MINISTERUL EDUCAȚIEI, CULTURII ȘI CERCETĂRII
UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA
INSTITUTUL DE ZOOLOGIE

Cu titlu de manuscris
C.Z.U: 632.937: 632.76(478) (043.2)

MOLDOVAN ANNA

CONTROLUL BIOLOGIC AL COLEOPTERELOR CURCULIONOIDE DĂUNĂTORI AI CULTURILOR AGRICOLE

167.01 – BIOTEHNOLOGIE, BIONANOTEHNOLOGIE

Teză de doctor în științe biologice

Conducător științific: LEȘANU Mihai, doctor în biologie, conferențiar universitar

Consultant științific TODERAȘ Ion, academician, doctor habilitat în biologie, profesor universitar, Om emerit al Republicii Moldova

Autor:

CHIȘINĂU, 2021

© Moldovan Anna, 2021

Mulțumiri

„Odată ajunsă la această etapă importantă din viață, doresc să exprim cuvinte de profundă recunoștință tuturor celor care mi-au fost alături pe parcursul realizării acestei teze de doctorat.

Doamnei ***Natalia MUNTEANU-MOLOTIEVSKIY****, doctor în științe biologice, conferențiar cercetător, aduc sincere mulțumiri și sentimente de gratitudine, pentru răbdarea și înțelegerea de care a dat dovadă pe parcursul anilor, pentru distinsele valori profesionale și umane pe care le-a cultivat, generozitatea cu care a împărțit din bogata sa experiență, prin toate acestea determinând calea pe care am ales-o și contribuind la formarea mea ca cercetător și om. Fără de îndrumarea și suportul acordate realizarea acestei teze de doctorat nu ar fi fost posibilă.*

Exprim sincere mulțumiri coordonatorilor ştiinţifici, dlui ***Ion TODERAȘ****, profesor universitar, doctor habilitat în științe biologice, academician, Om Emerit al Republicii Moldova, Membru de Onoare al Academiei Române, Directorul onorific al Institutului de Zoologie și dlui* ***Mihai LEȘANU****, doctor în științe biologice, conferențiar universitar, Decan al Facultății de Biologie și Pedologie, pentru contribuția valoroasă la realizarea tezei prin consultaţii, suportul metodologic, analiza și interpretarea rezultatelor experimentale.*

Cuvinte de deosebită recunoștință datorez referenților oficiali, dnei doctor în științe biologice, conferențiar cercetător, ***Liliana CEPOI****, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie și dlui doctor habilitat în științe biologice, profesor cercetător,* ***Leonid VOLOȘCIUC****, Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor, pentru timpul prețios acordat și pentru sfaturile ştiinţifice valoroase fără de care această teză de doctorat nu ar fi fost completă. Mulțumesc distinșilor membri ai Consiliului Științific Specializat, dlui doctor habilitat în științe biologice, profesor universitar, academician, Om Emerit al Republicii Moldova,* ***Valeriu RUDIC****, dnei doctor în științe biologice, conferențiar cercetător,* ***Tatiana CHIRIAC****, dnei doctor în științe biologice, conferențiar cercetător,* ***Svetlana CODREANU****, dlui doctor în științe biologice, conferențiar cercetător,* ***Oleg CHISELIȚA****, din cadrul Institutului de Microbiologie și Biotehnologie, dlui doctor habilitat în științe biologice, profesor cercetător,* ***Dumitru ERHAN*** *și dnei doctor habilitat în științe biologice, conferențiar cercetător,* ***Galina BUȘMACHIU****, din cadrul Institutului de Zoologie, pentru onoarea oferită de a evalua această teză de doctorat.*

Mulțumesc colegilor din cadrul Institutului de Zoologie și Universității de Stat din Moldova pentru sprijinul acordat și bunăvoința de care au dat dovadă.

Cu deosebită recunoștință și dragoste, dedic această teză familiei mele, în special mamei ***Svetlana*** *și soțului* ***Vladimir****, care au fost mereu alături de mine, m-au înconjurat cu afecțiunea lor și m-au susținut din toate punctele de vedere.”*

CUPRINS

ADNOTARE (*în română, rusă şi engleză*) 6
LISTA TABELELOR 9
LISTA FIGURILOR 10
LISTA ABREVIERILOR 13
INTRODUCERE 14
1. CONTROLUL BIOLOGIC AL COLEOPTERELOR CURCULIONOIDE: PROBLEME ŞI REALIZĂRI 22
1.1 Coleopterele curculionoide dăunători ai culturilor agricole 22
1.2 Metode utilizate în combaterea coleopterelor curculionoide dăunătoare 28
1.3 Istoricul cercetărilor privind controlul biologic al dăunătorilor 33
1.3.1 Agenții de control biologic al insectelor 35
1.3.2 Agenții de control biologic aplicați împotriva coleopterelor curculionoide 40
1.4 Biotehnologia producerii și aplicării preparatelor entomopatogene fungice 45
1.5 Concluzii la capitolul 1 50
2. MATERIALE ȘI METODE 52
2.1 Obiectele de studiu 52
2.1.1 Speciile de insecte (Coleoptera, Curculionoidea) incluse în cercetare 52
2.1.2 Speciile de fungi entomopatogeni (Hypocreales) incluse în cercetare 60
2.2. Metodele de studiu 65
2.2.1 Metode entomologice 65
2.2.2 Metode microbiologice 66
2.2.3 Metode molecular-genetice 74
2.2.4 Metode statistice și bioinformaţionale 78
2.3 Concluzii la capitolul 2 80
3. MICROFLORA FUNGICĂ A SPECIILOR DE COLEOPTERE CURCULIONOIDE INVESTIGATE 81
3.1 Identificarea tulpinilor fungice cu utilizarea metodelor molecular-genetice 81
3.2 Identificarea tulpinilor fungice în baza caracterelor morfologice 90
3.3 Poziția taxonomică și importanța practică a tulpinilor fungice identificate 92
3.4 Concluzii la capitolul 3 116

4. ELABORAREA PROCEDEULUI DE PRODUCERE ȘI APLICARE A AGENȚILOR FUNGICI DE CONTROL BIOLOGIC AL COLEOPTERELOR CURCULIONOIDE..... 118
4.1 Estimarea susceptibilității insectelor țintă la infecția cu tulpinile fungice potențial entomopatogene..... 122
4.2 Evaluarea activității insecticide a tulpinii *Beauveria bassiana* L1/6 (CNMN-FE-01) 122
4.3 Proprietățile fiziologice ale tulpinii de fungi *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01..... 127
4.3.1 Influența temperaturii asupra creșterii și dezvoltării tulpinii de fungi *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01..... 127
4.3.2 Influența radiațiilor UV asupra creșterii și dezvoltării tulpinii de fungi *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01..... 130
4.3.3 Influența pH-ului mediului ambiant asupra creșterii și dezvoltării tulpinii de fungi *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01..... 134
4.3.4 Influența salinității mediului ambiant asupra creșterii și dezvoltării tulpinii de fungi *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01..... 137
4.3.5 Influența presiunii osmotice a mediului asupra creșterii și dezvoltării tulpinii de fungi *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01..... 140
4.4 Elaborarea și aplicarea preparatelor bioinsecticide pe baza tulpinii de fungi *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01..... 142
4.5 Concluzii la capitolul 4..... 148
CONCLUZII GENERALE ŞI RECOMANDĂRI..... 150
BIBLIOGRAFIE..... 155
ANEXE..... 187
Anexa 1. Brevet de invenție MD 4560..... 187
Anexa 2. Adeverința de depozitare a tulpinii *B. bassiana* CNMN-FE-01..... 193
Anexa 3. Pașaportul tulpinii *B. bassiana* CNMN-FE-01..... 194
Anexa 4. Acte de implementare a rezultatelor tezei de doctorat..... 198
Anexa 5. Diplome și distincții..... 200
DECLARAŢIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII..... 206
CV-ul AUTORULUI..... 207

ADNOTARE

Moldovan Anna, „Controlul biologic al coleopterelor curculionoide dăunători ai culturilor agricole”, *teză de doctor în științe biologice*, Chișinău, 2021.

Structura tezei: introducere, 4 capitole, concluzii și recomandări, bibliografie din 533 de titluri, anexe, 140 de pagini text de bază, 66 figuri, 10 tabele. Rezultatele cercetării au fost publicate în 18 publicații științifice.

Cuvinte-cheie: *Sitona lineatus, Hypera postica, Protapion apricans,* Curculionoidea, microflora fungică, control biologic, Republica Moldova.

Scopul lucrării: investigarea microflorei fungice a dăunătorilor *Sitona lineatus* L., *Hypera postica* (Gyll.) și *Protapion apricans* (Hbst.) (Coleoptera, Curculionoidea), selectarea agenților de control biologic al dăunătorilor și caracterizarea proprietăților fiziologice ale tulpinilor autohtone de fungi pentru producerea și aplicarea bioinsecticidelor în cadrul agroecosistemelor.

Obiectivele cercetării: izolarea și identificarea tulpinilor autohtone de micromicete din microflora speciilor *S. lineatus, H. postica* și *P. apricans*; investigarea susceptibilității dăunătorilor *S. lineatus, H. postica* și *P. apricans* la infecția cu tulpinile de fungi izolate cu potențial de utilizare în calitate de agenți de control biologic; determinarea activității insecticide a tulpinilor fungice selectate asupra dăunătorilor țintă *S. lineatus, H. postica* și *P. apricans*; caracterizarea particularităților de creștere și dezvoltare a tulpinilor fungice cu activitate insecticidă sporită în diferite condiții ale mediului ambiant pentru elaborarea procedeului de obținere a preparatului autohton cu poprietăți insecticide și recomandărilor de aplicare în ecosistemele agricole.

Noutatea şi originalitatea ştiinţifică: în microflora coleopterelor curculionoide investigate, au fost evidențiate 55 tulpini fungice, identificate la nivel de specie în baza markerilor moleculari, porțiunea de gena nucleară ARNr 18S și fragmentul ITS. Pentru prima dată a fost evidențiată prezența micromicetelor entomopatogene din genurile *Beauveria* şi *Isaria* în microflora insectelor *S. lineatus* și *H. postica*, pe teritoriul Republicii Moldova. Pentru prima dată a fost investigată microflora fungică a speciei *P. apricans*. Prezența speciilor fitopatogene în microbiota fungică a insectelor implică investigarea dăunătorilor vizați ca potențiali vectori. Tulpina de fungi *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01 posedă activitate insecticidă sporită (brevet de invenție MD 4560) și proprietăți avantajoase pentru formularea și aplicarea bioinsecticidelor.

Rezultatul obținut care contribuie la soluționarea unei probleme științifice importante constă în: evidențierea tulpinilor noi autohtone de fungi cu activitate insecticidă, selectarea tulpinii cu virulență sporită, proprietăți fiziologice și biochimice de importanță tehnologică, stabilirea agentului bioactiv al preparatului insecticid ceea ce a condus la elaborarea procedeului de obținere și aplicare a preparatului bioinsecticid în vederea integrării acestuia în sistemele de producție agricolă.

Semnificația teoretică: au fost obținute date noi privind comunitățile fungice ce constituie microflora dăunătorilor culturilor agricole; speciile de dăunători au fost atestați ca potențiali vectori ai micromicetelor fitopatogene accentuând importanța elaborării metodelor eficiente și inofensive de control al acestora; a fost argumentat științific potențialul de aplicare a tulpinilor autohtone de *Beauveria bassiana* în calitate de agent bioactiv pentru producerea locală a preparatelor insecticide; a fost propus procedeul de obținere a preparatului insecticid destinat controlului biologic al coleopterelor curculionoide.

Valoarea aplicativă: se propune un procedeu de obținere a unui preparat insecticid natural pe baza tulpinii autohtone noi de *B. bassiana* CNMN-FE-01, pentru controlul biologic al speciei *Sitona lineatus*. Tulpina posedă proprietăți fiziologice și biochimice promițătoare care vor permite de a elabora biopreparate aplicate pe scară largă pentru protecția culturilor de *Fabaceae*.

Implementarea rezultatelor științifice: rezultatele sunt utilizate în calitate de material didactic pentru instruirea studenților la specialitățile Biologie, Biologie moleculară (licență), Științe biologice aplicate (master), în cadrul cursurilor de instruire a formatorilor și a fermierilor în domeniul agriculturii ecologice și metodelor biologice de combatere a dăunătorilor.

АННОТАЦИЯ

Молдован Анна, „Биологический контроль куркулионоидных жуков вредителей сельскохозяйственных культур”, *диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук,* Кишинев, 2021.

Структура диссертации: введение, 4 главы, общие выводы и рекомендации, список литературы из 533 библиографических источников, приложения, 140 страниц основного текста, 66 рисунка, 10 таблиц. Результаты исследования отражены в 18 научных работах.

Ключевые слова: *Sitona lineatus, Hypera postica, Protapion apricans*, Curculionoidea, грибковая микрофлора, биологический контроль, Республика Молдова.

Цель работы: исследование грибковой микрофлоры видов *S. lineatus* L., *H. postica* (Gyll.) и *P. apricans* (Hbst.) (Coleoptera, Curculionoidea), выбор биологических агентов борьбы с вредителями и характеристика физиологических свойств местных штаммов грибов для производства и применения биоинсектицидов в агроэкосистемах.

Задачи исследования: Выделение и видовое определение местных штаммов микромицет из микрофлоры видов *S. lineatus, H. postica* и *P. apricans*; исследование чувствительности вредителей к заражению штаммами грибов, которые могут использоваться в качестве агентов биологического контроля; определение инсектицидной активности; характеристика особенностей роста и развития штаммов с повышенной инсектицидной активностью в различных условиях среды для разработки принципа производства инсектицидного препарата и рекомендаций по его применению в агроэкосистемах.

Научная новизна и оригинальность: В микрофлоре исследованных куркулионоидных жуков выявлено 55 штаммов грибов, идентифицированных на уровне видов с использованием молекулярных маркеров ядерный ген рРНК 18S и фрагмент ITS. Впервые были выявлены энтомопатогенные грибы родов *Beauveria* и *Isaria* в микрофлоре насекомых *S. lineatus* и *H. postica* на территории Республики Молдова. Впервые была исследована грибковая микрофлора вида *P. apricans.* Присутствие фитопатогенных видов микромицет требует изучения данных вредителей как потенциальных переносчиков. Штамм грибов *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01 обладает повышенной инсектицидной активностью (патент MD 4560) и подходящими свойствами для производства и применения биоинсектицидов.

Результат, который способствует решению научной проблемы в диссертации, состоит в выделении новых местных штаммов грибов с инсектицидной активностью, выбор штамма с повышенной вирулентностью, физиологическими и биохимическими свойствами технологического значения, определение биологически активного агента инсектицидного препарата, что привело к разработке процесса получения и применения инсектицидного препарата для интеграции в системы сельскохозяйственного производства.

Теоретическая значимость: были получены новые данные о грибковых сообществах, которые составляют микрофлору вредителей сельскохозяйственных культур, включая способность вредителей переносить фитопатогенные грибы, что подчеркивает важность разработки эффективных и безвредных методов борьбы с вредителями, были научно обоснованы возможности применения местных штаммов *Beauveria bassiana* в качестве биологически активного агента для производства инсектицидных препаратов; предложена методика получения инсектицидного препарата для биологической борьбы с куркулионоидными жуками.

Практическая ценность работы: предложен способ получения натурального инсектицидного препарата на основе нового нативного штамма *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01 для биологического контроля вида *Sitona lineatus*. Штамм обладает физиологическими и биохимическими свойствами, которые позволят разработать и широко применить биопрепараты для защиты сельскохозяйственных культур из семейства бобовых.

Внедрение научных результатов: полученные результаты используются в качестве учебного материала для подготовки студентов, на курсах подготовки инструкторов и фермеров в области органического земледелия и методов биологической борьбы с вредителями.

ANNOTATION

Moldovan Anna. „Biological control of weevils pests of agricultural crops”,
***PhD thesis in biological sciences*, Chisinau, 2021.**

Structure of the thesis: introduction, 4 chapters, general conclusions and recommendations, bibliography of 533 titles, Annexes, 140 pages of main text, 66 figures, 10 tables. The research results have been published in 18 scientific publications.

Keywords: *Sitona lineatus, Hypera postica, Protapion apricans,* Curculionoidea, fungal microflora, biological control, Republic of Moldova.

Research goal: investigation of the fungal microflora of the *Sitona lineatus* L., *Hypera postica* Gyll. and *Protapion apricans* (Hbst.) pests (Coleoptera, Curculionoidea), selection of biological control agents and characterization of the physiological properties of native fungal strains for the local production of biopesticides and their application in agroecosystems.

Research objectives: isolation and identification of native strains of micromycetes from the microflora of the species *S. lineatus*, *H. postica* and *P. apricans*; investigation of *S. lineatus*, *H. postica* and *P. apricans* susceptibility to the infection with isolated fungal strains with potential for use as biological control agents; determining the insecticidal activity of the selected entomopathogenic fungal strains against target pests *S. lineatus*, *H. postica* and *P. apricans*; characterization of the particularities of growth and development of fungal strains with increased insecticidal activity under different environmental conditions to develop the procedure for obtaining the insecticidal preparation and application recommendations.

Scientific novelty and originality: in the microflora of the investigated curculionoid beetles, 55 fungal strains were highlighted, being identified at species level based on the molecular markers 18S rRNA gene sequence and ITS. For the first time, the presence of entomopathogenic fungi of the genera *Beauveria* and *Isaria* was detected in the microflora of *S. lineatus* and *H. postica* pest insects, on the territory of the Republic of Moldova. For the first time, the fungal microflora of the species *P. apricans* was investigated. The presence of phytopathogenic species in the fungal microbiota of insects involves the investigation of targeted pests as potential vectors. The fungal strain *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01 showed increased insecticidal activity (MD 4560 patent), and advantageous properties for the formulation and application of bioinsecticides.

The result that contributes to solving an important scientific problem consists in: highlighting the new native fungal strains with insecticidal activity, selection of the strain with increased virulence, physiological and biochemical properties of technological importance, establishing the bioactive agent of the insecticide preparation which led to the elaboration of the procedure for obtaining and applying the bioinsecticide preparation and its integration into agricultural production systems.

Theoretical significance: new data were obtained on the fungal communities that constitute the microflora of pests of agricultural crops; pest species have been highlighted as potential vectors of phytopathogenic fungi emphasizing the importance of developing efficient and harmless methods of their control; the potential application of native strains of *Beauveria bassiana* as a bioactive agent for the local production of insecticide preparations has been scientifically argued; the procedure for obtaining the insecticide preparation intended for the biological control of curculionoid beetles has been proposed.

Applicative value: a process for obtaining a natural insecticidal preparation based on the new native strain of *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01 is proposed for the biological control of the species *Sitona lineatus*. The strain showed promising physiological and biochemical properties that will allow the development of biopesticides and their wide application for the protection of *Fabaceae* crops.

Implementation of scientific results: the results are used as teaching material for training students in the specialties of Biology, Molecular Biology (bachelor's degree), Applied Biological Sciences (master's degree), in the training courses provided to trainers and farmers in the field of organic agriculture and biological methods of pest control.

