiențelor: GT „ Oleg Timcu” s.Petrunia r-n Glodeni

Norma de consum a preparatului viral Virin ABB-3 -0,1 kg/ ha , soluției de lucru 1,5L/pom (1000l/ha), repetare cu interval de 7 zile la fiecare generație a Omizii păroase a dudului.

Rezultatele înregistrate:

În condițiile climatice ale anului curent , la aplicarea a unui tratament contra larvelor generației a II în fașie forstieră de arțar 1000m x 6m= 6 ha, am obținut eficacitatea biologică a preparatului viral Virin ABB-3- 83,3% . Față de etalonul biologic Lepedocid cu eficacitate biologică de 88,0%.

Eficacitatea biologică a preparatului viral Virin ABB-3 în controlul dezvoltării Omizii păroase a dudului în masivele silvice.

Nr d/r	Preparatul	Supraf ața, ha	Norma Kg/ha	Generația	Omizi la colonii		Eficacitatea biologică
					până	După 10 zile	
1	Virin ABB-3	3	0,1	II	640	107	83,3
2	Lepedocid	2	1,0	II	518	62	88,0
3	MARTOR	1		II	645	621	-

Concluzii: Preparatul viral Virin ABB-3 în combaterea Omizii păroase a dudului cu norma de consum- 0,1 kg/ ha. Preparatul VIRIN-ABB-3 a demonstrat o eficacitate biologică la nivelul etaloanelor de comparație cu preparat biologic (83,3-88,0%).

Din partea IPPAE, AȘM,

A.Stîngaci

Din partea GT „ Oleg Timcu”

O Timcu

DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII

Subsemnatul, **Stîngaci Aurelia**, declar pe răspundere personală că materialele prezentate în teza de doctorat sunt rezultatul propriilor cercetări și realizări științifice.

Conștientizez că, în caz contrar, urmează să suport consecințele în conformitate cu legislația în vigoare.

Stîngaci Aurelia

01.10. 2019

CV-ul AUTORULUI

Nume, Prenume: Stîngaci Aurelia

Data și locul nașterii: 17 august 1970, mun. Chișinău, R. Moldova

Cetățenia: Republica Moldova.

STUDII DE ÎNVĂȚĂMÂNT SUPERIOR UNIVERSITAR:

1988-1993 – Universitatea Agrară de Stat din Moldova, Facultatea de Pomicultură și Viticultură, specialitatea „ Protecția biologică a plantelor”.

1994-1997 – Doctorantură, Academia de Științe a Moldovei.

ACTIVITATEA PROFESIONALĂ:

1993 – cercetător științific stagiar, Institutul Unional de Metode biologice de protecție a Plantelor, Laboratorul „Biotehnologia Producției Mijloacelor Biologice”.

1994-1997 – doctorantură, Academia de Științe a Moldovei;

1994 – prezent – cercetător științific, Laboratorul „Fitopatologie și Biotehnologie ”, Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor.

STAGII:

02-03 iulie 2015 Universitatea Academiei de Științe a Moldovei „Tehnici de cercetare în biologia moleculară”.

06 - 18 iulie 2017 Institutul de Cercetări Științifice în Domeniul Microbiologiei Agricole a Rusiei (Всероссийский научно исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии) din (Sankt-Petersburg, Pușkin) cu tema „Studierea noilor metode de efectuare a cercetărilor în domeniul elaborării tehnologiilor de producere a preparatelor microbiene pentru combaterea dăunătorilor și bolilor culturilor agricole”

DOMENIUL DE INTERESE ȘTIINȚIFICE:

Protecția plantelor. Elaborarea preparatelor pe baza principiilor biologice bioactive, valorificând în calitate de obiecte biotehnologice a baculovirusurilor și bacteriilor entomopatogene. Utilizarea preparatelor entomopatogene pentru diminuarea populației dăunătorului Omida-păroasă-a-dudului și a altor dăunători. Izolarea și identificarea preparatelor virale și bacteriene pentru stabilirea dinamicii populației Omizii-păroase-a-dudului în Republica Moldova.



PARTICIPĂRI LA PROIECTE ȘTIINȚIFICE NAȚIONALE ȘI INTERNAȚIONALE:

2007-2008 – proiect independent individual „Elaborarea procedeelor biotehnologice de producere a preparatului baculoviral în combaterea Omizii-păroase-a-dudului (*Hyphantria cunea* Drury).