LISTA TABELELOR

Tabelul 1.1.	Formulele biopesticidelor	p. 46
Tabelul 1.2.	Biopesticide fungice	p. 48
Tabelul 2.1.	Data şi locul colectării materialului biologic	p. 65
Tabelul 2.2.	Denumirea și compoziția mediilor nutritive utilizate pentru izolarea micromicetelor	p. 66
Tabelul 2.3.	Primerii utilizați pentru identificarea tulpinilor fungice	p. 76
Tabelul 3.1.	Rezultatele analizei BLAST a secvenţelor parţiale a genei ARNr 18S	p. 82
Tabelul 3.2.	Rezultatele analizei BLAST a succesiunilor nucleotidice pentru porțiunea de genă ITS (Internal Transcribed Spacer)	p. 88
Tabelul 3.3.	Tulpinile de fungi izolate direct de pe insecte cu semne vizibile de infecție fungică	p. 91
Tabelul 4.1.	Evaluarea preliminară a activității insecticide a tulpinilor fungice	p. 122
Tabelul 4.2.	Rata mortalității dăunătorului *Sitona lineatus* L. după aplicarea suspensiei de spori din cultura fungică a tulpinilor de *Beauveria bassiana*	p. 126

LISTA FIGURILOR

Fig. 1.1.	Principalele tipuri de formule a preparatelor entomopatogene fungice	p. 46
Fig. 2.1.	*Sitona lineatus* L., adult	p. 53
Fig. 2.2.	*Sitona lineatus* larve şi pupe	p. 53
Fig. 2.3.	*Hypera postica* (Gyll.), adult	p. 54
Fig. 2.4.	*Hypera postica* larve, pupă şi ouă	p. 54
Fig. 2.5.	*Protapion apricans* (Hbst.), adult	p. 55
Fig. 2.6.	Tulpină de *Beauveria bassiana*, aspect macroscopic	p. 61
Fig. 2.7.	Tulpină de *Isaria fumosoroseus*, aspect macroscopic	p. 62
Fig. 2.8.	Schema amplasării genelor ce codifică ARN*r* fungic și situs-urile de aliniere a primerilor	p. 78
Fig. 3.1.	Arborele filogenetic al tulpinilor fungice, reconstituit în baza secvenţei parţiale a genei ARNr 18S	p. 85-86
Fig. 3.2.	Exemplare de insecte cu semne de micoză	p. 90
Fig. 3.3.	Tulpini fungice izolate din corpul insectelor din speciile *Sitona lineatus* și *Hypera postica*	p. 90
Fig. 3.4.	Numărul de tulpini, specii şi genuri de fungi identificate în microflora fungică a dăunătorilor	p. 92
Fig.3.5.	Diversitatea speciilor fungice identificate în microflora coleopterelor curculionoide investigate	p. 93
Fig. 3.6.	Repartizarea tulpinilor fungice izolate conform speciilor și numărului de gazde	p. 94
Fig. 3.7.	Relațiile filogenetice și aspectul morfologic ale tulpinilor Hp3/9, Hp4/3, Hp5/41, Hp6/1 și Pa1 (*Cladosporium cladosporioides sensu lato*)	p. 95
Fig. 3.8.	Arborele filogenetic reconstruit (a) și aspectul morfologic (b) ale tulpinilor L2/6, L5/4 și Hp5/4 (*A. pullulans*)	p. 96
Fig. 3.9.	Arborele filogenetic reconstruit (a) și aspectul morfologic (b) ale tulpinilor L2/2, Hp5/5 și Hp6/3 (*Alternaria alternata*)	p. 97
Fig. 3.10.	Arborele filogenetic reconstruit (a) și aspectul morfologic (b) ale tulpinii Hp3/3 (*Dendryphion nanum*)	p. 98
Fig. 3.11.	Arborele filogenetic reconstruit și aspectul morfologic ale tulpinilor L1/7, L3/5, Hp3/2, Hp3/4, Hp4/2 (Torula spp.)	p. 99
Fig. 3.12.	Arborele filogenetic reconstruit (a) și aspectul morfologic (b) ale tulpinii L1/4 (*Aspergillus flavipes*)	p. 100
Fig. 3.13.	Relațiile filogenetice și aspectul morfologic ale tulpinilor L2/5, Pa3, Pa2 (*Penicillium polonicum*) și C (*Penicillium brevicompactum*)	p. 101
Fig. 3.14.	Relațiile filogenetice și aspectul morfologic ale tulpinilor B, N și L1/6 (*B. bassiana*)	p. 102
Fig. 3.15.	Arborele filogenetic reconstruit (a) și aspectul morfologic (b) ale tulpinii L5/6 (*I. fumosorosea*)	p. 103

Fig. 3.16. Relaţiile filogenetice ale tulpinilor L1/8 (*Fusarium equiseti*), Hp5/6 (*F. oxysporum*) şi Hp5/7 (*F. tricinctum*) p. 104

Fig. 3.17. Aspectul morfologic al tulpinilor (a) L1/8 (*Fusarium equiseti*), (b) Hp5/6 (*F. oxysporum*) şi (c) Hp5/7 (*F. tricinctum*) p. 105

Fig. 3.18. Arborele filogenetic reconstruit (a) şi aspectul morfologic (b) ale tulpinilor Hp3/5 şi Hp5/12 (*S. strictum*) p. 107

Fig. 3.19. Arborele filogenetic reconstruit (a) şi aspectul morfologic (b) ale tulpinii Pa8 (*Trichothecium roseum*) p. 108

Fig. 3.20. Arborele filogenetic reconstruit (a) şi aspectul morfologic (b) ale tulpinii Hp2/2 (*[Phialophora] cyclaminis*) p. 109

Fig. 3.21. Arborele filogenetic reconstruit (a) şi aspectul morfologic (b) ale tulpinii Hp5/13 (*Apiospora montagnei*) p. 109

Fig. 3.22. Arborele filogenetic reconstruit (a) şi aspectul morfologic (b) ale tulpinilor Pa7, Hp1/4 şi Hp1/6 (*Yarrowia deformans*) p. 111

Fig. 3.23. Arborele filogenetic reconstruit (a) şi aspectul morfologic (b) ale tulpinii Pa4 (*Debaryomyces hansenii*) p. 111

Fig. 3.24. Arborele filogenetic reconstruit (a) şi aspectul morfologic (b) ale tulpinii L1/5 (*Papiliotrema laurentii*) p. 112

Fig. 3.25. Arborele filogenetic reconstruit (a) şi aspectul morfologic (b) ale tulpinii L2/1 (*Rhodotorula graminis*) p. 113

Fig. 3.26. Arborele filogenetic reconstruit (a) şi aspectul morfologic (b) ale tulpinii Hp3/13 (*Mucor racemosus*) p. 114

Fig. 3.27. Arborele filogenetic reconstruit (a) şi aspectul morfologic (b) ale tulpinii L6/4 (*Rhizopus stolonifer*) p. 115

Fig. 4.1. Strategia experimentală p. 119

Fig. 4.2. Inocularea speciilor de dăunători cu suspensii conidiale din cultura tulpinii *B. bassiana* L1/6 p. 123

Fig. 4.3. Transferarea insectelor în cuşti cu lucernă proaspătă p. 123

Fig. 4.4. Verificarea mortalităţii insectelor după inocularea cu tulpinile fungice p. 124

Fig. 4.5. Verificarea mortalităţii şi transferarea indivizilor p. 124

Fig. 4.6. Insecte cu miceliu aerian dezvoltat la exterior p. 125

Fig. 4.7. Rata medie a mortalităţii indivizilor din specia *S. lineatus* după aplicarea suspensiei din conidii ale tulpinii L1/6 p. 125

Fig. 4.8. Graficul care exprimă dependenţa dinamicii de creştere a coloniilor tulpinii *B. bassiana* CNMN-FE-01 (mm), de temperatură p. 128

Fig. 4.9. Viteza medie de creştere radială a tulpinii de fungi *B. bassiana* CNMN-FE-01 pe mediul nutritiv PDA la diferite temperaturi, mm/zi p. 128

Fig. 4.10. Cantitatea de spori/cm^2 produse de tulpina *B. bassiana* CNMN-FE-01, funcţie de temperatură p. 129

Fig. 4.11. Viabilitatea conidiilor tulpinii *B. bassiana* CNMN-FE-01 după menţinerea îndelungată la diferite temperaturi p. 130

Fig. 4.12. Germinarea conidiilor după expunerea la raze UV, examinare microscopică p. 131-132

Fig. 4.13. Germinarea conidiilor tulpinii *B. bassiana* CNMN-FE-01 după iradierea cu raze UV timp de 10, 20, 30, 40 min. p. 132

Fig. 4.14. Graficul care exprimă dependența dinamicii de creștere a coloniilor tulpinii *B. bassiana* CNMN-FE-01 (mm), de durata de expunere la UV p. 133

Fig. 4.15. Viteza medie de creștere radială a tulpinii de fungi *B. bassiana* CNMN-FE-01 pe mediu nutritiv PDA după expunere la UV, mm/zi p. 133

Fig. 4.16. Graficul care exprimă dependența dinamicii de creștere a coloniilor tulpinii *B. bassiana* CNMN-FE-01 (mm), de pH-ul mediului p. 134

Fig. 4.17. Viteza medie de creștere radială a tulpinii de fungi *B. bassiana* CNMN-FE-01 pe mediu nutritiv PDA cu diferit pH, mm/zi p. 135

Fig. 4.18. Cantitatea a de spori produsă de tulpina de fungi *B. bassiana* CNMN-FE-01 pe mediu nutritiv PDA cu diferit pH după păstrare îndelungată, spori/cm^2 p. 136

Fig. 4.19. Viabilitatea sporilor produși de tulpina de fungi *B. bassiana* CNMN-FE-01 după păstrare îndelungată pe mediu nutritiv PDA cu diferit pH, spori/cm^2 p. 136

Fig. 4.20. Influența concentrației de NaCl asupra creșterii radiale a tulpinii fungice *B. bassiana* CNMN-FE-01, la a 5-a zi de la inoculare p. 137

Fig. 4.21. Graficul care exprimă dependența dinamicii de creștere a coloniilor tulpinii *B. bassiana* CNMN-FE-01 (mm), de salinitatea mediului p. 138

Fig. 4.22. Viteza medie de creștere radială a tulpinii de fungi *B. bassiana* CNMN-FE-01 pe mediu nutritiv PDA cu diferit concentrații de NaCl, mm/zi p. 139

Fig. 4.23. Cantitatea de spori produsă de tulpina de fungi *B. bassiana* CNMN-FE-01 pe mediu nutritiv PDA cu diferite concentrații de NaCl după păstrare îndelungată, spori/cm^2 p. 139

Fig. 4.24. Viabilitatea sporilor produși de tulpina de fungi *B. bassiana* CNMN-FE-01 după păstrare îndelungată pe mediu nutritiv PDA cu diferite concentrații de NaCl, % p. 140

Fig. 4.25. Graficul care exprimă dependența dinamicii de creștere a coloniilor tulpinii *B. bassiana* CNMN-FE-01 (mm), de concentrația NaCl în soluție apoasă p. 140

Fig. 4.26. Viteza medie de creștere radială a tulpinii de fungi *B. bassiana* CNMN-FE-01 pe mediu nutritiv după menținerea conidiilor timp de 24h în soluții cu diferită concentrație a NaCl înainte de inoculare, mm/zi p. 141

Fig. 4.27. Cantitatea de spori produsă de tulpina de fungi *B. bassiana* CNMN-FE-01 pe mediu nutritiv PDA după menținerea conidiilor timp de 24h în soluții cu diferită concentrație a NaCl, spori/cm^2 p. 141

Fig. 4.28. Viabilitatea sporilor produși de tulpina de fungi *B. bassiana* CNMN-FE-01 după păstrare, % p. 142

Fig. 4.29. Etapele procesului de selectare a tulpinii producător p. 143

Fig. 4.30. Tehnologia de producere a preparatului insecticid pe baza tulpinii *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01 p. 145

LISTA ABREVIERILOR

ANOVA	ANalysis Of VAriance (analiza varianței/ analiza dispersională unifactorială)
ADN	acid dezoxiribonucleic
ARN	acid ribonucleic
ARNr	acid ribonucleic ribozomal
Bb	*Beauveria bassiana*
Bt	*Bacillus thuringiensis*
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool (instrument de căutare prin aliniere)
ITS	Internal Transcribed Spacer (spațiator intern transcris)
IPM	Integrated Pest Management (management integrat al organismelor dăunătoare)
PDA	Potato Dextrose Agar (cartof-glucoză-agar)
P.B.	proteină brută
PCR	Polymeraze Chain Reaction (reacție în lanț a polimerazei)
SAPF	Selectiv Agar for Pathogenic Fungi (agar selectiv pentru fungi patogeni)
S.U.	substanță uscată

INTRODUCERE

Actualitatea şi importanţa problemei abordate. Leguminoasele (*Fabaceae*, *Leguminosae*) se clasează pe locul doi după familia *Poaceae* privind importanța economică. Un număr mare de plante leguminoase, astfel ca mazărea (*Pisum*), fasolea (*Phaseolus*), bobul (Vicia), fasolița (*Vigna*), soia (*Glycine*), lintea (*Lens*), constituie o sursa semnificativă de proteine de origine vegetală. Soia (*Glycine*) este de asemenea sursă de grăsimi. În calitate de plante furajere sunt cultivate trifoiul (*Trifolium*) și lucerna (*Medicago*), de asemenea reprezentanții acestor genuri sunt cultivați și în calitate de fertilizanți naturali. Reprezentanţii leguminoaselor sunt utilizați de asemenea ca sursă de fibră, condimente și plante decorative (Bennett 2011).

Productivitatea culturilor agricole este compromisă de un număr mare de factori, inclusiv organismele dăunătoare. Printre acestea insectele provoacă daune considerabile, distrugând anual aproximativ 20% din producția agricolă mondială cu aplicarea măsurilor de protecție a plantelor (Oerke 2006, Dhaliwal, Jindal, Mohindru 2015).

Reprezentanții suprafamiliei Curculionoidea (Coleoptera), sunt unii dintre cei mai periculoși dăunători ai plantelor de cultură (Perju 1995, Ghizdavu et al. 1997, Carcamo, Herle, Lupwayi 2015, Keskin, Ozkaya 2015, Urban 2015). Speciile *Sitona lineatus* L., *Hypera postica* (Gyll.) și *Protapion apricans* (Hbst.) (Coleoptera, Curculionoidea) sunt dăunători semnificativi ai culturilor de *Fabaceae* răspândiți în Europa, Africa, Asia şi America de Nord, inclusiv în Republica Moldova. Practicile agricole curente, în special creșterea în masă a cerealelor în monocultură extensivă, pe suprafețe geografice extinse, cât și transportul rapid al bunurilor pe scară globală, au facilitat introducerea și migrarea insectelor dăunătoare invazive în agroecosisteme, pe întreg globul Pământesc (Pimentel 2002). Potențialul expansiv al acestor dăunători a crescut remarcabil. Managementul speciilor de dăunători ai leguminoaselor este o provocare datorită fecundității înalte, comportamentului migrator şi habitatului ascuns al larvelor.

Utilizarea insecticidelor chimice rămâne a fi cea mai practicată metodă de combatere a insectelor dăunătoare, fiind avantajoasă datorită costurilor reduse şi spectrului larg de dăunători afectați. Insecticidele chimice se utilizează extensiv, chiar dacă majoritatea posedă un nivel înalt de toxicitate. Acestea prezintă un risc considerabil pentru sănătatea omului, în urma contactului direct în timpul aplicării și prezenței reziduurilor de pesticide în produsele alimentare și sursele de apă potabilă. De asemenea, pesticidele au un impact negativ asupra mediului, cât și asupra biodiversității (Pimentel 2005, Maroni, Fanetti, Metruccio 2006, Berny 2007, Damalas, Eleftherohorinos 2011). De multe ori aplicarea insecticidelor chimice are efect invers celui scontat prin distrugerea populațiilor speciilor benefice, precum inamicii naturali ai dăunătorilor sau

polenizatorii, și creșterea probabilității de dezvoltare a rezistenței dăunătorilor la produsul utilizat (Damalas, Eleftherohorinos 2011). Drept consecință, în legislația unor țări au fost introduse prevederi, ce țin de excluderea din uz sau reducerea utilizării substanțelor toxice pentru om și biodiversitate (Regulamentul 1107/2009 privind introducerea pe piață a produselor fitosanitare, Directiva 2009/127/CE privind echipamentele tehnice de aplicare a pesticidelor și Directiva 2009/128/CE privind utilizarea durabilă a pesticidelor). În rezultat au apărut noi tipuri de pesticide chimice, mai specifice și mai puțin persistente. În plan global, însă, se constată o tendință de creștere a cantităților de pesticide chimice utilizate, inclusiv cele interzise (Lamberth, Jeanmart, Luksch 2013).

Necesitatea identificării unei alternative insecticidelor chimice a stimulat interesul pentru elaborarea unor metode inofensive pentru om și mediu, readucând în atenția cercetătorilor metodele tradiționale și biologice de control al dăunătorilor. Controlul biologic reprezintă un complex de metode bazate pe utilizarea altor organisme în reducerea efectivului numeric al organismelor dăunătoare sub pragul economic de dăunare, valorificând mecanismele naturale precum prădătorismul, parazitismul, competiția, ș.a.

Insectele, ca și celelalte organisme vii, prezintă un număr larg de inamici naturali, care pot fi utilizați în calitate de agenți de control biologic. La fel ca celelalte organisme, insectele sunt susceptibile la infecția cu microorganisme patogene, printre care evidențiem micromicetele. Unele tulpini de microorganisme entomopatogene sunt deja utilizate pentru a controla populațiile de insecte dăunătoare, activitatea insecticidă a altora este în proces de investigare. Insecticidele microbiene, inclusiv pe bază de micromicete, combină avantajele atât a metodelor de control biologic, cât și a celor chimice. Asemănător pesticidelor chimice acestea sunt ușor de produs la un preț redus, ușor de formulat și au o perioadă de valabilitate lungă. De asemenea acestea pot fi aplicate cu ușurință, folosind echipamentul standard. Contrar insecticidelor chimice, care posedă un spectru larg de acțiune, tulpinile fungice sunt selective, respectiv, impactul negativ asupra mediului este minim. Recent a fost aprobat Programul național de protecție integrată a plantelor pentru anii 2018-2027 și Planul de acțiuni privind implementarea acestuia (Hotărârea Guvernului Republicii Moldova Nr. 123 din 02.02.2018), care pune accent pe utilizarea metodelor biologice de combatere a insectelor dăunătoare. În Republica Moldova nu există date privind microflora fungică a speciilor *Sitona lineatus, Hypera postica* și *Protapion apricans* și microorganismele, care ar putea fi utilizate în controlul biologic al insectelor investigate. Studierea în complex a microflorei fungice a acestor dăunători și caracterizarea tulpinilor cu activitate insecticidă sporită va permite de a oferi noi agenți de control biologic, de a produce în Republica Moldova biopesticide accesibile pentru producătorii agricoli.

Scopul lucrării a constat în investigarea microflorei fungice a dăunătorilor *Sitona lineatus* L., *Hypera postica* (Gyll.) și *Protapion apricans* (Hbst.) (Coleoptera, Curculionoidea), selectarea agenților de control biologic al dăunătorilor și caracterizarea proprietăților fiziologice ale tulpinilor autohtone de fungi pentru producerea și aplicarea bioinsecticidelor în cadrul agroecosistemelor.

Obiectivele cercetării:

1. Izolarea și identificarea tulpinilor autohtone de micromicete din microflora speciilor *Sitona lineatus* L., *Hypera postica* (Gyll.) și *Protapion apricans* (Hbst.) (Coleoptera, Curculionoidea).
2. Investigarea susceptibilității dăunătorilor *Sitona lineatus* L., *Hypera postica* (Gyll.) și *Protapion apricans* (Hbst.) (Coleoptera, Curculionoidea) la infecția cu tulpinile de fungi izolate cu potențial de utilizare în calitate de agenți de control biologic.
3. Determinarea activității insecticide a tulpinilor fungice selectate asupra dăunătorilor țintă *Sitona lineatus* L., *Hypera postica* (Gyll.) și *Protapion apricans* (Hbst.) (Coleoptera, Curculionoidea).
4. Caracterizarea particularităților de creștere și dezvoltare a tulpinilor fungice cu activitate insecticidă sporită în diferite condiții ale mediului ambiant pentru elaborarea procedeului de obținere a preparatului autohton cu proprietăți insecticide și recomandărilor de aplicare în ecosistemele agricole.

Ipotezele de cercetare:

1. Ecosistemele din Republica Moldova reprezintă o sursă competitivă și nevalorificată de tulpini autohtone de fungi cu potențial insecticid.
2. Tulpinile autohtone de fungi posedă proprietăți fiziologice favorabile pentru a fi utilizate cu succes în producerea locală de biopesticide și integrarea acestora în sistemele de producție agricolă.

Sinteza metodologiei de cercetare și justificarea metodelor de cercetare alese.

Pentru a atinge scopul și realiza obiectivele propuse în cadrul tezei, confirma sau infirma ipotezele înaintate, au fost utilizate metode clasice și moderne de cercetare, inclusiv:

- metode entomologice de colectare a insectelor din agroecosisteme și identificarea insectelor în baza particularităților morfologice;
- metode microbiologice de izolare directă și indirectă a fungilor prezenți în microflora insectelor incluse în studiu, identificarea morfo-culturală a tulpinilor izolate în cultură pură,

în scopul evidențierii unui spectru mai extins de tulpini fungice asociate dăunătorilor, și izolării unui număr mai mare de tulpini cu potențial insecticid;

- metode genetico-moleculare de identificare a tulpinilor fungice, utilizate pentru stabilirea apartenenței specifice a tulpinilor de micromicete izolate;
- metode microbiologice de estimare a susceptibilității insectelor țintă la infecția cu tulpinile fungice, de evaluare a activității insecticide a tulpinilor cu potențial insecticid aplicate pentru a selecta tulpina cu activitate insecticidă maximă în calitate de tulpină potențial producător;
- metode microbiologice de caracterizare a particularităților de creștere și dezvoltare a tulpinilor fungice în diferite condiții ale mediului ambiant aplicate pentru confirmarea tulpinii selectate în calitate de tulpină producător, elaborarea formulei preparatului insecticid și a recomandărilor de aplicare;
- metode microbiologice de caracterizare a condițiilor de păstrare pe termen lung, mediu și scurt a tulpinilor fungice și verificarea viabilității acestora după păstrare, necesare pentru elaborarea procedeului de producere a preparatului insecticid;
- metode matematice, statistice și bioinformatice utilizate pentru proiectarea experiențelor, analiza, interpretarea și validarea rezultatelor obținute.

Sumarul compartimentelor tezei.

Capitolul 1 „Controlul biologic al coleopterelor curculionoide: probleme și realizări”.

Capitolul cuprinde analiza referințelor bibliografice cu privire la coleopterele curculionoide, dăunători ai culturilor agricole, fiind argumentată importanța grupului de dăunători inclus în studiu. Este analizată importanța economică crescândă a culturilor agricole din familia *Fabaceae* în plan global, regional și local. De asemenea sunt aduse argumente privind importanța economică a speciilor *Sitona lineatus*, *Hypera postica* și *Protapion apricans*, dăunători semnificativi ai culturilor de *Fabaceae*.

Sunt discutate metodele utilizate în combaterea coleopterelor curculionoide dăunătoare. Astfel este subliniat faptul, că insecticidele chimice rămân a fi cea mai practicată metodă de combatere a insectelor dăunătoare. Acestea se utilizează extensiv, chiar dacă sunt cunoscute efectele adverse ale acestora asupra sănătății umane și mediului ambiant. Este prezentată o analiză a strategiilor alternative de gestionare a dăunătorilor, care presupun readucerea în atenția cercetătorilor a metodelor fizico-chimice, agrotehnice, genetice și biologice de control al dăunătorilor. Experiența practică a fermierilor și rezultatele științifice confirmă că utilizarea combinată a metodelor preventive și directe de control a organismelor dăunătoare este cea mai

eficientă. Controlul biologic face parte din grupul metodelor directe de control al dăunătorilor, care presupune utilizarea altor organisme în reducerea efectivului numeric al organismelor dăunătoare sub pragul economic de dăunare. Controlul biologic este recunoscut drept element important al strategiilor de Management Integrat al Organismelor Dăunătoare (IPM) care poate asigura sustenabilitatea agriculturii, siguranța economică și alimentară.

Este realizată o analiză a principalilor agenți de control biologic utilizați împotriva insectelor, sunt prezentate date recente privind agenții de control biologic al coleopterelor curculionoide, fiind aduse argumente cu privire la avantajele utilizării fungilor în calitate de agenți de control biologic al speciilor *S. lineatus, H. postica* și *P. apricans*.

De asemenea este discutată biotehnologia producerii și aplicării preparatelor insecticide fungice, sunt comparate formulele biopesticidelor cel mai des aplicate și disponibile pe piață, ingredientele utilizate, avantajele și dezavantajele acestora, fiind puse în evidență cele mai frecvent utilizate formule pentru preparatele insecticide fungice. La sfârșitul capitolului este formulată problema de cercetare și direcțiile de rezolvare a acesteia, sunt definite scopul și obiectivele prezentei lucrări.

Capitolul 2 „Materiale și metode"

Capitolul conține descrierea obiectelor de studiu și a metodelor utilizate pentru realizarea cercetărilor. Sunt prezentate informații cu privire la biologia și ecologia dăunătorilor *S. lineatus*, *H. postica* și *P. apricans* și a speciilor de fungi entomopatogeni, necesare pentru elaborarea procedeului de obținere și aplicare a preparatului entomopatogen natural.

Cercetările au fost realizate în cadrul Laboratorului de Sistematică și Filogenie Moleculară din cadrul Centrului de Cercetare a Invaziilor Biologice a Institutului de Zoologie. Pentru realizarea lucrării au fost utilizate metode clasice și moderne de colectare și identificare a insectelor. Confirmarea corectitudinii identificării speciilor a fost realizată prin consultarea materialului Muzeului de Entomologie al Institutului de Zoologie. Identificarea apartenenței specifice a coleopterelor curculionoide a fost efectuată cu utilizarea lupei binoculare BEL Photonics.

Tulpinile fungice au fost izolate și evidențiate în cultură pură folosind metode clasice microbiologice cu utilizarea mediilor nutritive selective. Pentru identificarea tulpinilor fungice au fost utilizate metode clasice microbiologice de identificare (morfo-culturale) și metode molecular-genetice de identificare (extragerea ADN, realizarea reacției PCR, secvențierea ADN, reconstruirea arborilor filogenetici). Pentru a selecta tulpinile producente au fost utilizate metode de estimare a susceptibilității insectelor țintă la infecția cu tulpinile fungice entomopatogene (fiind

cuantificate conidiile în inocul, evaluată viabilitatea conidiilor, testată activitatea insecticidă a tulpinilor fungice în condiții controlate și determinată activitatea insecticidă a tulpinilor selectate).

Pentru a caracteriza tulpinile fungice, care au demonstrat potențial insectidic maximal în condiții de laborator, prognoza eficiența contra speciilor de insecte testate în condiții de câmp și propune procedeul de producere a preparatului insecticid au fost întreprinse un șir de investigații suplimentare. A fost studiat efectul temperaturii și a radiațiilor UV asupra creșterii și dezvoltării tulpinilor fungice. A fost determinată influența pH-ului, salinității mediului nutritiv, presiunii osmotice asupra creșterii vegetative, sporulării și viabilității conidiilor. A fost evaluată influența temperaturii, radiațiilor UV, pH-ului, salinității mediului ambiant și presiunii osmotice asupra cantității de conidii produse și viabilității conidiilor după păstrare îndelungată. Pentru analiza succesiunilor nucleotidice au fost aplicate programul de căutare BLAST, programele de calcul TreePuzzle 5.2, PhyML v3.0 şi MEGA 7.0. Pentru prelucrarea, analiza și interpretarea datelor au fost utilizați parametrii statistici precum media aritmetică, amplitudinea, abaterea medie, dispersia, abaterea standard, efectuat calculul intervalelor de încredere și analiza ANOVA. Pentru efectuarea calculelor matematice și interpretarea grafică a rezultatelor obținute au fost utilizate aplicațiile Microsoft Office Excel și Microsoft Office Power Point.

Capitolul 3 „Microflora fungică a speciilor de coleoptere curculionoide investigate"

Capitolul prezintă rezultatele cercetărilor privind izolarea, identificarea și caracterizarea comunităților fungice din microflora speciilor, utilizând metode clasice și molecular-genetice. Astfel în microflora speciilor *Sitona lineatus* L., *Hypera postica* (Gyll.) și *Protapion apricans* (Hbst.) au fost identificate 55 tulpini fungice, ce aparţin la 23 specii şi 3 încrengături (Ascomycota, Basidiomycota şi Mucormycota). În rezultatul reconstituirii arborelui filogenetic în baza secvenței parțiale a genei ARNr 18S în microflora fungică a speciilor *Sitona lineatus, Hypera postica* și *Protapion apricans* au fost identificaţi 17 reprezentanţi din clasa Dothideomycetes, 3 din ordinul Dothideales, 5 din ordinul Capnodiales și 9 din ordinul Pleosporales; 12 reprezentanți din clasa Sordariomycetes, 1 din ordinul Sordariales, 1 din ordinul Xylariales și 10 din ordinul Hypocreales; 5 reprezentanți din clasa Eurotiomycetes, ordinul Eurotiales, 4 reprezentanți din clasa Saccharomycetes, ordinul Saccharomycetales, doi reprezentanți din ordinul Mucorales și câte 1 reprezentant din ordinele Sporidiobolales și Tremellales.

Pentru fiecare specie fungică identificată este prezentat arborele filogenetic reconstituit, date privind particularitățile morfologice și importanța practică a acesteia. Sunt prezentate date noi privind identificarea speciilor *Beauveria bassiana*, *Beauveria* spp., *Isaria fumosorosea* și *Isaria* sp. cu potenţial în controlul biologic al dăunătorilor. De asemenea sunt necesare investigaţii

detaliate privind prorpietățile insecticide al tulpinilor din speciile *Aspergillus flavipes* și *Penicillium brevicompactum*.

În baza rezultatelor obţinute speciile de insecte investigate au fost atestate ca potenţiali vectori ai micromicetelor fitopatogene. În rezultatul cercetărilor efectuate au fost puse bazele colecției naționale de tulpini de fungi cu potențial insecticid, care urmează a fi valorificate în scopul satisfacerii cererii pieței locale în biopreparate de combatere a dăunătorilor prietenoase mediului ambiant.

Capitolul 4 „Elaborarea procedeului de producere și aplicare a agenților fungici de control biologic al coleopterelor curculionoide"

Capitolul reflectă datele cu privire la selectarea agentului de control biologic cu proprietăți avantajoase și elaborarea biopreparatelor insecticide în baza tulpinilor autohtone de *Beaueria bassiana*. În acest scop a fost caracterizată patogenitatea şi virulența tulpinilor autohtone noi izolate de *Beauveria bassiana*, fiind selectată o tulpină cu activitate insecticidă sporită. Tulpina a fost depozitată în colecția Națională de Microorganisme Nepatogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie în baza ei fiind obținut brevetul de invenție MD 4560 „Tulpina de fungi *Beauveria bassiana* în calitate de bioinsecticid pentru combaterea coleopterelor curculionide". Datele denotă că tulpina de fungi propusă *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01 posedă o activitate insecticidă pronunțată asupra coleopterelor curculionoide și poate fi utilizată în calitate de agent biologic în controlul efectivului lor numeric. Tulpina a fost extrasă din mediul natural, nu este patogenă pentru plante şi organismele homeoterme. Totodată în natură va fi introdusă o cantitate de 100 de ori mai mică de spori, comparativ cu cea mai apropiată soluție, obținând o mortalitate de 100% într-o perioadă mai scurtă de timp. Activitatea insecticidă a celorlalte tulpini de micromicete urmează a fi explorată, folosind un spectru mai larg de gazde potențiale.

În rezultatul analizei datelor privind creșterea și dezvoltarea tulpinii *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01 la diferite temperaturi, valori ale pH, concentrații de NaCl, valori ale presiunii osmotice, reacția la iradierea cu raze UV, a fost prognozat comportamentul tulpinii la aplicarea în condiții de câmp, fiind discutate posibilele formule ale preparatului și selectate metodele de producere în masă. Pentru atingerea efectului scontat vor fi necesare aplicări repetate ale tulpinii fungice ajustate, ținând cont de viabilitatea acesteia la diferite temperaturi. În formula biopreparatului a fost selectat agentul potențial, care va preveni umectarea și va extinde termenul de păstrare și viabilitatea tulpinii în teren deschis. Pentru a evita stresul cauzat de radiațiile UV, formula preparatului va prevede utilizarea unor substanțe cu rol de protecție. Preparatul urmează

a fi aplicat dimineața devreme, fiind analizată posibilitatea aplicării preparatului sub formă de tratament al semințelor. De asemenea la aplicarea tulpinii se va ține cont de ajustarea dozei în funcție de pH-ul solului la adâncimea 0-40 cm, în funcție de salinitatea solului.

Tulpina fungică *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01 posedă proprietăți favorabile pentru a fi aplicată în calitate de agent de control biologic al speciei *Sitona lineatus* în culturile de leguminoase pe teritoriul Republicii Moldova. Drept rezultat este propus procedeul de obținere și aplicare a preparatului insecticid natural pe baza tulpinii de fungi *B. bassiana* CNMN-FE-01.

Compartimentul „Concluzii generale şi recomandări” prezintă o formă rezumativă a principalelor rezultate științifice obținute și exprimă valoarea practică a lucrării prin recomandările înaintate.

Compartimentul „Bibliografie” conține cele 536 surse citate în teză.

Compartimentul „Anexe” prezintă un brevet de invenții; un pașaport al tulpinii fungice, 2 acte de implementare a rezultatelor științifice; diplomele și mențiunile privind recunoașterea și aprecierea rezultatelor științifice în cadrul manifestărilor științifice naționale și internaționale.

1. CONTROLUL BIOLOGIC AL COLEOPTERELOR CURCULIONOIDE: PROBLEME ȘI REALIZĂRI

1.1 Coleopterele curculionoide dăunători ai culturilor agricole

Productivitatea culturilor agricole este compromisă de un număr mare de factori, inclusiv organismele dăunătoare. Printre acestea insectele provoacă daune considerabile, distrugând anual aproximativ 20% din producția agricolă mondială chiar dacă sunt aplicate măsuri de protecție a plantelor (Volosciuc 2015, Moldovan 2019).

Reprezentanții suprafamiliei Curculionoidea (Coleoptera), sunt unii dintre cei mai periculoşi dăunători ai plantelor de cultură în lume (Perju 1995, Ghizdavu 1997, Keskin, Ozkaya 2015, Carcamo 2015, Urban 2015) numărând mai mult de 200 mii specii. În cadrul acestei suprafamilii ce mai numeroasă familie este Curculionidae, cu aproximativ 51 mii de specii descrise din 4600 genuri cunoscute în întreaga lume (Oberprieler 2014, Shin 2017).

Primele mențiuni despre coleopterele curculionoide din Republica Moldova aparțin secolului XVIII. Astfel, Dimitrie Cantemir în lucrarea sa „Descrierea Moldovei" menționează dauna gândacilor cari (Coleoptera, Curculionidae, Scolytinae), provocată stejarului. Cercetările orientate au demarat la sfârşitul sec. XIX - începutul sec. XX, în legătură cu necesitatea cunoașterii biologiei unor dăunători periculoși ai plantelor și căutării metodelor de combatere a lor (Rekalo 1888, Zabrinskiy 1890, Bezval 1912, Vitkovskiy 1913, Krasilshchik 1916, Vereshchagin 1968 ș.a.). Informații despre răspândirea unor specii de curculionoide pe teritoriul Republicii Moldova sunt prezentate şi în alte lucrări fundamentale „Vrediteli lesa" (Lukyanovich, Ter-Minasyan 1955), „Opredelitel' nasekomyh evropejskoj chasti SSSR" (Arnoldi, Zaslavskiy, Ter-Minasyan 1965) „Nasekomye i kleshhi – vrediteli sel'skohozjajstvennyh kul'tur" (Arnoldi, Ter-Minasyan, Solodovnikova 1974), şi în unele publicaţii cu subiect specific (Petrukha 1969, Dieckmann 1982, Korotyaev 1990, Poiras 2006). În fauna coleopterelor curculionoide a Republicii Moldova până în prezent au fost evidențiate 683 specii din 212 genuri, cea mai numeroasă fiind familia Curculionidae (521 specii, ceea ce reprezintă 76,3% din numărul total de specii), urmată de familia Apionidae (88 specii, 12,9%) (Poiras 2006).

Majoritatea speciilor de curculionoide sunt fitofagi, preponderent oligofagi sau monofagi, având un spectru trofic extrem de divers și unic. De obicei reprezentanții acestui grup se hrănesc cu diverse organe ale plantelor inclusiv mugurii, frunzele, semințele, fructele, tulpina, rădăcina, și de asemenea scoarța și lemnul. Cel mai mare număr de specii a fost observat pe plantele din familiile *Fabaceae*, *Rosaceae*, *Asteraceae*, *Fagaceae*, *Brassicaceae* și *Salicaceae* (Poiras 2006).

Leguminoasele (*Fabaceae, Leguminosae*) se clasează pe locul doi după familia *Poaceae* privind importanța economică. Un număr mare de plante leguminoase, astfel ca mazărea (*Pisum*), fasolea (*Phaseolus*), bobul (*Vicia*), fasolița (*Vigna*), soia (*Glycine*), lintea (*Lens*), constituie o sursă semnificativă de proteine de origine vegetală. Soia (*Glycine*) este de asemenea sursă de grăsimi. În calitate de plante furajere sunt cultivate trifoiul (*Trifolium*) și lucerna (*Medicago*), de asemenea reprezentanții acestor genuri sunt cultivați și în calitate de fertilizanți naturali. Reprezentanții leguminoaselor sunt utilizați de asemenea ca sursă de fibre, condimente și în calitate de plante decorative (Bennett 2011). Leguminoasele înregistrează o tendință pozitivă: din 2013, producția aproape s-a triplat în Uniunea Europeană și a ajuns la 6 milioane de tone (2,6 mln. ha) în 2018. Principalele leguminoase sunt mazărea de câmp și bobul, în timp ce lintea și năutul sunt cultivate doar pe suprafețe limitate. Franța, Spania și Lituania sunt principalii producători de mazăre de câmp. În Republica Moldova, conform datelor prezentate de Biroul Național de Statistică, în perioada anilor 2008-2018, suprafața terenurilor agricole cultivate cu leguminoase pentru boabe a oscilat între 28- 41 mii ha, iar suprafața terenurilor ocupate de plante de nutreț între 71-54 mii ha. De asemenea, se observă o creștere pozitivă a recoltei medii a leguminoaselor pentru boabe de la 1,3 t/ha în 2008 până la 2 t/ha în 2017 cu o scădere la 1,2 t/ha în 2018 (Anuarul Statistic al Republicii Moldova 2019).