2006-2010- proiect instituțional 06.40.22 F “Elaborarea mijloacelor ecologic inofensive în baza microorganismelor utile și a substanțelor biologice active pentru combaterea organismelor dăunătoare în agrocenoze”,

2011-2014 – proiectul instituțional 10.04.038 F „Elaborarea procedeelor biotehnologice de producere a preparatelor biologice în baza de virusuri, bacterii, ciuperci microscopice și nematozi entomopatogeni pentru protecția plantelor de boli și dăunători”.

2013-2014 – proiect bilateral cu Republica Belarus, 820.04. 09/VG. „Argumentarea biologică a sistemului ecologic de protecție a culturilor *Solanaceae* în baza diagnosticării și formării structurii populațiilor de dăunători și entomofagi în condiții de stres ecologic ”.

2016 – curent proiect instituțional 15.817.05.06F, „Elaborarea tehnologiilor de producere și aplicare a mijloacelor ecologic inofensive de protecție integrată a culturilor agricole”.

2017 – proiectul de sponsorizare „Științele vieții în dialogul generațiilor” în memoriam profesorului Mircea Ciuhrii. Obținere a BURSEI DE CERCETARE „MIRCEA CIUHRII”.

PARTICIPĂRI LA FORURI ȘTIINȚIFICE (naționale și internaționale) :

2019

- II Международная научная конференция, посвященной памяти академика Евгения Ивановича Ермакова «Тенденции развития агрофизики: от актуальных проблем земледелия и растениеводства к технологиям будущего». Агрофизический НИИ, Санкт-Петербург, 2-4 октября 2019 г;

2018

- Conferința științifică Internațională “Protecția Plantelor în Agricultura Convențională și Ecologică”, 10-12 decembrie 2018, Institutul Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor, Chișinău;

- Simpozionul Științific Internațional “Agricultura modernă – realizări și perspective”, dedicat aniversării 85 ani de la fondarea Universitatea Agrară de Stat, 2018, Chișinău;

2017

- Международная научная конференция, посвященной 105-летию со дня рождения члена-корреспондента А. Л. Амбросова и 80-летию со дня рождения академика В. Ф. Самерсова,

Прилуки, 24-26 июля 2017 г. Национальная академия наук Беларуси, Науч.-практический центр по земледелию, Институт защиты растений, Минск, Беларусь;

- Conferința științifică internațională „Genetica, Fiziologia și Ameliorarea Plantelor”, 9-10 octombrie 2017, Institutul Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor, Chișinău,

- International simpoziu „Actual problems of zoology and parasitology: achievements and 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. Chișinău, 13 octombrie 2017;

- International Scientific Symposium „Conversation of Plant Diversity”, 5th edition, 1-3 June 2017, Institutul Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor, Chișinău;

2016

- Международная научно-практическая конференция «Биотехнологические системы производства и применения средств биологизации земледелия», посвящённой 45-летию со дня создания ИТИ «Биотехника», Одесса, 3-7 октября 2016;

- Conferința științifică cu participare internațională consacrată aniversării a 150 ani de la apariția ecologiei ca știință, a 70 ani de la fondarea primelor instituții științifice academice și 20 ani de la înființarea USPEE „C. Stere”, Chișinău, 14-15 septembrie, 2016;

- The materials of IX-th International Conference of Zoologists „Sustainable use, protection of animal world and forest management in the context of climate change”, dedicated to the 70th anniversary from the creation of the first research institutions and 55th of the inauguration and foundation of the Academy of sciences of Moldova, Chișinău, 12-13 octombrie, 2016;

- The III-th International Scientific Conference of Microbial Biotechnology, dedicated to the 70th anniversary from the creation of the first research institutions and 55th of the inauguration and foundation of the Academy of sciences of Moldova, Chișinău, 12-13 octombrie 2016;

- Simpozionul științific național cu participare internațională „Biotehnologii avansate-realizări și perspective”, ediția IV-a consacrat aniversării a 70 de ani de la crearea primelor instituții de cercetare ale Academiei de Științe a Moldovei și a 55-a de la inaugurarea și fondarea AȘM. Chișinău, 2-4 octombrie, 2016;