Printre leguminoase genul *Pisum* cuprinde specii de plante ierboase anuale de origine asiatică și nord-africană, genul conține cinci specii, printre acestea mazărea (*Pisum sativum* L.) este cultivată pentru boabe și semințe. Boabele de mazăre fiind bogate în proteină (20-35%) şi amidon (30-50%), sunt folosite în hrana oamenilor în stare verde sau conservate, dar şi ca boabe uscate. Paiele de mazăre, bogate în proteină (6-10%), se folosesc la furajarea oilor. Cultura de mazăre lasă solul bogat în azot (80-100 kg/ha), eliberând terenul devreme. Având rădăcină pivotantă ce pătrunde adânc în sol (100 cm) şi cu capacitate de solubilizare a compușilor greu solubili de fosfor şi calciu, ea poate valorifica apa şi nutrienții dintr-un volum mare de sol şi aduce la suprafață compuși de fosfor şi calciu necesari culturilor post-mergătoare (Starodub 2008). Din suprafața totală cultivată cu mazăre (atât pentru consum în stare proaspătă cât și uscată), 4,5 mln. ha revin Asiei cu recolta medie de 9,3 t/ha mazăre verde și 1,13 t/ha mazăre uscată; urmată de Europa cu 3,0 mln. ha, recolta medie 5,3 tone/ha mazăre verde și 1,38 tone/ha mazăre uscată (dintre care 2,2 mln. ha sunt cultivate în Europa de Est, cu o recoltă medie de 4,3 t/ha mazăre verde și 1,14 t/ha mazăre uscată) și America de Nord cu 1,8 mln ha, recolta medie 4,8 t/ha mazăre verde, 1,36 t/ha mazăre uscată (1,4 mln. ha fiind cultivate în Canada) (FAO, FAOSTAT 2019).

Producțiile medii de mazăre obținute în România sunt în jur de 1,5 t/ha, dar în condițiile aplicării unor tehnologii corespunzătoare se pot obține 2-4 t/ha. În Franța se realizează curent

producții medii pe țară de peste 4 t/ha. Din producția totală a plantelor, boabele reprezintă 35-50%. În Republica Moldova suprafața însămânțată cu mazăre verde a scăzut de la 3,1 mii ha la 2,2 mii ha în anii 2010-2018, pe când productivitatea a crescut de la 2,7 la 3,96 t/h cu o scădere în 2018 la 2,23 t/ha. Suprafața totală de leguminoase pentru boabe în perioada respectivă este în creștere, datele nefiind dezagregate după culturi (Anuarul Statistic al Republicii Moldova 2019).

Genul *Medicago* cuprinde specii de plante anuale și perene, utilizate în calitate de furaje atât în zonele temperate cât și tropicale. Printre acestea lucerna (*Medicago sativa* L.) este o specie perenă cultivată în multe țări ca cel mai important furaj pentru perioada de iarnă (Chandra 2009), cu suprafața anuală de cultivare de aproximativ 30 mln. ha (Kechang, Ping, Cash 2009, Tohidfar et al. 2013). Lucerna este o cultură avantajoasă fiind o leguminoasă perenă, se exploatează 3-5 ani, realizează producții mari de furaj (14-20 t substanță uscată la hectar, în sistem intensiv), are un conținut ridicat de proteină brută (19-20% P.B. din S.U.). Lucerna are un rol important în asolament ca solă amelioratoare, lăsând în sol cantități importante de azot fixat pe cale simbiotică (Schitea 2010). Această cultură este bine cunoscută pentru producția de biomasă bogată în nutrienți. Este o sursă alimentară importantă pentru animale, deoarece este îmbogățită cu proteine, calciu, fosfor și vitamine (A, B și D) (Sharma, Kumar, Bhatnagar 2011). Consumul mondial anual de biomasă de lucernă în 2018 a constituit în jur de 197,8 mln. tone (Mordor Intelligence. Alfalfa hay market - growth, trends, and forecast 2020 - 2025). Din suprafața totală cultivată cu lucernă, 41% (11,9 mln. ha) au revenit Americii de Nord, alte 25% (7,12 mln. ha) au revenit Europei, 23% - Americii de Sud (7 mln. ha) și 8% - Asiei (2,23 mln. ha), restul suprafeței a revenit Africii și Oceaniei. Conform datelor ultimilor ani cel mai mare producător de lucernă a fost SUA, suprafața cultivată fiind de aproximativ 6,9 mln. ha (Gardner, Putam 2018), urmată de China (4,7 mln. ha și producție de 1,4 mln. t) (Lu 2018), Canada (3,7 mln. ha) (Gardner, Putam 2018), Australia (3-3,5 mln. ha) (Humphries et al. 2018), Argentina (3,2 mln. ha) (Basigalup et al. 2018). În Franța lucerna se cultivă pe aproximativ 600 mii ha, cu recolta medie de 12 t/ha (Beguier et al. 2018). În România, lucerna este principala plantă furajeră, suprafața ocupată cu această cultură, în perioada 2012-2018, a oscilat între 337,8 - 408,7 mii ha (Anuarul statistic al României 2019). În Republica Moldova, în perioada anilor 2008-2018 suprafața terenurilor ocupate de plante de nutreț a oscilat între 71-54 mii ha (Anuarul Statistic al Republicii Moldova 2019).

Genul *Trifolium* conține aproximativ 300 specii cu răspândire cosmopolită și cu cea mai mare diversitate în zonele temperate; pot fi plante anuale, bienale sau perene. Valoroase din punct de vedere economic sunt considerate trifoiul-roșu (*Trifolium pratense* L.) și trifoiul-alb (*Trifolium repens* L.). În prezent, trifoiul roșu se cultivă pe toate continentele chiar dacă are o plasticitate ecologică inferioară lucernei, ocupând o suprafață de circa 15 mln. ha, din care aproximativ o

treime în SUA. Trifoiul roşu se foloseşte în hrana animalelor sub formă de masă verde, fân, făină de fân sau nutreț însilozat. Recoltat la înflorire, fânul de trifoi conține circa 14,5% proteină brută, 20,4% celuloză brută, 22-26 mg caroten/kg furaj și cantități însemnate de vitamine. În Republica Cehă, trifoiul roșu, este una dintre cele mai răspândite culturi furajere. Aceasta este cultivată pentru producția de furaje verzi și material săditor (Kolarik, Rotrekl 2013). Trifoiul roşu prezintă importanţă deosebită şi în ameliorarea unor însușiri ale solului, acțiunea de refacere a structurii solului fiind mai mare decât la lucernă.

Pierderile anuale în recolta leguminoaselor cauzate de boli, dăunători și buruieni constituie aproximativ 37%, dintre acestea 10-15% sunt provocate de insectele dăunătoare, datele fiind incomplete, deoarece problema calității furajului nu este luată în considerație (Cristea 2002).

Plantele leguminoase sunt gazde pentru diverse specii de artropode. Conform unor studii în SUA peste 1000 specii de artropode sunt trofic atașate de fabacee. Dintre acestea, 100-150 specii cauzează daune economice, și doar câteva dintre ele, pot fi considerate dăunători cheie, restul fiind de importanță locală sau sporadică, fitofagi accidentali, entomofagi (parazitoizi și prădători) sau polenizatori. Insectele provoacă daune nu doar părților aeriene ale plantelor și semințelor, dar afectează, de asemenea, persistența și longevitatea câmpurilor. Dăunătorii cheie ai fabaceelor în SUA sunt *Hypera postica* (Gyll.) (Coleoptera), precum și un complex de dăunători hemipteri (Hemiptera), precum *Empoasca fabae* (Harris), *Therioaphis maculata* (Buckton), *Acyrthosiphon pisum* Harris, *A. kondoi* Shinji., *Spissistilus festinus* (Say), *Philaneus spumarius* (L.). În producția de semințe, pierderi importante pot fi cauzate de *Lygus hesperus* (Knight) și *L. elisus* Van Duzee (Hemiptera), *Bruchophagus roddi* Gussakovskiy (Hymenoptera) și *Otiorhynchus ligustici* L. (Coleoptera: Curculionidae). În Europa leguminoasele sunt atacate de un spectru larg de dănători, printre care menționăm speciile din genul *Sitona, Otiorrhynchus ligustici, Phytonomus transsylvatiicus* Petri, *Tychius flavus* Beck. (Coleoptera, Curculionidae), *Aphis craccivoru* Koch. *Therioaphis trifolii* Mon, *Adelphocoris lineolatus* Goeze, (Hemiptera), *Contarinia medicaginis* Kieff. (Diptera), *Bruchophagus roddi* Guss (Hymenoptera), *Chloridea viriplaca* Hfn. (Lepidoptera) ș.a. Cercetările efectuate în câmpurile de lucernă pe teritoriul Republicii Moldova, au evidențiat faptul că curculionidele reprezintă cea mai numeroasă familie, fiind identificate 22 specii aparținând la 12 genuri (Munteanu et al. 2014a). Speciile *Sitona lineatus* L., *Hypera postica* (Gyll.) și *Protapion apricans* (Hbst.) au fost atestate drept dăunători semnificativi ai culturilor de *Fabaceae* (Munteanu et al. 2012, Hotărârea Guvernului Republicii Moldova Nr. 123 din 02.02.2018).

Speciile *Sitona lineatus*, *Hypera postica* și *Protapion apricans*, sunt de origine Palearctică, iar potenţialul expansiv al acestora a crescut remarcabil în ultimii ani (Botha, Hardie, Casella

2004). În America de Nord specia *S. lineatus* a fost pentru prima dată identificată în 1936 în statele Victoria, Columbia Britanică și Canada (Downes 1938). Ulterior specia s-a răspândit spre Sud şi s-a stabilit în Washington, Oregon, California de Nord, Idaho de Nord-Vest şi alte regiuni din Nord-Vestul SUA (Hoebeke, Wheeler 1985). De asemenea specia și-a extins arealul de răspândire în Africa de Nord și orientul apropiat (Turcia, Georgia, Armenia, Azerbaidjan, Liban, Siria, Israel, Iordan, Peninsula Sinai, Peninsula Arabă, Iran și Irak) (Fauna Europaea, *Sitona lineatus*). Cât privește specia *Hypera postica,* aceasta a fost introdusă în Nearctica la începutul anilor 1900 (Zahiri et al. 2014). Insecta s-a răspândit în părţile de vest și de sud ale Asiei, Africa de Nord, (Hsiao 1993) și Japonia (Okumura, Shiraishi 2002). Deși au fost raportați numeroși factori biotici de mortalitate pentru această specie, ea persistă în plantațiile de lucernă în majoritatea țărilor în care această cultură este cultivată (Khanjani 2005, Zahiri et al. 2014). Specia *Protapion apricans* este răspândită pe o parte semnificativă din regiunea Palearctică, cu excepția tundrei și deșerturilor din Finlanda. Specia s-a răspândit în Orientul Apropiat (Turcia asiatică, Republicile Ruse din Caucaz, Georgia, Armenia, Azerbaidjan, Lebanon, Siria, Israel, Iordan, Peninsula Sinai (Egipt), Peninsula Arabă, Iran și Irak) (Fauna Europaea, *Protapion apricans*).

Sitona lineatus. Hrănirea insectelor adulte cu frunze primăvara poate distruge materialul săditor şi plantele tinere. Forma "U" caracteristică a crestăturilor este rezultatul hrănirii adulţilor iar în cazul infestărilor severe, mugurii de creștere pot fi distruși complet (Jackson 1920). Hrănirea adulţilor limitează capacitatea fotosintetică a leguminoaselor, în consecință se reduce capacitatea de a produce organe reproductive sau nodozitățile rădăcinii de sprijin (Havlickova 1982, Williams, Schotzko, O'Keeffe 1995). Gradul de deteriorare a plantelor gazdă primare în timpul hrănirii adulţilor primăvara depinde de momentul de atac şi de densitatea gărgăriţelor (Williams, Schotzko, O'Keeffe 1995, 1998). Reducerea suprafeţei fotosintetizante, datorită defolierii, constituie 50% în momentul de răsărire a plantelor, şi 35% atunci când defolierea începe cu o săptămână mai târziu. În lipsa compensării nutrienților, defolierea poate reduce numărul de păstăi pe plantă (Williams, Schotzko, O'Keeffe 1995, 1998). Prejudiciul adus de către adulți plantelor gazdă nu se limitează doar la defoliere. Astfel, *S. lineatus* a fost identificată ca vector al ofilirii bacteriene (*Clavibacter michiganensis* ssp. *insidiosus*) la cultura de lucernă (Kudela, Havlickova, Vacke 1984). Larvele au un habitat criptic și deteriorează semnificativ nodozităţile rădăcinii (Jackson 1920, George 1962, Bardner, Fletcher 1979). Rata maximală de distrugere a nodozităților coincide cu faza de înflorire (Jackson 1920). În studiile întreprinse larvele au deteriorat între 40 şi 98% dintre nodozități, în special cele de pe rădăcină principală (Verkleij, van Amelsvoort, Smits 1992, Carcamo, Vankosvky 2011). Prin distrugerea nodozităţilor larvele cauzează pierderi economice mult mai mari decât defolierea cauzată de adulți (Hunter 2001, Corre-Hellou, Crozat 2005).

Deteriorarea rădăcinii poate face plantele mai sensibile la infecțiile secundare și modifică echilibrul de azot dintre rădăcini și structurile supraterane (Hunter 2001). Distrugerea nodozităților rădăcinii induce pierderea cantității de azot din semințe și reduce cantitatea de azot care ajunge în sol, în special dacă momentul de atac coincide cu fazele inițiale de înflorire (Dore, Meynard 1995, Corre-Hellou, Crozat 2005, Carcamo et al. 2015, Carcamo et al. 2018). Atunci când daunele cauzate de *S. lineatus* cresc, cantitatea de azot provenită prin fixarea acestuia scade (Corre-Hellou, Crozat 2005), ceea ce contribuie la scăderea cantității de azot disponibil în sol pentru culturile ulterioare (Dore, Meynard 1995, Carcamo et al. 2015). Pragul economic de dăunare recomandat constituie de la 0,3 până la 1 adult per plantulă (Antonelli et al. 1985). Dacă numărul mediu de plantule cu frunzele din vârf deteriorate depășește 30%, dăunătorul prezintă risc pentru recoltă și este necesar de a interveni cu măsuri de control (Carcamo, Vankovsky 2011, Carcamo et al. 2018).

Hypera postica. Atât larvele cât și adulți speciei *H. postica* provoacă daune considerabile părților vegetative ale leguminoaselor. Câmpurile puternic infestate par argintii sau chiar albe, din cauza defolierii severe. Adulții și larvele în număr mare pot deteriora tulpinile, frunzele și mugurii împiedicând regenerarea (Fick 1976, Reddy et al. 2018, Yucel et al. 2018, Nikolova 2018). Efectele reziduale ale leziunilor severe provocate de dăunător pot reduce creșterea plantei, drept rezultat scade randamentul recoltelor ulterioare (Fick, Liu 1976, Radcliffe, Flanders 1998). Cele mai grave vătămări au loc la prima recoltă de lucernă (Fick, Liu 1976, Nikolova 2018), cu toate acestea, din cauza infestărilor severe, a doua recoltă de asemenea poate fi afectată de hrănirea larvelor și adulților din mirișe (Fick 1976, Nikolova 2018). Prejudiciile provocate de specia *H. postica* pot duce la scăderea masei verzi a plantei și randamentului calității furajelor. Severitatea distrugerii culturii depinde de densitatea dăunătorilor și stadiul de dezvoltare a plantelor, în momentul de infestare (Koehler, Pimentel 1973, Koehle, Rosenthal 1975, Shade, Hintz 1983). Cu cât mai devreme planta este atacată, cu atât mai mare este impactul produs de larve în timpul hrănirii. Odată cu dezvoltarea suficientă a plantei, aceasta poate tolera defolierea, iar nivelul scăzut al populației dăunătorului (< 3 larve pe plantă) poate avea chiar un efect pozitiv asupra culturii prin stimularea creșterii vegetative (Weaver, Balasko, Townsend 1993). Prin urmare, nivelurile de prejudiciu economic pentru lucernă provocate de *H. postica* sunt dificil de calculat, și se bazează în principal pe înălțimea tulpinii plantei în momentul infestării (Koehler, Pimentel 1973, Koehler, Rosenthal 1975, Kuhar, Youngman, Laub 2000). Conform unor studii pragul economic de dăunare pentru specia *H. postica* constituie 1,5 până la 3 larve per tulpină sau 20 larve per plantă. Cu toate acestea, pragurile economice reale pot fi mai mici sau mai mari decât aceste valori fiind util de a le estima în baza costurilor suportate pentru produsele de uz fitosanitar și prețul lucernei pe piață (Pellissier, Nelson, Jabbour 2017). Specia *H. postica*, este considerată un dăunător considerabil al

plantelor de cultură și a dus la pierderi economice semnificative în întreaga lume. Daunele cauzate de acest dăunător în prima recoltă pot atinge 50-70 % (Khanjani 2005). Pe de altă parte, lipsesc programele de creare a soiurilor de lucernă rezistente la *H. postica*, din cauza variației genetice insuficiente a plantei și lipsei datelor privind genele responsabile de rezistență (Tesfaye, Samac, Lamb 2009, Tohidfar et al. 2013). În cazul speciei *H. postica* preferința pentru lucernă este atât de mare încât culturile gazdă secundare nu vor fi vătămate, atât timp cât lucerna cultivată alături de acestea în câmp (Campbell et al. 1975).

Protapion apricans. În cazul speciei *Protapion apricans* cele mai mari daune sunt de asemenea provocate de larve. Acestea vătămează mugurii foliari, cei florali, semințele și distrug ovarele florilor. Pe parcursul dezvoltării sale larva consumă în jur de 5-11 ovare. Pierderile de flori de trifoi roșu pot ajunge la 80%, iar pierderile de semințe 50%. Primăvara, înainte de depunerea pontei, insectele adulte se hrănesc cu frunze și mugurii auxiliari. Larvele care se dezvoltă pot provoca daune serioase prin roaderea galeriilor în tulpini. Pragul economic de dăunare pentru trifoiul roșu variază între 4-10 adulți pe m^2. O densitate a insectei egală cu 2-3,5 indivizi per plantă implică necesitatea de a interveni cu măsuri fitosanitare de control (Kolarik, Rotrekl 2013).

Din păcate, în sistemele agricole de producție a leguminoaselor, dăunătorilor le este acordată o atenție nesemnificativă. Studiile întreprinse în anii 2014- 2016 au arătat că neglijarea problemei în cauză a condus la creșterea considerabilă a populațiilor speciilor de insecte dăunătoare (Munteanu et al. 2014a, Munteanu Molotievskiy, Bacal, Moldovan 2015).

1.2 Metode utilizate în combaterea coleopterelor curculionoide dăunătoare

Dovezile științifice demonstrează faptul că insectele au existat pe Pământ cu mult înainte de apariția speciei umane. O dată cu dezvoltarea agriculturii o preocupare tot mai mare a devenit de a proteja plantele de dăunători. În acest scop au fost dezvoltate diverse metode de combatere printre care evidențiem metodele fizico-mecanice, agrotehnice, genetice, chimice și biologice.