2015

- International Scientific Symposium „ Conservation of plant diversity”, dedicated to the 65th anniversary of the Botanical Garden (Institute) of the Academy of Sciences of Moldova, 8-9 octombrie, 2015;

- Conferința științifică internațională „Entomopathogenic viruses diversity and use as bioinsecticides”, Chișinău, 25-27 iunie 2015, Institutul Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor;
- Conferința științifică internațională „Protecția plantelor- realizări și perspective”, Chișinău, 27-28 octombrie, 2015, Institutul Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor;
- International scientific congress „Soil and food resources for a healthy life”, University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine ”Ion Ionescu de la Brad”, Iași, 22-24 october 2015;

2014

- Simpozionului internațional „100 ani M. Sidorov”, Chisinau, 29-31 octombrie 2014;
- International scientific symposium „Conservation of plant diversity”, the third edition, Chișinău, 22-24 mai 2014;

2013

- Международной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов, посвященной 100-летию со дня рождения известного ученого Вадима Петровича Васильева (1912-2003). Состояние и перспективы развития защиты растений, Киев, 1-2 апреля, 2013;
- Международная научно-практическая конференция «Фитосанитарная безопасность и контроль сельскохозяйственной продукции», Черновцы, Бояны, , 3-4 июля, 2013;
- The VIII-th International Conference of Zoologists „Actual problems of protections and sustainable use of the animal world diversity”, Chișinău, 10-12 octombrie, 2013;
- Al III-lea Simpozion național cu participare internațională „Biotehnologii avansate-realizări și perspective”, Chișinău, 24-25 octombrie, 2013, Institutul Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor;
- International scientific symposium „Oltenia studii și comunicări științele naturii”, Craiova, 13-13 septembrie, 2013;

2012

- Республиканская научно практическая конференция «Зоологические чтения 2012», посвященной 250-летию профессора С.Б. Юндзилла, Гродно, 2-4 марта, 2012;
- Международная научная-практическая конференция «Биологическая защита растений на путях инноваций», Черновцы, 3-4 iulie, 2012;
- Международная научная-практическая конференция «Геологические и биоэкологические проблемы северного причерноморья», Тирасполь, 9-10 ноября 2012;
- International scientific symposium „Oltenia studii și comunicări științele naturii”, Craiova, 11-13 septembrie, 2012;

- Simpozionul științific internațional „ Protecția plantelor – probleme și perspective”, Chișinău, 30-31 octombrie, 2012;

2011

Simpozionul științific internațional „Conference of zoologists dedicated to the 50th anniversary from the foundation of Institute of Zoology of AȘM”, Chișinău, 13-14 octombrie, 2011;

2009

- Simpozionul științific internațional „ Protecția Plantelor – realizări și perspective”, 19-22 octombrie, 2009, Institutul Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor, Chișinău;

2008

- Simpozionul științific Internațional „Agricultura modernă – realizări și perspective”, dedicate aniversării a 75 de ani ai Universității Agrare de Stat din Moldova, Chișinău, 2008 25-27 septembrie, 2008;

Rezultatele principale au fost prezentate, discutate și aprobate prin realizarea proiectelor instituționale nr. 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), nr.10.04.038 F „Biotehnologia producerii și aplicării preparatelor biologice pentru combaterea organismelor dăunătoare” (2011-2014), precum și în cadrul Grantului pentru tineri cercetători nr. 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 in memoriam „Mircea Ciuhrii” „Cercetări novatoare privind transmiterea vectorială a baculovirusurilor entomopatogene în combaterea insectelor dăunătoare cu capcanele de lumină și feromoni” (2017).

Apartenența la societăți științifice naționale: Societatea de microbiologie din Moldova

LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE:55, dintre care:

Articole științifice în reviste internaționale recenzate

Categoria B+: 5

Articole științifice în reviste naționale recenzate

Categoria B+: 5

Categoria C: 1

Articole în culegeri internaționale: 15

Articole în culegeri naționale: 16

Teze ale comunicărilor științifice: 13

Competența lingvistică: limba maternă – română; limba rusă (scris/vorbit) – foarte bine; limba engleză (scris/vorbit) – bine; limba franceză (scris/vorbit) – bine

DATE DE CONTACT:

MD-2002, mun.Chișinău, str. Pădurii 26, cell: +37369114937, e-mail: aurelia.stingaci@gmail.com