Utilizarea insecticidelor chimice rămâne a fi cea mai practicată metodă de combatere a insectelor dăunătoare, fiind avantajoasă datorită costurilor reduse și spectrului larg de dăunători afectați. Pe parcursul timpului împotriva speciei *Sitona lineatus* au fost utilizate numeroase insecticide chimice din grupul organofosfaților (forat), carbamaților (aldicarb, carbofuran, carbosulfan, ben-furacarb, bendiocarb, furatiocarb), piretroizilor (lambda-cihalotrin, permetrin, beta-ciflutrin) și neonicotinoidelor (imidacloprid, tiametoxam, clotianidin) (Horak, Buryskova 1980, King 1981, Bardner, Fletcher, Griffiths 1983, Griffiths, Bardner, Bater 1986, Ester, Jeuring 1992, Steene et al. 1999, Rotrekl, Cejtchaml 2008, Vankosky, Carcamo, Dosdall 2009-2011). Investigarea produselor chimice cu potențial de a fi utilizate în controlul speciei *S. lineatus* s-a

axat pe identificarea celor mai eficiente insecticide şi proceduri de aplicare. Insecticidele foliare pot reduce numărul de adulţi şi proteja roada (Bardner, Fletcher, Griffiths 1983). Aplicaţiile foliare nu au efecte directe asupra larvelor, dar aplicarea în timp util poate scădea populațiile de adulți, producția de ouă și populațiile eventuale ale larvelor (Steene et al. 1999). Spray-urile foliare trebuie să fie aplicate cât mai rapid după detectarea insectelor, în scopul de a controla populațiile larvare, deoarece adulții reușesc să se împerecheze şi femelele depun ouă la scurt timp după sosire. Dacă sunt aplicate prea târziu, depunerea pontei nu este împiedicată, iar eforturile de control nu vor avea impact asupra populațiilor larvare (Bardner, Fletcher, Griffiths 1983, Ester, Jeuring 1992). Utilizarea tratamentelor insecticide a semințelor pentru a proteja rădăcinile leguminoaselor anuale şi de a furniza o protecţie sistemică a frunzişului au avut un anumit succes (Seidenglanz et al. 2010, Carcamo, Vankovsky 2011). Controlul speciei *S. lineatus* poate fi realizat prin aplicarea tratamentelor seminciere însă beneficiile pot fi scăzute deoarece semințele au tendința de a se aglomera, reducând rata de însămânțare. Actualmente se recomandă aplicarea combinată a tratamentelor seminciere cu pulverizarea foliară (Wanner, 2016).

Împotriva speciei *Hypera postica* sunt eficiente următoarele insecticide: Imidan (fosmet), malation, Coragen 20 SC (clorantraniliprol), Cygon 480 CE/Lagon 480 E (dimetoat), Matador/Bug, Silencer 120 EC (lambda-cihalotrin). Larvele și adulții speciei pot fi controlați bine cu insecticide organofosforice, inclusiv, carbamați și piretroizi. Cu toate acestea, apariția unor insecticide organofosforice în apele de suprafață, în special clorpirifos (Lorsban ®), care coincide cu perioada aplicării insecticidelor contra dăunătorului, pune accent pe găsirea mijloacelor alternative în gestionarea speciei *H. postica* (Long et al. 2002). Mai mult de atât, insecticidele piretroide au dezavantajul de a fi non-selective. Studiile recente pun în evidență eficacitatea produsului fipronil (Solitaire WG 80%) care posedă spectru larg de acțiune dar este considerat mai puțin periculos deoarece este slab miscibil cu apa ceea ce ar putea reduce pătrunderea acestuia în apele subterane (Mohammadpour, Jafarlu, Soltani 2018).

Adulții speciei *Protapion apricans* perforează frunzele iar larvele distrug ovarele trifoiului. Astfel, pentru controlul speciei, pe piață sunt disponibile produse chimice precum Fastac 10 EC (alfa-cipermetrin), Decis 2.5 EC (delta-metrin), Polytrin 200 CE (cipermetrin), Karate 5 EC (lambda-cihalotrin), Cypermetrin 200CE, Fury 10 EC (zeta- cipermetrin), Sumialpha 5 CE (esfenvalerat), Bulldock 0.25 EC (beta-ciflutrin), Regent 200 CE (fipronil), Alphaguard 10 CE (alfa -metrin) care provoacă mortalitate de 91-100% în cazul adulților și 69-91% fiind aplicate împotriva larvelor (Bucurean 2008). În intenția de a identifica produse chimice mai puțin toxice pentru mediu au fost investigate astfel de produse ca Biscaya 240 (tiacloprid) și Mospilan 20 SP

(acetamiprid) care au demonstrat eficiență înaltă contra speciei *P. apricans* în condiții de teren (Kolarik, Rotrekl 2013).

Este cunoscut faptul că majoritatea compușilor chimici utilizați posedă un nivel înalt de toxicitate și prezintă un risc considerabil pentru sănătatea omului, în urma contactului direct în timpul aplicării și prezenței reziduurilor de pesticide în produsele alimentare și sursele de apă potabilă. Drept rezultat al consumului de produse alimentare nesănătoase se reduce randamentul muncii, apar dizabilități prelungite cu repercusiuni grave. De asemenea, pesticidele au un impact negativ asupra mediului, cât și asupra biodiversității (van der Werf 1996, Wilson, Tisdell 2001, Maroni, Fanetti, Metruccio 2006, Berny 2007, Pimentel 2007, Damalas, Eleftherohorinos 2011). Mai mult de 98% din insecticidele utilizate în afara speciei țintă atacă un spectru larg de organisme benefice (Miller 2004). Aplicarea insecticidelor chimice are efect negativ prin distrugerea populațiilor speciilor benefice, precum inamicii naturali ai dăunătorilor sau polenizatorii, și creșterea probabilității de dezvoltare a rezistenței dăunătorilor la produsul utilizat (Damalas, Eleftherohorinos 2011). Din cauza efectelor adverse unele din aceste produse (spre exemplu forat, aldicarb, carbofuran, carbosulfan ș.a) deja sunt interzise spre utilizare în mai multe state (Anexa III, Convenția de la Rotterdam). Drept rezultat au apărut noi tipuri de pesticide chimice, mai specifice și mai puțin persistente. În plan global, totuși, se constată o tendință de creștere a cantităților de pesticide chimice utilizate, inclusiv cele interzise (Lamberthm, Jeanmart, Luksch 2013, Nishimoto 2019).

Necesitatea identificării unei alternative insecticidelor chimice a stimulat interesul pentru elaborarea unor metode de control al dăunătorilor inofensive pentru om și mediu, readucând în atenția cercetătorilor metodele fizico-chimice, agrotehnice, genetice și biologice de control al dăunătorilor și plasând un accent tot mai mare pe elaborarea strategiilor de management integrat al dăunătorilor.

Monitorizarea regulată a culturilor agricole, pentru identificarea potențialilor dăunători, este indispensabilă unui management eficient al organismelor dăunătoare. Cea mai răspândită metodă de monitorizare este examinarea câmpului pe un traseu zig-zag sau sub forma literei M. Pentru a monitoriza insectele de asemenea pot fi utilizate capcane. Acestea sunt utilizate, în special, pentru detectarea prezenței insectelor care se deplasează rapid. Monitorizarea permite de a interveni la momentul oportun și de a preveni o daună considerabilă. Cercetările efectuate au sugerat faptul că capcanele cu feromoni de agregare ar putea fi eficiente pentru monitorizarea populaţiilor de densitate mică (Nielsen, Jensen 1993). În testările întreprinse, capcanele feromonale au asigurat monitorizarea eficientă a populaţiilor de insecte (Quinn et al. 1999). Studiile recente subliniază faptul că tipul capcanei, tipul recipientului pentru feromoni și locul

amplasării capcanelor influențează eficiența metodei (Reddy et al. 2018). Utilizarea capcanelor cu feromoni poate facilita aplicarea mai eficientă a insecticidelor foliare.

Un management eficient al organismelor dăunătoare presupune mai multe activități care se completează reciproc. Majoritatea practicilor de management sunt activități de lungă durată care au drept scop principal prevenirea impactului negativ prin menținerea populațiilor de organisme dăunătoare sub pragul economic de dăunare. Practicile de control, pe de altă parte, sunt activități de scurtă durată care urmăresc nimicirea organismelor dăunătoare. Metodele preventive sunt considerate prioritare comparativ cu metodele de control direct. Accentul urmează a fi plasat pe încurajarea proceselor biologice și a mecanismelor naturale de protecție. Soluția pentru problema dăunătorilor, sunt metodele non-toxice, care pot asigura sănătatea omului, în particular, și a mediului în ansamblu.

Managementul sustenabil al dăunătorilor presupune parcurgerea a trei etape: 1. asigurarea condițiilor bune de creștere și dezvoltare pentru culturi în scopul sporirii rezistenței acestora; 2. încurajarea mecanismelor naturale de control prin promovarea inamicilor naturali ai dăunătorilor; 3. aplicarea măsurilor de control direct pentru a distruge dăunătorii cu impact negativ minim asupra ecosistemului. Scopul acestei abordări este optimizarea măsurilor utilizate la etapele 1 și 2, încurajând mecanismele de autocontrol natural și minimizarea utilizării măsurilor de control direct (Etapa 3). Acest lucru reduce cheltuielile și previne impactul negativ al metodelor de control direct asupra agroecosistemului. Experiența practică a fermierilor și rezultatele științifice confirmă că utilizarea combinată a metodelor preventive și directe de control a organismelor dăunătoare, este cea mai eficientă (Moldovan 2018).

Etapa 1. Urmează a fi selectate acele varietăți/soiuri care sunt bine adaptate la condițiile locale de mediu (temperatură, aportul de nutrienți, buruieni, dăunători și boli), fiind mai rezistente la atacul dăunătorilor. Este necesar ca semințele să fie neinfectate, cu energie germinativă maximă, provenite din surse demne de încredere. Majoritatea dăunătorilor atacă planta la un anumit stadiu de viață. Este important ca acest stadiu de viață să nu corespundă cu perioada densității înalte a dăunătorului. Alegerea corectă a perioadei de semănat și plantat permite de a evita invazia în procesul de migrare, depunere a ouălor sau introducerea bolilor de către insectele vectori. De asemenea, permite de a sincroniza atacul cu inamicii naturali ai acestora, condițiile de mediu nefavorabile pentru dezvoltare sau prezența gazdelor alternative. Alegerea perioadei optime de semănat/plantat necesită cunoașterea ciclului de viață al organismelor dăunătoare. Astfel o tactică eficientă de control al dăunătorilor lucernei este recoltarea culturii primăvara devreme (Cassagrande, Stehr 1973) înainte de depunerea pontelor cu asigurarea unei recolte calitative. Recoltarea târzie de toamnă, de asemenea, poate ajuta la reducerea populațiilor de curculionoide

dăunătoare (Hilburn 1985). Păşunatul de iarnă poate avea un efect similar ca recoltarea târzie. Introducerea materiei organice în sol poate ajuta la controlul dăunătorilor prin suplinirea solului cu microorganisme patogene pentru insecte, şi activarea rezistenţei plantelor la dăunători de către substanţele nutritive din compost. Aplicarea mulciului organic poate reduce dăunătorii prin crearea confuziei olfactive sau prin mascarea locurilor preferate pentru depunerea ouălor. Utilizarea sistemelor de culturi limitează presiunea organismelor dăunătoare, acestea având puţine plante gazdă. Diversitatea plantelor oferă un habitat favorabil pentru insectele benefice. Speciile de plante înrudite pot, vizual şi chimic, să interfereze cu organismele dăunătoare, făcând habitatul mai puţin favorabil pentru ele. Culturile capcană sunt mai atractive pentru dăunător decât cultura principală, fie în calitate de hrană, fie pentru depunerea ouălor. În majoritatea cazurilor culturile capcană sunt distruse la o infecţie severă sau la finisarea ciclului de viaţă al plantelor pentru a evita migrarea dăunătorului în cultura principală. O altă strategie este intercalarea culturilor repelente pentru dăunători între rândurile culturii principale. În acest sistem cultura intercalată maschează cultura principală, care nu este recunoscută de către insectă, fie datorită substanţelor chimice produse, fie din cauza diferenţelor fizice dintre planta respectivă şi planta gazdă. Culturile de acoperire protejează solul de eroziune, sporesc activitatea biologică în sol şi pot favoriza prezenţa organismelor folositoare. Insectele dăunătoare nu vor găsi cultura din cauza confuziei olfactive. (Pelssier et al. 2017, Moldovan 2018, Carcamo et al. 2018).

Etapa 2. Inamicii naturali ai dăunătorilor sunt alte organisme (virusuri, bacterii, fungi, prădători şi parazitoizi), care contribuie la controlul organismelor dăunătoare. Practicile au drept scop de a stimula dezvoltarea inamicilor naturali în cultura principală şi în apropierea ei, prin asigurarea unui habitat favorabil acestora. Pentru îmbunătăţirea habitatelor trebuie alese doar plante care nu sunt gazde pentru organismele dăunătoare. Aceasta presupune acceptarea existenţei unui număr redus de dăunători în câmp, care vor servi ca hrană sau gazdă pentru inamicii naturali şi includerea în sistemul de culturi a plantelor care vor constitui hrană sau adăpost pentru inamicii naturali. Gardurile vii atrag prădătorii şi parazitoizii, oferind nectar, polen, gazde alternative şi/sau pradă. Zonele de refugiu pentru coleoptere constituie fâşiile de iarbă din vecinătatea câmpurilor de cultură care, oferă habitat pentru inamicii dăunătorilor, cum ar fi carabidele, stafilinidele şi păianjenii. Măsurile de protecţie a culturilor leguminose de asemenea presupun crearea, zonelor tampon de protecţie (Hossain et al. 2002, Landis, Wratten, Gurr 2000, Philips, Rogers, Kuhar 2014, Pellisier, Nelson, Jabour 2017). După prima tăiere, este necesar să se păstreze o mică parte a zonei tampon, în care dăunătorul poate depune ouăle; după sfârşitul înfloririi, această zonă tampon poate fi cosită iar furajul recoltat distrus, astfel încât dăunătorii în curs de dezvoltare să fie, de asemenea, distruşi. În plus, zonele tampon înflorite pot atrage insectele polenizatoare, care,

după tăiere pot continua să viziteze și polenizeze florile din a doua creștere (Kolairik, Rotrekl 2013). Fâșiile cu flori presupun plantarea plantelor cu flori locale pentru a atrage prădătorii, parazitoizii și polenizatorii. Plantele companion din cadrul culturii principale, de asemenea pot atrage inamicii naturali ai dăunătorilor și polenizatorii.

Etapa 3. În cazul invaziilor devastatoare a dăunătorilor sau patogenilor vor fi necesare măsuri directe, pentru a minimiza pierderile. Controlul direct este utilizat ca ultimă opțiune în cazul când celelalte metode au eșuat. Practicile de control direct includ: controlul fizico-mecanic și controlul biologic. Dintre metodele fizico-mecanice evidențiem utilizarea capcanelor pentru capturarea insectelor. Capcanele nu trebuie plasate la hotarul câmpului sau în apropierea zonelor de refugiu pentru insectele benefice. Capcanele cu feromoni sunt utilizate de obicei pentru monitorizarea dăunătorilor, dar pot fi utilizate și pentru capturarea în masă (Bacal, Cocîrță, Munteanu 2014, Moldovan 2018).

Controlul biologic reprezintă un complex de metode bazate pe utilizarea altor organisme în reducerea efectivului numeric al organismelor dăunătoare sub pragul economic de dăunare, valorificând mecanismele naturale precum prădătorismul, parazitismul, competiția, ș.a. Insectele, ca și celelalte organisme vii, prezintă un număr larg de inamici naturali, care pot fi utilizați în calitate de agenți de control biologic. Controlul biologic este o partea extrem de importantă a strategiilor de Management Integrat al Organismelor Dăunătoare (IPM) care pot asigura sustenabilitatea agriculturii, siguranța economică și alimentară (Tanada, Kaya 1993).

1.3 Istoricul cercetărilor privind controlul biologic al dăunătorilor

Dezvoltarea metodelor de control biologic al dăunătorilor a avut la bază faptul că organismele dăunătoare la rândul său sunt atacate de alte organisme vii numite inamici naturali (Sweetman 1936). În istoria cercetărilor privind controlul biologic pot fi evidențiate trei etape: I. Etapa preliminară, în care agenții de control biologic erau utilizați fără o fundamentare științifică (anii 200- 1887); II. Perioada intermediară în care erau puse bazele cercetărilor în acest domeniu (1888-1955) și III. Etapa modernă caracterizată prin cercetări complexe fundamentate teoretic și metodologic (1956-prezent). Primele date privind utilizarea metodelor de control biologic sunt menționate în China în secolul III. Acestea se referă la utilizarea furnicilor din specia *Oecophylla smaragdina* Fabricius (Hymenoptera) pentru controlul dăunătorului citricelor *Tesseratoma papillosa* (Hemiptera). Fenomenul de parazitism la insecte (parazitoizi) este pentru prima data interpretat de Van Leeuwenhoek în 1701 și Vallisnieri în anul 1706 (Godfray 1994). Primul patogen al insectelor de origine microbiană a fost evidențiat de Reaumur în anul 1726 (Ainsworth 1976). La sfârșitul secolului XVIII păsările erau transportate la distanțe mari pentru a fi utilizate

pentru controlul insectelor. La începutul secolului XIX Darwin a pus în evidență importanța reprezentanților familiei Ichneumonidae ca factor de control natural al lepidopterelor, dăunători ai verzei. Deja în anul 1827 Hartig (Germania) sugera producerea în masă a parazitoizilor din larve parazitate pentru a fi utilizate în masă (Ecologically based pest management: new solutions for a new century, 1996). Kollar (Austria) a propus conceptul de „control natural" în anul 1837. În perioada anilor 1850 - 1887 s-au intensificat cercetările privind aplicarea metodelor de control biologic al dăunătorilor în Statele Unite ale Americii. Acest lucru a devenit necesar din cauza cultivării pe scară largă a culturilor agricole de origine europeană. O dată cu introducerea acestora, au fost importați și dăunătorii acestora. Lipsa inamicilor naturali a fost cauza creșterii numericului populațiilor de insecte dăunătoare provocând invazii în masă. Prima aplicare cu succes a parazitoizilor pentru controlul speciei *Conotrachelus nenuphar* (Curculionidae) în SUA a fost realizată în anul 1870. Speciile din genul *Trichogramma* sp. (paraziți ai ouălor) (Trichogrammatidae) au fost aplicate în Canada în anul 1882 pentru controlul lepidopterelor dăunătoare. Cercetările anilor 1905-1911 s-au axat pe controlul biologic al speciei *Lymantria dispar* (L.) (Lepidoptera, Erebidae). În anul 1911 Berliner a descris specia *Bacillus thuringiensis* (*Bacillaceae*) în calitate de agent cauzal al infecției bacteriene la insecte. Termenul de „control biologic" a fost pentru prima dată utilizat de Harry Scott Smith în anul 1919. Termenul a fost introdus în uz prin intermediul lucrărilor științifice a renumitului savant Paul H. DeBach (1914–1993). Perioada anilor 1930-1940 a fost caracterizată de un avânt în cercetarea agenților de control biologic. Cel de al doilea război mondial a blocat dezvoltarea metodelor de control biologic. Mecanizarea, industrializarea și chimizarea agriculturii, elaborarea pe scară largă a pesticidelor de sinteză relativ accesibile pentru fermieri, a adus în umbră cercetările în acest domeniu. În anul 1955 a fost instituită Comisia Internațională Pentru Controlul Biologic Împotriva Inamicilor Culturilor Agricole (Commission Internationale de Lutte Biologique contre les Enemis des Cultures - CILB) cunoscută actualmente ca International Organization for Biological Control (IOBC). În continuare au fost puse bazele conceptului de prag economic de dăunare (Stern et al. 1959). Interesul pentru metodele biologice a reapărut după anul 1962, o dată cu publicarea cărții Dlui Rachel Carson „Silent Spring". Au fost puse bazele dezvoltării conceptului de Management Integrat al Organismelor Dăunătoare, controlul biologic fiind considerat component cheie al acestui concept. Începând cu anii 1970 au fost puse bazele metodelor de control biologic al dăunătorilor în cultura de bumbac, lucernă, citrice, soia ș.a. (Sweeteman 1936, Stern et al. 1959, Doutt 1964, Hagen, Franz 1973, DeBach 1974, Simmonds, Franz, Sailer 1976, van den Bosch, Messenger, Gutierrez 1982, van Driesche, Bellows 1996, Abrol, Shankar 2012). Cu toate acestea, utilizarea insecticidelor chimice rămâne a fi cea mai practicată metodă de combatere a insectelor

dăunătoare, fiind utilizate extensiv, ignorând informațiile cu privire la riscurile majore asociate acestora. Drept consecință, în legislația unor țări au fost introduse prevederi ce țin de excluderea din uz sau reducerea utilizării substanțelor toxice pentru om și biodiversitate (Regulamentul 1107/2009 privind introducerea pe piață a produselor fitosanitare, Directiva 2009/127/CE privind echipamentele tehnice de aplicare a pesticidelor și Directiva 2009/128/CE privind utilizarea durabilă a pesticidelor). Necesitatea identificării unei alternative insecticidelor chimice a stimulat interesul pentru elaborarea unor metode inofensive pentru om și mediu, intensificând cercetările științifice privind metodele de control biologic pentru cei mai periculoși dăunători agricoli.

1.3.1 Agenții de control biologic al insectelor

În calitate de agenți de control biologic se utilizează organisme vii, capabile de a reduce efectivul numeric al populației speciilor de dăunători. Potențiali agenți de control biologic al insectelor sunt: prădătorii, parazitoizii, nematozii entomopatogeni, virusurile, bacteriile și ciupercile microscopice entomopatogene.

Prădătorii. Numeroase specii de amfibieni, reptile, păsări și mamifere se hrănesc cu insecte și pot contribui semnificativ la reducerea efectivului numeric al acestora. De asemenea există insecte și arahnide care se hrănesc cu alte insecte. Majoritatea speciilor de arahnide care atacă insectele sunt forme prădătoare, deși sunt cunoscuți de asemenea și ectoparaziți. În cadrul insectelor prădătorismul se întâlnește atât la formele mature cât și la celelalte forme din ciclul vital. Adulții din ordinele Lepidoptera, Trichoptera și unele specii din ordinul Diptera nu sunt prădători. Cu excepția ordinului Hymenoptera, prădătorismul este mai frecvent întâlnit în cadrul Clasei Insecta decât parazitismul. Relația apropiată dintre prădătorism și parazitism uneori face dificilă atribuirea unei anumite specii la una dintre aceste categorii (Sweetman 1936). Organismele vii care se hrănesc cu insecte pot fi găsite în majoritatea ecosistemelor naturale și antropizate. Majoritatea speciilor prădătoare pot să consume un număr mare de insecte pe parcursul ciclului vital (Hoffmann, Frodsham 1993).

Parazitoizii. De obicei parazitismul se manifestă la stadiile imature al speciilor de parazitoizi. Adulții se hrănesc cu nectar, și atacă gazda în scopul de a depune ouăle sau larvele. Din toate ordinele de insecte, doar cinci au reprezentanți care parazitează alte insecte. Toate speciile cunoscute din ordinul Strepsiptera duc un mod de viață parazitar, de obicei pe specii de insecte care nu prezintă interes economic. Speciile cu mod de viață parazitar din cadrul ordinelor Coleoptera și Lepidoptera de asemenea nu prezintă valoare aplicativă. Astfel în calitate de agenți de control biologic cel mai frecvent se utilizează specii din ordinele Diptera și Hymenoptera (1936 Sweetman, Godfray 1994, Wang et al. 2019).

Pentru a aplica cu succes atât speciile prădătoare cât și parazitare, în calitate de agenți de control biologic, sunt necesare studii extensive privind preferințele trofice, fenologia atât a agentului de control cât și a dăunătorului în cauză, cât și informații detaliate privind rețelele trofice din cadrul ecosistemelor.

Nematozii entomopatogeni. Sunt cunoscute aproximativ 30 de familii de nematode asociate cu diverse specii de insecte și alte nevertebrate. Totuși puține dintre acestea sunt potențial entomopatogene, majoritatea fiind asociate insectelor în scopul deplasării sau populează același habitat. Cel mai mare interes din punct de vedere al controlului biologic îl prezintă 2 familii de nematode: Steinernematidae și Heterorhabditidae (Poinar 1979, 1990, Lacey et al. 2001, Poinar, Grewal 2012, Lacey et al. 2015). Reprezentanții acestor familii au proprietăți comune atât parazitoizilor cât și patogenilor. Nematozii sunt analogi parazitoizilor deoarece posedă chemoreceptori și se pot deplasa în căutarea gazdei. Asemănarea lor cu patogenii constă în faptul că majoritatea formează asociații cu bacteriile mutualiste *Xenorhabdus* și *Photorhabdus* (Kaya, Gaugler 1993, Koppenhöfer, Gaugler 2009). Complexul nematod-bacterie este extrem de virulent, poate fi cultivat in vitro și are potențial reproductiv sporit, prezintă un spectru larg de gazde dar nu prezintă riscuri pentru vertebrate și multe specii de nevertebrate benefice (Sweetman 1936, Kaya, Gaugler 1993, Koppenhöfer, Gaugler 2009, Askary 2010, Lacey 2015).

Virusurile. Pentru prima dată o infecție cauzată de virsuri a fost evidențiată în anul 1859 în populațiile viermilor de mătase. Pentru o perioadă îndelungată patologiile cauzate de virusuri erau dificil de diagnosticat fiind confundate cu cele provocate de bacterii, protozoare ș.a. Cercetările aprofundate au fost inițiate în primele decenii ale sec. XX (Sweetman 1936). Virusurile poliedrozei nucleare (VPN) sunt virusurile cel mai frecvent utilizate ca agenți pentru combaterea insectelor (Federici 1993). VPN sunt virusuri ADN complexe, genomul cărora (130 kbp) codifică cel puțin 100 proteine. Replicarea virală și asamblarea virionului se produce în nucleii țesuturilor infectate; odată formați, virionii sunt integrați în cristale proteice numite poliedre, sau corpuri ocluzionale. Câteva sute de tulpini VPN au fost izolate in ultimii 50 de ani, majoritatea infectând lepidoptere. VPN au fost, de asemenea, izolate din insectele aparținând ordinelor Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Siphonaptera, Thysanura și Trichoptera, deși se întâlnesc mai puțin frecvent în aceste grupuri comparativ cu lepidopterele. Insectele de obicei se infectează atunci când ingerează poliedrele de pe frunze. Poliedrele se dizolvă în intestin, iar virionii eliberați invadează insectele prin microvilii epiteliului intestinal. În nucleele epiteliului intestinal are loc o fază inițială de replicare, după care virionii invadează celelalte țesuturi din organism, ceea ce duce la formarea de poliedre infecțioase. La speciile de insecte cu sensibilitate scăzută la un anumit VPN, replicarea virusului poate fi limitată la epiteliul intestinal și doar un număr mic de celule din

alte țesuturi. Indivizii astfel infectați, de obicei, supraviețuiesc infecției și sunt capabili de a continua creșterea, dezvoltarea și reproducerea. Virusurile provoca periodic focare de boli, care contribuie la reducerea rapidă a efectivului numeric al populațiilor de lepidoptere (Thomas, Heimpel, Adams 1974, Tanada, Fuxa 1987, Kalha et al. 2014). La momentul actual VPN se folosește în preponderență în controlul biologic al lepidopterelor. Ele sunt privite în primul rând ca insecticide microbiene, fiind aplicate atunci când este necesitate în programele de management integrat al dăunătorilor (Federici 1993, Kalha et al. 2014, Volosciuc, 2015).

Bacteriile. Existența bacteriilor capabile să provoace patologii la insecte a fost remarcată pentru prima dată de Mecinicov I.I. (1879), care a observat că larvele bolnave ale gândacului *Anisoplia austriaca* Hbst. sunt infectate cu *Bacillus salularius* (Sweetman 1936). Studiile ulterioare au urmărit izolarea și caracterizarea bacteriilor cu potențial de a fi utilizate în controlul biologic. Bacteria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) este cel mai frecvent patogen utilizat în controlul insectelor, cu mii de tone de *Bt* aplicate anual în culturile agricole și legumicole, pentru protecția plantelor ornamentale și pădurilor de atacul coleopterelor și lepidopterelor. *Bt* este, de asemenea, utilizată în habitatele acvatice pentru a controla larvele de țânțari. *Bt* este o bacterie de sol frecvent răspândită în mediul înconjurător și este ușor de izolat din sol, precum și din alte surse (Meadows 1993, Kalha et al. 2014). În timpul sporulării *Bt* produce un corp parasporal cristalin compus din una sau mai multe proteine insecticide. Pentru a cauza moartea insectelor sporul trebuie să fie ingerat. În intestinul insectei, cristalele de proteină se dizolvă, iar proteinele parasporale insecticide sunt activate prin hidroliză de către proteaze (Pietrantonio, Federici, Gill 1993, Kalha et al. 2014 Valicente, Bezerra da Silva 2017). Toxina sau toxinele activate se leagă la receptorii specifici de pe suprafața celulelor mezenterice ale insectelor sensibile, cauzând liza acestor celule și moartea celulelor. Sub denumirea de *Bt* sunt cunoscute mai mult de 100 de subspecii care pot fi deosebite după analiza serologică a flagelului, susceptibilitatea față de diverși fagi și profilele plasmidice (Sanahuja et al. 2011). Genele care codifică proteinele insecticide sunt situate de obicei în plasmide mari transmisibile. Diferite tulpini ale aceleași subspecii pot avea diferite seturi de plasmide și, prin urmare, se pot deosebi prin specificitatea lor față de gazde. Majoritatea proteinelor insecticide sunt numite Cry proteine (denumirea provine de la cristal) și sunt clasificate în funcție de spectrul lor de activitate și masa moleculară (Hofte, Whiteley 1989). În fiecare grup de proteine Cry, apar mai multe variante naturale care pot varia foarte mult în toxicitatea lor specifică față de o anumită specie de insecte. Toate proteinele Cry prezintă omologie semnificativă la nivelul secvenței de aminoacizi, și este foarte probabil ca acestea au evoluat dintr-o singură proteină ancestrală. Marea majoritate a tulpinilor evaluate până în prezent sunt active numai împotriva insectelor unui singur ordin de insecte. În cazul în care o tulpină de *Bt* produce mai mult de o proteină Cry, este foarte

probabil să aibă un spectru mai larg de activitate decât o susșă care produce numai o proteina Cry. De exemplu, tulpina de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD1, utilizată în multe formulări comerciale de *Bt*, este mai toxică și are un spectru larg de activitate împotriva insectelor lepidoptere decât tulpina HD 73 ale aceleași subspecii. Ambele produc cristale mari, bipiramidale; tulpina HD1 produce de asemenea un cristal mult mai mic prismatic. La momentul actual sunt cunoscute aproximativ 78 familii de proteine Cry nomenclatura proteinelor fiind modificată în concordanță cu rezultatele analizei filogenetice a secvențelor aminoacidice (Crickmore et al. 2018).

Patogeni recombinați genetic. Agenții patogeni sunt componente utile în programele de control ale insectelor, dar gradul lor relativ ridicat de specificitate față de gazdă și viteza redusă de distrugere în comparație cu spectrul larg de acțiune al insecticidelor chimice sunt adesea citate ca impedimente pentru dezvoltarea metodelor biologice de combatere a dăunătorilor în baza microorganismelor. Pentru a depăși aceste dezavantaje, și pentru a crește eficacitatea agenților patogeni prin creșterea spectrului lor de acțiune și virulenței sunt folosite tehnicile de recombinare genetică și tehnicile ADN recombinant. Diferite plasmide *Bt* de la diferite tulpini bacteriene cu spectre diferite de acțiune pot fi combinate într-o singură tulpină pentru a produce un nou bioinsecticid *Bt* cu un spectru extins de acțiune. Această strategie a fost folosită de către Ecogen, Inc. (Langhorne, Pennsylvania) pentru a produce produsul comercial Foil®. Tulpina de *Bt* subsp. *kurstaki* care reprezintă baza formulării conține două plasmide, una codifică proteinele Cry1 și o cealaltă proteină Cry3. Mycogen Corporation (San Diego, California) a folosit tehnologia ADN recombinant pentru a produce tulpini ale bacteriei *Pseudomonas fluorescens* care produc proteinele modificate Cry (Gelernter, Schwab 1993). Tehnologia ADN-ului recombinant a fost de asemenea folosită pentru a crea plante de cultură transgenice (Perlak et al. 1990). Printre virusuri, AcNPV a fost modificat genetic pentru a produce neurotoxine și enzime cu acțiune selectivă față de insecte (Hawtin, Possee 1993). Scopul este de a spori eficacitatea virusurilor permițându-le să paralizeze gazdele de lepidoptere rapid prevenind deteriorarea plantelor în timpul hrănirii (Kalha et al. 2014). Spectrul de gazde al acestor virusuri recombinante ar putea fi ușor extins pentru a include specii de lepidoptere suplimentare, care nu sunt susceptibile în mod normal la infecțiile virale. Evaluarea și utilizarea de microorganisme entomopatogene recombinante ține de domeniul viitorului. Cele mai multe întrebări cu privire la specificitatea agenților modificați genetic pot fi abordate prin testele de laborator. Obiectivul acestor teste este de a asigura faptul că spectrul de acțiune nu a fost extins dincolo de cel urmărit. Astfel, este necesar de a evalua sensibilitatea și susceptibilitatea unei game largi de nevertebrate țintă și insecte non-țintă, precum și alte nevertebrate și vertebrate la agenții patogeni modificați genetic (van Driesche, Bellow 1996).

Fungii. În anul 1835 Bassi de Lodi a demonstrat infectarea viermelui de mătase de către o specie de ciuperci microscopice. În anul 1879 Mecinicov I.I. a realizat primele experienţe în laborator reuşind să izoleze o tulpină de *Metharizium anisopliae* cu activitate insecticidă sporită din corpul speciei *Anisoplia austriaca* Hbst. (Coleoptera). Renumitul savant a elaborat metodele de cultivare in vitro a tulpinii izolate şi a reuşit să obţină reinfectarea insectelor cu tulpina respectivă. În Franţa Le Moult (1890-1, 1912) a izolat o tulpină fungică patogenă faţă de *Melolontha vulgaris* Fabr. (Lepidoptera) numind specia *Isaria densa*. În SUA au fost realizate cercetări privind multiplicarea speciilor din genul *Beauveria* (Sweetman 1936). Mai mult de 100 de genuri de fungi cu aproximativ 750-1000 de specii sunt cunoscute a fi patogene pentru insecte (St. Leger, Wang 2010, Mora et al. 2017).

Fungii prezintă specificitate faţă de gazdă şi produc patologii severe după infectare. Aceste specii au cicluri de viaţă extrem de eterogene; produc patologii şi prezintă grade diferite de specificitate faţă de gazdă. Cei mai mulţi patogeni fungici sunt transmişi de la gazdele infectate la gazdele susceptibile prin spori (forme sexuate) sau conidii (forme asexuate). În ciclul de viaţă tipic fungic, când un spor sau conidie întâlneşte o gazdă sensibilă, acesta aderă la cuticulă, germinează, iar tubul germinativ pătrunde prin peretele corpului gazdei. În interiorul gazdei, micromiceta se dezvoltă vegetativ, adesea formând corpuri hifale. Gazda, de obicei, moare, după care ciuperca microscopică formează miceliul tipic care creşte prin cuticulă şi produce conidii mai rezistente. Aceste conidii pot infecta apoi alte gazde. Ciclurile de viaţă ale multor micromicete entomopatogene sunt mult mai complicate decât cele ale ciupercilor microscopice tipice şi pot implica gazde alternative, spori mobili şi producţia de toxine (McCoy, Samson, Boucias 1988, Samson, Evans, Latge 1988, Goettel et al. 1990). Cele mai multe studii privind specificitatea faţă de gazdă a fungilor entomopatogeni au cercetat interacţiunile dintre conidii şi cuticula insectelor. Pentru mai multe specii de fungi, s-a demonstrat experimental că ataşarea conidiilor la cuticulă şi penetrarea prin cuticulă şi peretele corpului sunt influenţate în mare măsură de compoziţia chimică a cuticulei (Fargues, Remaudiere 1977, Boucias, Pendland 1984, Boucias, Latge 1988, Boucias, Pendland, Latge 1988, St. Leger 1993). Cuticula este în mod clar un factor major care determină specificitatea faţă de gazdă a multor patogeni fungici. Răspunsurile imune celulare şi chimice apar atunci când unele micromicete invadează hemocelul organismelor nevizate. Aceste răspunsuri, cu toate că nu sunt bine documentate, afectează specificitatea faţă de gazdă.

Ciclul de viaţă al entomopatogenilor fungici este sincronizat cu stadiile vitale ale gazdelor şi condiţiile mediului ambiant. Germinarea şi creşterea agentului fungic este influenţată de disponibilitatea nutrienţilor, apei, oxigenului, pH, temperatură, compuşii toxici produşi la suprafaţa cuticulei insectei gazdă. Nivelurile de infecţie, rata de germinare, spectrul de gazde, pot

varia semnificativ (Mora et al. 2017, Singh, Rainab, Singha 2017). Studiile recente sun orientate spre elucidarea co-evoluției gazdă-parazit și evoluția specificității față de gazdă a micromicetelor enotmopatogene (Wang, Leger, Wang 2016). În literatura de specialitate apar tot mai multe studii care vizează posibilitatea unor specii de fungi din ordinul Hypocreales de a exista în calitate de endofiți ai plantelor vasculare. Endofiții există asimptomatic în interiorul plantei și sunt considerați specii mutualiste care au rol de a proteja plantele (Singh, Rainab, Singha 2017). Studiile realizate pe parcursul anilor au atestat faptul că speciile din genurile *Beauveria*, *Lecanicillium* și *Metharizium* pot de asemenea acționa în calitate de antagoniști ai fitopatogenilor prin intermediul mecanismelor de antibioză și micoparazitism (Jaber, Ownley 2018).

1.3.2 Agenții de control biologic aplicați împotriva coleopterelor curculionoide

Prădătorii. Investigarea impactului coleopterelor Carabidae asupra populațiilor de *Sitona lineatus* sugerează că adulții emergenți din pupe sunt mai susceptibili la atac (2,6 - 23,8% mortalitate) decât larvele (0,6 - 10,5% mortalitate) (Aeschlimann 1980, Hamon et al. 1990). Coleopterele carabide sunt mai active la suprafața solului, prin urmare, larvele pot evita pericolul, datorită habitatului subteran (Hunter 2001). Perioadele de activitate maximă a carabidelor corespund cu momentul de vârf al apariției insectelor adulte noi, la sfârșitul lunii iulie, mijlocul lunii august (Hamon et al. 1990). În câmpurile din Marea Britanie infestate cu *S. lineatus* au fost identificate densități mari ale mai multor specii de coleoptere carabide printre care *Pterostichus madidus* F., *Pt. melanarius* Ill., *Harpalus rufipes* DeG. şi *Agonum dorsale* Pontoppidian (Hamon et al. 1990). În Polonia, *Pterostichus cupreus* L. a fost activ în perioada de ovipoziție a dăunătorului *S. lineatus*, în timp ce *Bembidion properans* Steph. (Coleoptera, Carabidae) a fost mai activ în iunie fiind un prădător atât al ouălor cât și al larvelor emergente (Ropek, Jaworska, 1994). Prădătorii ai larvelor speciei *Hypera postica* sunt coccinelidele, ploșnițele din familia Nabidae, unele specii din familia Chrysopidae (Neuroptera), și de asemenea unii păianjeni (Ouayogode, Davis 1981). În studiile efectuate în Iowa, SUA au fost atestate densități sporite ale adulților speciei *Coleomegilla maculata* De Geer (Coleoptera, Coccinellidae) în câmpurile infestate cu specia *H. postica* (Giles, Obrycki, Degooyer 1994). Experiențele realizate în laborator folosind coleoptere carabide au stabilit că un gândac ar putea consuma în mediu 20 insecte adulte pe zi, deși în condiții de câmp, doar una sau două insecte se așteaptă să fie consumate zilnic. Conform unor estimări, coleopterele carabide ar reduce populațiile speciei *S. lineatus* cu 30% și mai mult (Hamon et al. 1990). Studiile din ultimii ani au atestat faptul că în condiții de laborator specia *Pterosticus melanarius* Ill. (Coleoptera, Carabidae) consumă preferențial adulți din specia *S. lineatus*, iar specia *Bembidion quadrimaculatum* L. (Coleoptera, Carabidae) consumă ouăle

(Vankosky, Carcamo, Dosdall 2011). În Republica Moldova în câmpurile de lucernă, populate de către specia *Sitona lineatus*, au fost atestate densități crescute ale prădătorilor *Harpalus distinguendus* (Duftschmid) și *H. rufipes* (De Geer) (Coleoptera, Carabidae) (Munteanu et al. 2014a).

Parazitoizii. Mai multe specii de parazitoizi pot avea un impact în controlul populaţiilor speciei *Sitona lineatus* în Europa şi Africa de Nord, inclusiv *Allurus muricatus* Hal., *Microctonus aethiopoides* Loan, *Perilitus rutilus* Nees şi *Pygostolus falcatus* Nees (Hymenoptera, Braconidae) (Aeschlimann 1980). Parazitul ouălor *Patasson lameerei* Deb. (Hymenoptera, Mymaridae) răspândit în sudul Europei (Aeschlimann 1980) atacă ouăle nemelanizate expuse pe suprafaţa solului (Schotzko, O'Keeffe 1986b). Ouăle şi adulţii sunt obiectivele principale ale parazitoizilor himenoptere, deoarece larvele sunt adăpostite de nodozitățile rădăcinilor (Aeschlimann 1980, Hamon et al. 1990). Specia *Hypera postica* este parazitată de *Microctonus aethiopoides*, *Bathyplectes anurus* (Thomson) (Ichneumonidae), *B. curculionis* (Thomson), și *Oomyzus incertus* Ratzeburg (Eulophidae). În Germania, în câmpurile de trifoi cu densități sporite ape speciei *Protapion apricans* cea mai răspândită specie de parazitoid a fost *Spintherus dubius* Nees (Hymenoptera, Pteromalidae) (Kruess, Tscharntke 1994). În Suedia, cele mai numeroase au fost speciile de parazitoizi *Spintherus dubius* Nees, *Triaspis caudata* Nees, și *Triaspis obsurella* Nees (Lundin et al. 2012). Cercetările în acest domeniu din Republica Moldova au identificat că pe *Sitona* spp., *Anthnomus pomorum* (L.), *Byctiscus betulae* (L.), *Stereonychus fraxini* (Deg.), *Hypera postica* (Gyll.) şi *Lignyodes bischoffi* (Bl.) (Coleoptera, Curculionidae) parazitează reprezentați ai familiilor: Ichneumonidae (19 genuri), Eulophidae (16), Braconidae (10), Pteromalidae (5), Eupelmidae (2), Tachinidae (2) și câte o specie din familiile Eurytomidae, Encyrtidae, Torymidae și Mymaridae. Adulții dăunătorului *Sitona lineatus* sunt parazitați de speciile *Pygostolus falcatus*, *Perilitus rutilus* (Hymenoptera, Braconidae), iar ouăle acestuia sunt parazitate de *Anaphes diana* (Mymaridae). Din larvele speciei *Hypera postica* a fost izolat ectoparazitul solitar *Bathyplectes curculionis* Thomson (Hymenoptera, Ichneumonidae) și endoparazitul *Tetrastichus incertus* Ratzeburg (Hymenoptera, Eulophidae), iar adulții sunt parazitați de speciile *Microctonus aethiopoides* Loan, *Perilitus rutilus* (Braconidae), *Campogaster exiqua* Meigen (Diptera, Tachinidae) (Poiras 2006).

Nematozii. În Europa au avut succes studiile privind combaterea speciei *Sitona lineatus* folosind nematozi entomopatogeni. După expunerea timp de şase zile la *Steinernema carpocapsae* Weiser, *Steinernema feltiae* Filipjev (Rhabditida, Steinernematidae) sau *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar (Rhabditida, Heterorhabditidae), mortalitatea a atins 100% (Jaworska 1998). Expunerea insectelor adulte la *H. bacteriophora*, cu o rată de 300 nematozi pe insectă, a determinat

o mortalitate de 50% după şase zile şi 100% după 14 zile (Wiech, Jaworska 1990). Indivizii juvenili ai speciei *H. bacteriophora* pot penetra cuticula gazdelor (Bedding, Molyneux 1982), explicând succesul speciei în infectarea insectelor adulte. A fost remarcat faptul că insectele hrănite cu *V. faba* au fost mai puţin predispuse la infecţii decât cele hrănite cu *P. sativum*. Mortalitatea larvelor terțiare hrănite cu *Pisum sativum* a atins 100%, în patru zile (Jaworksa, Ropek 1994). Reproducerea nematodului a fost mai intensă în cazul hrăniri insectelor cu fasole. Studiile au evidențiat, că speciile *Steinernema carpocapsae, S. feltiae* și *H. bacteriophora*, sunt eficienți în controlul biologic al dăunătorului *Sitona lineatus* (Jaworska 1998), iar *S. carpocapsae* și *H. indica* sunt eficiente în cazul speciei *Hypera postica* (Shah, Azmi, Tyagi 2011).

Programele de control biologic, bazate pe utilizarea inamicilor naturali precum prădătorii, parazitoizii sau nematozii, sunt limitate de condițiile abiotice, de aceea, mai mulți factori precum umiditatea relativă a aerului, umiditatea solului și tipul de sol, trebuie luați în considerație pentru un program de control biologic eficient (Georgis, Gaugler 1991, Bilgrami, Gaugler 2007). Alți factori limitativi în utilizarea acestor inamici naturali sunt producerea și distribuția mai dificilă, perioada de depozitare fiind limitată la doar câteva săptămâni. Un alt obstacol este cel comercial, și anume lipsa posibilității de a fi brevetate.

Insecticidele microbiene, sau biopesticidele pe bază de virusuri, bacterii sau ciuperci microscopice sunt o alternativă utilizării inamicilor naturali prezentați mai sus, combinând avantajele atât a metodelor de control biologic, cât și a celor chimice. Asemănător pesticidelor chimice acestea sunt ușor de produs la un preț redus, ușor de formulat și au o perioadă de valabilitate lungă. De asemenea acestea pot fi aplicate cu ușurință, folosind echipamentul standard. Contrar insecticidelor chimice, care posedă un spectru larg de acțiune, virusurile, tulpinile bacteriene și fungice sunt selective, respectiv, impactul negativ asupra mediului este minim.

Virusurile. Printre virusurile cel mai frecvent utilizate ca agenți pentru combaterea insectelor evidențiem Virusul Poliedrozei Nucleare (VPN) (Federici, 1993). Majoritatea VPN infectează lepidopterele, dar au fost izolate, de asemenea, din reprezentanții ordinelor Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, ș.a. Utilizarea biopesticidelor virale este limitată de acțiunea lentă, lipsa semnelor externe ale larvelor în primele etape de propagare ale virusului și costul preparatelor, deoarece acestea se înmulțesc numai în celulele vii. În Republica Moldova preparatele virale elaborate, de asemenea sunt orientate spre controlul populațiilor de lepidoptere dăunătoare. Recent a fost elaborată biotehnologia producerii și aplicării preparatului baculoviral *Virin-HSP* pentru combaterea dăunătorului *Helicoverpa armigera* (Volosciuc, 2015).

Bacteriille. Conform unor studii proteina Cry6B (BGSC-4D8) manifestă activitate insecticidă semnificativă (LC_{50} 280 ng/l și LC_{90} 630 ng/l) împotriva dăunătorului *Hypera postica*.

Vătămările minore, atestate pe frunzele tratate cu soluție de toxină Cry6B, indică faptul că larvele încep hrănirea pe frunze, dar pier în scurt timp de la ingerare. Rezultate promițătoare au fost înregistrate în cazul evaluării activității insecticide a preparatelor microbiene *Lepidocide P* și *SP Bankole* împotriva speciei *Protapion apricans* (Balandina 2007*)*. Tulpina autohtonă de *Bacillus cereus* a prezentat activitate insecticidă sporită, cauzând o mortalitate de 93%, fiind testată pe specia *S. squalidus*, 90% pentru *B. betulae* și 83% pentru *T. aequatus*, după 5 zile de la aplicare (Munteanu et al. 2014b). Tulpina autohtonă de bacterii *Bacillus thuringiensis,* CNMN-BB03, posedă o activitate insecticidă pronunţată asupra coleopterelor curculionide *Neocoenorhinidius pauxillus, Phyllobius oblongus* şi *Sitona lineatus* cauzând o mortalitate de 80,0%, 73,3% și 66,6% respectiv (Munteanu et al. 2011, Munteanu et al. 2013). Se efectuează cercetări ample privind activitatea insecticidă a tulpinilor de *Bt* contra diferitor dăunători (Moldovan 2017, Moldovan, Toderas, Munteanu-Molotievskiy 2017, Moldovan, Munteanu-Molotievskiy, Toderaș 2018, Moldovan 2019), inclusiv specii de curculionide, însă datele privind activitatea insecticidă a tulpinilor native de *Bt*, asupra speciilor incluse în studiul de față, sunt limitate. Pe lângă o serie de avantaje obținute prin folosirea biopesticidelor bacteriene, există și unele dezavantaje, precum lipsa acțiunii asupra insectelor care au un mod de viață criptic și lipsa persistenței cristalelor proteice la acțiunea factorilor climatici.

Patogeni recombinați genetic. Au fost întreprinse încercări de a controla populațiile speciei *Sitona lineatus* prin modificarea genetică a *Rhizobium leguminosarum* introducând gene ale *Bt* subsp. *tenebrionis*, care exprimă endotoxine cu activitate insecticidă (Bezdicek et al. 1994, Skot, Timms, Mytton 1994, Quinn, Bezdicek 1996). Exprimarea genei Cry3 în *R. leguminosarum* a cauzat mortalitatea *S. lineatus*, scăderea ratei de dezvoltare a insectelor, şi a redus distrugerea nodozităților (Bezdicek et al. 1994, Quinn, Bezdicek 1996). Competitivitatea tulpinilor de *Rhizobium* spp. ce conțin gene Cry3 comparativ cu tulpinile de *Rhizobium* spp. nemodificate, precum şi efectul general al nodozităților modificate asupra biomasei plantelor, poate limita utilizarea inserţiilor genei Cry3 în programele de combatere a gărgăriței frunzelor de mazăre. S-a constatat că, la introducerea în sol a bacteriilor *Rhizobium* modificate, acestea au ocupat de la 40 la 97% din nodozităţile rădăcinilor, sugerând că tulpinile modificate sunt competitive (Bezdicek et al. 1994). Distrugerea nodozităţilor plantelor de larvele speciei *S. lineatus* a scăzut în prezența bacteriilor modificate, însă biomasa totală a plantelor a fost semnificativ mai crescută atunci când plantele au fost inoculate cu tulpina de tip sălbatic (Bezdicek et al. 1994). Prin urmare, folosirea pe scară largă a acestei strategii de management necesită investigații suplimentare pentru a înțelege mai bine natura relației simbiotice între *R. leguminosarum* modificată şi plantele gazdă. Pentru a crea soiuri de lucernă rezistente la *Hypera postica*, trei genotipuri comerciale de lucernă, Km-27 ,

KK 14 și Syn- 18 au fost transformate cu tulpinile de *Agrobacterium* GV101, LBA4404 și AGL01. Toate tulpinile conțineau plasmide recombinate, având integrate gena Cry3A, promotorul CaMV35S, precum și gena marker npt77. Rezultatele obținute au indicat integrarea cu succes a genei țintă în genomul liniilor transgenice primare. Liniile de lucernă transgenică au manifestat rezistența la atacul larvelor (73-90% mortalitate) (Tohidfar et al. 2013).

Fungii. Mai multe specii fungice prezintă potenţial de a fi utilizate în controlul populaţiilor de *Sitona lineatus* inclusiv *Metarhizium flavoviride* Metschn., *M. anisopliae* Metschn. (Hypocreales, *Clavicipitaceae*), *Beauveria bassiana* Vuilleman, *Paecilomyces farinosus* Holmsk. şi *P. fumosoroseus* Wize. (Eurotiales, *Cordycipitaceae*) (Hans 1959, Muller-Kogler, Stein 1970, Poprawski, Marchal, Robert 1985). Eficacitatea micromicetelor entomopatogene variază în funcţie de virulenţa tulpinii fungice, concentraţia acesteia în sol şi stadiul insectei în momentul de atac (Poprawski, Marchal, Robert 1985, Verkleij, van Amelsvoort, Smits 1992). Studiile întreprinse privind activitatea insecticidă a cinci specii de fungi (*Metarhizium anisopliae, M. flavoviride, Beauveria bassiana, Paecilomyces farinosus* şi *P. fumosoroseus*) asupra ouălor, larvelor şi pupelor de *Sitona lineatus*, au atestat că ouăle au fost sensibile doar la aplicarea în concentraţii mari a speciei *M. flavoviride*. Larvele nou eclozate, au fost sensibile la toate cele cinci specii fungice (Poprawski, Marchal, Robert 1985). Într-un studiu privind eficacitatea micromicetei *Beauveria bassiana* în Europa centrală, s-a constatat că, la inocularea solului cu 10^7 cm^3 de conidii, numărul de adulţi emergenţi a fost cu 48% mai mic decât numărul de insecte emergente în lotul de control. Longevitatea adulţilor infectaţi cu *B. bassiana* a scăzut, cu creșterea severității infecției, iar aproximativ 50% dintre adulţii infectaţi au murit în termen de 10 zile de la infecţie (Muller-Kogler, Stein 1970). Aceste rezultate sugerează că prezenţa ciupercilor microscopice entomopatogene în momentul de incubaţie poate reduce în mod semnificativ populaţiile speciei *Sitona lineatus*. Un studiu mai recent menționează tulpina *Beauveria bassiana* 238, activă împotriva speciei *S. lineatus* (Riedel, Steenberg 1998).

Pentru controlul biologic al speciilor din genul *Hypera* pot fi folosite speciile de micromicete *Beauveria bassiana* (Hypocreales) (Hedlund, Pass 1968) și *Zoophthora phytonomi* (diviziunea Zygomycotina), raportată pentru prima dată în America de Nord în 1973, în Ontario, Canada (Harcourt et al. 1974). O specie similară cu *Z. phytonomi* a fost identificată în populațiile de *H. postica* din Europa. Într-un studiu din anul 2014 a fost evaluată activitatea insecticidă a 5 specii de micromicete *Beauveria bassiana* Vuilleman, *Metarhizium anisopliae* Metschn. (Hypocreales, *Clavicipitaceae*), *Clonostachys rosea (*Link) Schroers, Samuels, Seifert & W. Gams (Hypocreales, *Bionectriaceae*) și *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Zare & W. Gams împotriva exemplarelor adulte din specia *H. postica*. Tulpina de *B. bassiana* a manifestat cea mai înaltă

activitate insecticidă (Mustafa, Lazgeen, Abdullah 2014). De asemenea într-un studiu recent au fost izolate 7 tulpini de *Beauveria bassiana* și 1 tulpină de *B. pseudobassiana* S.A. Rehner și R.A. Humber (Hypocreales, *Cordycipitaceae*). Tulpinile au cauzat (81–97%) mortalitate fiind testate pe larve și 36–92% atunci când au fost testate pe adulți (Yucel et al. 2018).

Ținând cont de cele expuse mai sus privind, preferințele trofice, habitatul ascuns al larvelor, daunele provocate de speciile *S. lineatus, H. postica* și *P. apricans*, agenții potențiali de control biologic al acestor dăunători și mecanismele particulare de acțiune, putem concluziona că ciupercile microscopice entomopatogene prezintă perspective promițătoare de aplicare în calitate de agenți de control biologic deoarece ele sunt capabile de a infecta adulții, astfel împiedicând depunerea ouălor și daunele provocate de larve. Pe lângă aceasta, ciupercile microscopice entomopatogene prezintă un șir de avantaje și anume: eficiența înaltă, siguranța pentru sănătatea omului, minimizarea reziduurilor de pesticide în produsele alimentare, siguranța pentru speciile non-țintă, astfel promovând biodiversitatea, managementul rezistenței dăunătorilor, potențialul antibacterian și antifungic.

1.4 Biotehnologia producerii și aplicării preparatelor entomopatogene fungice

Pe parcursul a mii de ani, co-evoluția insectelor și ciupercilor microscopice a favorizat apariția speciilor de entomopatogeni fungici. Atenția crescândă a societății umane pentru riscurile utilizării pesticidelor de sinteză, apariția unui număr mare de specii rezistente a constituit premisa pentru reorientarea cercetărilor științifice spre valorificarea mecanismelor naturale de control a dăunătorilor. Studiile care vizează utilizarea preparatelor entomopatogene pe bază de ciuperci microscopice pentru controlul biologic al dăunătorilor confirmă aplicabilitatea și importanța acestui grup de microorganisme (Singh, Rainab, Singha 2017). Pentru a elabora agenți de control biologic pe baza micromicete entomopatogene este necesar de a înțelege biologia și mecanismului de acțiune ale tulpinilor fungice izolate. De asemenea urmează a fi luate în calcul eficiența și costul pentru a le compara cu pesticidele chimice.

Strategia optimă este de a utiliza entomopatogenii fungici în scopul reducerii efectivului numeric al populației de dăunători sub pragul economic de dăunare. Aceasta va reduce cantitatea de spori introduși în mediul ambiant, va scădea costul unei aplicări, și va maximiza beneficiile. Cunoașterea biologiei dăunătorilor permite de a planifica perioadele de aplicare și numărul de aplicări necesare, astfel oferind date necesare pentru analiza cost-eficiență (Kiewnick 2007).

Pentru elaborarea formulei preparatului este important de a cunoaște care tip de spori posedă infectivitate maximă, conidiile sau blastosporii, și de a decide care va fi tipul de cultivare,

la suprafață sau în profunzime. Preparatele pot fi formulate pe mai multe căi (Seaman 1990, Mollet, Grubenmann 2001, Gasic, Tanovic 2013) (figura 1.1).

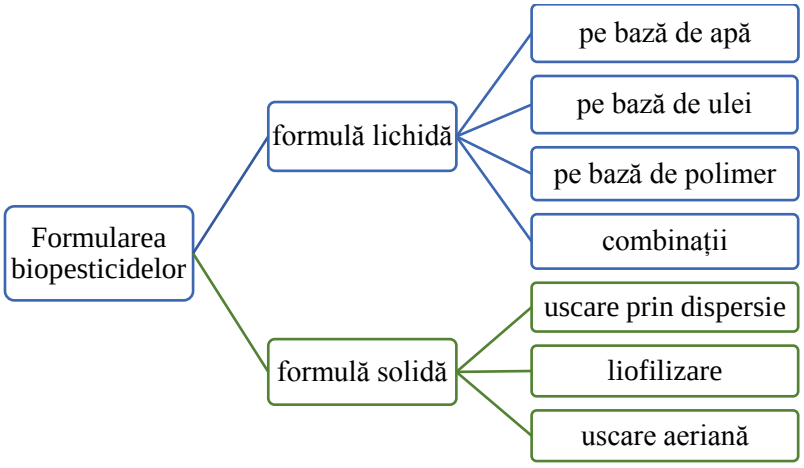


Fig. 1.1. Principalele tipuri de formule a preparatelor entomopatogene fungice

Etapa de formulare ține cont de datele privind creșterea și dezvoltarea tulpinii în diferite condiții ale mediului ambiant și presupune selectarea aditivilor care vor fi adăugați la sporii fungici asigurând stabilitatea produsului pe durata păstrării, protecția tulpinii de acțiunea factorilor nefavorabili ai mediului, sporirea eficacitatății produsului prin favorizarea interacțiunii sporilor cu cuticula insectelor, aplicarea simplificată a produsului cu utilizarea echipamentelor standard.

Tabelul 1.1 de mai jos prezintă formulele biopesticidelor cel mai des aplicate și disponibile pe piață, ingredientele utilizate, avantajele și dezavantajele acestora (Tadros 2005, Knowles 2008).

Tabelul 1.1. Formulele biopesticidelor

Nr.	Tipul de formulare	Ingrediente	Mod de aplicare	Avantaje	Dezavantaje
1.	**Praf (DP)**	1. agent de control (10%), 2. pulbere minerală solidă (talc, argilă etc.) măcinată fin, cu dimensiuni ale particulelor cuprinse între 50-100 µm, 3. agenți UV protectori și materii adezive	direct către țintă, mecanic sau manual	ușor de produs	risc de inhalare
2.	**Prafuri pentru tratarea semințelor (DS)**	1. agent activ, 2. purtător, pulbere, 3. factorul de adeziune	aplicat semințelor prin amestecare	protecția agentului de control	risc de inhalare în timpul păstrării

Nr.	Tipul de formulare	Ingrediente	Mod de aplicare	Avantaje	Dezavantaje
3.	**Granule (GR)** (100-1000 µm, sau microgranule 100-600 µm)	1. agent activ 5-20%, 2. materiale minerale (caolin, silicagel, amidon, polimeri, îngrășăminte uscate și reziduuri de plante măcinate)	aplicate pe sol pentru a controla insectele care trăiesc în sol sau pentru absorbția de plante prin rădăcină	ușor de produs, eliberează treptat agentul de control	este nevoie de umiditate suficientă în sol
4.	**Prafuri umectabile (WP)**	1. ingredient activ, 2. agent tensioactiv, 3. agenți de umectare și dispersie, 4. umpluturi inerte	aplicat după suspensia în apă utilizând echipament standard	stabilitatea îndelungată, buna amestecare cu apa și aplicarea convenabilă folosind echipamente de pulverizare	pot ridica probleme grave de sănătate și siguranță pentru producători din cauza poluării, inhalării iritație a pielii și a ochilor.
5.	**Granule dispersabile în apă (WG)** (alternativa prafurilor)	1. ingredient activ, 2. agent tensioactiv, 3. agenți de umectare și de dispersie, 4. umpluturi inerte	aplicat după suspensia în apă utilizând echipament standard	nu generează praf și cu o stabilitate bună la depozitare, utilizatori,	de obicei, sunt mai scumpe decât tipurile mai vechi de formulări (prafuri, pulberi umede)
6.	**Emulsii** (faza dispersă 0.1 -10 µm, apă în ulei sau ulei în apă)	1. agent activ, 2. emulsifiant	conceput pentru a fi amestecat cu apă înainte de utilizare, poate fi aplicat folosind echipament de pulverizare	protejează agentul activ, ajută la aderarea la suprafața cuticulei	stabilitatea inferioară și fitotoxicitate ocazionale
7.	**Suspensie concentrată (SC)** (ingredient solid activ, 1-10 µm, dispersat în faza lichidă)	1. agent activ, 2. agent de umectare/dispersare, 3. agent de concentrare, în timpul procesului de măcinare, ingredientele inerte adsorbite pe suprafețele particulelor împiedică reagregarea particulelor mici	poate fi aplicat folosind echipament de pulverizare	bazate pe apă, pot fi ușor manipulate, sunt sigure pentru mediu și operator	
8.	**Dispersii în ulei (OD)**	1. agent activ, 2. ulei vegetal	urmează a fi diluat, poate fi aplicat cu utilizarea echipamentelor	oferă posibilitatea de a formula ingrediente active sensibile la apă și o capacitate de a utiliza un fluid	ingredientul urmează a fi selectat riguros

Nr.	Tipul de formulare	Ingrediente	Mod de aplicare	Avantaje	Dezavantaje
			standard prin pulverizare	adjuvant în loc de apă, care poate spori eficacitatea controlului dăunătorilor.	
9.	**Suspo-emulsii (SE)** (amestec de concentrat de suspensie și emulsie)	1. agent activ, 2. agent de disperare, 3. agent de emulsifiere	poate fi pulverizat	combină avantajele suspensiilor și aplicării uleiurilor	este extrem de complicat de formulat
10.	**Capsule în suspensie (CS)** Agent activ microincapsulat în suspensie apoasă	1. ingredient activ, 2. capsulă din gelatină, amidon, celuloză și alți polimeri 3. agenți tensioactivi, 4. agenți de îngroșare	urmează a fi diluat și poate fi pulverizat	agentul de control este protejat de condițiile extreme de mediu (radiații uv, temperatură), iar stabilitatea reziduală a acestuia este îmbunătățită datorită eliberării lente (controlate)	cost ridicat, complexitate de formulare
11.	**Lichide cu volum mic (UL)**	1. concentrații înalte a agentului de control, 2. agenți tensioactivi, 3. agenți de control a drift-ului		ușor de transportat și aplicat	nu pot fi diluate, urmează a fi produse în cantități mari

(surse: Knowles 2005, 2006, Gasic, Tanovic 2013)

Cele mai frecvent utilizate formule pentru preparatele entomopatogene fungice sunt prezentate în tabelul de mai jos (tabelul 1.2).

Tabelul 1.2. Biopesticide fungice

Nr.	Specia fungică	Produs	Formulă	Durata de păstrare
1.	*Beauveria bassiana*	BotaniGard, Naturalis-L, Mycotrol, Bio-Power, Beauverin, Boverol, Proecol	WP, SC	1 an (≤20°C)
2.	*Beauveria brongniartii*	Betel, Schweizer Beauveria	WP	1 an (≤2°C)
3.	*Lecanicillium lecani*	Mycotal, Bio-Catch, Vertalec	WP	0.5 an (≤4°C)
4.	*Metharizium anisopliae*	Bio-Catch -M	WD	1 an (≤4°C)
		Green Muscle, BioCane	G	
5.	*Metarhizium flavoviride var. flavoviride*	BioGreen	WP	0.5 an (≤4°C)
6.	*Isaria fumosorosea*	Preferal, Priority, Futureco, NoFly	WP, WDG	0.5 an (≤4°C)

(sursa: Skinner, Parker 2014)

După ce formula preparatului este elaborată, aceasta urmează a fi testată în câmp pentru a confirma eficacitatea. Impactul tulpinii fungice asupra speciilor non-țintă este deseori o consecință negativă, imposibil de a fi prognozat, determinată doar după aplicarea preparatului în condiții de teren agricol. Studiile întreprinse până la moment au constatat foarte puține cazuri de afectare a speciilor non-țintă. Dacă eficacitatea preparatului este confirmată, urmează producția în masă. La această etapă se studiază posibilitatea de a reduce costurile de producție asociate multiplicării microorganismelor, sau aditivilor utilizați în formula preparatului. Sunt publicate numeroase studii cu privire la producerea fungilor pe substraturi solide (Singh, Rainab, Singha 2017).

Fungii, persista în mediul înconjurător sub formă de spori, focarele de boli fiind declanșate de condițiile speciale de temperatură, umiditate și densitatea populației de insecte. Populațiile de dăunători depășesc, în general, pragul economic de daună până la apariția în mod natural a unui focar de boală. În consecință, obiectivul introducerii agenților patogeni ai insectelor în populațiile de dăunători este de a induce focarele de boli înainte ca populația să atingă un prag economic de daună. Există patru tactici diferite de utilizare a agenților patogeni în controlul insectelor: controlul biologic clasic, introducerea augmentativă, introducerea inundativă și manipularea de mediu.

În controlul biologic clasic, un agent patogen (de obicei neindigen) este introdus în populația dăunătorilor în una sau câteva locații geografice. Agentul patogen se reproduce în populația țintă a dăunătorilor și devine endemic în câțiva ani, reducând permanent nivelul de infestare a dăunătorilor la un prag inferior pragului economic de daună și apoi având drept scop menținerea acestui nivel.

O a doua tactică este augmentatarea inoculativă. În acest caz, agenții patogeni sunt introduși periodic în populațiile în care aceștia deja există pentru a spori nivelul de infecție. Drept rezultat focarul de boală apare mai devreme decât în condiții obișnuite, reducând astfel mărimea populației dăunătorilor sub pragul economic. Cu această abordare, o singură introducere nu poate constitui o măsură de control al dăunătorilor, fiind necesară introducerea repetată a patogenului, la diferite intervale de timp (câțiva ani, anual sau sezonier).

Cea mai frecvent utilizată tactică pentru controlul insectelor cu agenți patogeni este augmentarea inundativă a agentului patogen în populația de dăunători cauzând niveluri înalte ale mortalității. În acest caz este vorba de utilizarea termenului de insecticid microbian. Agentul patogen se aplică după necesitate pentru a menține populația dăunătorilor sub pragul economic de daună. De obicei, această tactică necesită mai puține aplicații decât un pesticid chimic cu spectru larg de acțiune deoarece agentul patogen este mult mai specific decât majoritatea substanțelor chimice și, prin urmare, nu afectează alți inamici naturali ai dăunătorului. Insecticidele microbiene

au primit cea mai mare atenție din partea cercetătorilor, deoarece s-a dovedit a fi cea mai de succes strategie pentru combaterea dăunătorilor și pentru asigurarea profitului economic.

Managementul mediului reprezintă o tactică, în care este îmbunătățită eficiența inamicilor naturali ai insectelor deja existenți în ecosistem, prin ameliorarea factorilor de mediu favorabili dezvoltării acestora. Această abordare este mai des utilizată în cadrul agriculturii ecologice și agriculturii sustenabile, decât în sistemele agricole intensive. Cu toate acestea, practicile agricole (de irigare, recoltare, cultivare) pot influența eficiența metodei (Federici 1996).

1.5 Concluzii la capitolul 1

1. Metodele biologice de control al dăunătorilor reprezintă baza conceptului de management integrat al organismelor dăunătoare, demonstrând importanța pe parcursul istoriei dezvoltării societății umane, acestea trebuie readuse în centrul atenției comunității științifice și a producătorilor agricoli.
2. Fabaceele reprezintă culturi agricole importante din punct de vedere atât economic (fiind utilizate în alimentație, în calitate de furaj), cât și din perspectivele valorificării raționale a resurselor naturale (fiind culturi rotaționale semnificative, deoarece contribuie la ameliorarea stării solurilor).
3. Coleopterele curculionoide, și în special speciile *Sitona lineatus*, *Hypera postica* și *Protapion apricans* reprezintă unii din cei mai periculoși dăunători ai fabaceelor, fiind necesară elaborarea metodelor biologice de control al acestor dăunători.
4. Ciupercile microscopice reprezintă resurse naturale valoroase pentru a fi utilizate în controlul biologic al coleopterelor curculionoide, deoarece pot contribui la reducerea populațiilor de insecte adulte și preveni dezvoltarea larvelor, care aduc cele mai semnificative prejudicii. Biopesticidele pe bază de fungi pot fi produse la un preț redus și au o perioadă de valabilitate relativ lungă. De asemenea, acestea pot fi aplicate cu ușurință, folosind echipamentul standard. Contrar insecticidelor chimice, care posedă un spectru larg de acțiune, tulpinile fungice sunt selective, impactul negativ asupra mediului fiind minim.
5. Pentru dezvoltarea practicilor agricole sustenabile agenții fungici de control biologic trebuie studiați în ansamblu, ca parte componentă a ecosistemului, valorificând toate interacțiunile posibile și construind sinergii.

Programul național de protecție integrată a plantelor pentru anii 2018-2027 și Planul de acțiuni privind implementarea acestuia (Hotărârea Guvernului Republicii Moldova Nr. 123 din 02.02.2018), recent aprobate, pune accent pe utilizarea metodelor biologice de combatere a insectelor dăunătoare. În Republica Moldova microflora speciilor de coleoptere curculionoide, a

fost insuficient studiată, inclusiv microorganismele, care ar putea fi utilizate în controlul biologic al speciilor dăunătoare. Numărul de produse biologice de uz fitosanitar omologate în Republica Moldova este limitat, iar produsele pe bază de fungi lipsesc cu desăvârșire (pesticide.md).

Ținând cont de cele expuse mai sus a fost formulată **problema de cercetare** abordată în cadrul prezentei teze și anume: necesitatea obținerii tulpinilor autohtone de fungi cu activitate insecticidă sporită pentru utilizarea acestora în controlul biologic al dăunătorilor și cu proprietăți favorabile pentru integrarea în calitate de biopesticide în sistemele de producție agricolă.

Direcțiile de rezolvare a problemei de cercetare constau în izolarea micromicetelor din microflora dăunătorilor, identificarea tulpinilor de fungi, evaluarea activității insecticide în condiții de laborator, selectarea celor mai eficiente tulpini și caracterizarea fiziologică a acestora în scopul prognozării efectului aplicării în condiții de camp și elaborarea procedeului de obținere a unui preparat insecticid natural pe bază de fungi.

Scopul lucrării constă în investigarea microflorei fungice a dăunătorilor *Sitona lineatus* L., *Hypera postica* (Gyll.) și *Protapion apricans* (Hbst.) (Coleoptera, Curculionoidea), selectarea agenților de control biologic al dăunătorilor și caracterizarea proprietăților fiziologice ale tulpinilor autohtone de fungi pentru producerea și aplicarea bioinsecticidelor în cadrul agroecosistemelor.

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

1. izolarea și identificarea tulpinilor autohtone de micromicete din microflora speciilor *Sitona lineatus* L., *Hypera postica* (Gyll.) și *Protapion apricans* (Hbst.) (Coleoptera, Curculionoidea);
2. investigarea susceptibilității dăunătorilor *Sitona lineatus* L., *Hypera postica* (Gyll.) și *Protapion apricans* (Hbst.) (Coleoptera, Curculionoidea) la infecția cu tulpinile de fungi izolate cu potențial de utilizare în calitate de agenți de control biologic;
3. determinarea activității insecticide a tulpinilor fungice selectate asupra dăunătorilor țintă *Sitona lineatus* L., *Hypera postica* (Gyll.) și *Protapion apricans* (Hbst.) (Coleoptera, Curculionoidea);
4. caracterizarea particularităților de creștere și dezvoltare a tulpinilor fungice cu activitate insecticidă sporită în diferite condiții ale mediului ambiant pentru elaborarea procedeului de obținere a preparatului autohton cu proprietăți insecticide și recomandărilor de aplicare în ecosistemele agricole.

2. MATERIALE ȘI METODE

2.1 Obiectele de studiu

2.1.1 Speciile de insecte (Coleoptera, Curculionoidea) incluse în cercetare

2.1.1.1 Poziția taxonomică și caracteristica morfologică

Coleopterele curculionoide (Coleoptera, Curculionoidea) sunt gândaci de mărimi mici și mijlocii (1-40 mm), pentru care sunt caracteristice prezența rostrului și antenelor geniculate cu scapul mai îngroșat. Labrumul este absent, iar mandibulele au dimensiuni reduse. Palpii sunt foarte scurți, fiind greu vizibili. Ochii, de obicei, sunt situați pe părțile laterale ale capului și pot fi rotunzi, ovali sau în formă de picătură (Gîdei, Popescu 2014). Elitrele acoperă complet abdomenul, suprafața elitrelor prezintă de regulă linii punctate, strii sau solzi. Majoritatea reprezentanților suprafamiliei Curculionoidea sunt fitofagi îngust specializați trofic atașați de plantele ierboase, dezvoltarea este criptică, de obicei în interiorul țesutului vegetal.

Sitona lineatus. Pentru prima dată, specia *Sitona lineatus* (Coleoptera, Curculionoidea) (=*Curculio lineatus* Linnaeus, 1758; *Parasitones lineatus* Sharp, 1896; *Sitones lineatus* Schönherr, 1840) a fost descrisă de Linnaeus în 1758. Actualmente genul *Sitona* include mai mult de 100 specii, fiind plasat în tribul *Sitonini*, subfamilia *Entiminae*, familia *Curculionidae* care include majoritatea curculionidelor cu rostrum scurt (Velazquez de Castro, Alonso-Zarazaga, Outerelo 2007).

Specia *Sitona lineatus* L. este un dăunător al mazării, *Pisum sativum* L. și bobului *Vicia faba* L. (Fabales, Fabaceae), mai fiind numită gărgărița frunzelor de mazăre. Caracterele morfologice ale speciei *S. lineatus* au fost descrise de Jackson în anul 1920. Insectele adulte au 3,6-5,4 mm lungime, corp alungit cu antene, tibia şi tarsi roşu-maronii. Solzișorii dorsali sunt maro sau gri, intercalați cu perișori plați, fiind dispuși pe elitre în dungi longitudinale, alternante, întunecate şi deschise. Solzişorii au tendinţa de a forma dungi mediane şi sublaterale pe cap şi pronotum. Elitrele sunt paralele, cu umeri proeminenţi. Rostrumul posedă un şanţ central care se extinde după nivelul marginii posterioare a ochiului. Ochii sunt proeminenţi, capul fiind puţin mai îngust decât pronotumul (Petrukha 1969, Hoebeke, Wheeler 1985) (figura 2.1).

Larvele au corpul cilindric, conic la extremități, 1-1,7 mm lungime, segmentele abdominale sunt de culoare albă cremos, cu perișori brun-roșcați pe fiecare segment, au antene reduse, fălci uşor de distins şi nu au ochi. Mandibulele sunt înzestrate cu excrescențe complicate, două mari şi una mică. Larvele mature sunt albe având lungimea de 5-7 mm (figura 2.2 a și b).



a **b**

Fig. 2.1. *Sitona lineatus* L., adult, (orig.)
a - aspect dorsal, **b -** aspect lateral

Pupele sunt de culoare albă-crem cu perişori dorsali. Aspectul extern al pupei aminteşte insecta adultă, fiind prezente toate organele externe (figura 2.2 c). Ochii sunt semi-proeminenţi. Corpul pupei are umflături pieloase, cu perechi de perişori pe ele. Segmentele I-VII au câte 6 perechi de perişori, iar al VIII-lea are doar 3 perechi. Segmentul al IX-lea posedă 2 ţepi mari, lungi, 2 ţepi intermediari şi câte 2 ţepi mici din ambele părţi ale ţepilor mari. Segmentul X este puţin vizibil (Alimdzhanov, 1951, Petrukha 1969). Pupele şi insectele adulte se deosebesc după mărimea şi forma pigidium-ului (segmentul VIII al scutului abdominal).



a **b** **c**

Fig. 2.2. *Sitona lineatus* larve şi pupe
a, b – larve pe rădăcini (autori Carré S., INRA Coutin R., OPIE, Franța), **c –** pupă (http://www7.inra.fr/hyppz/RAVAGEUR/6sitlin.htm)

Hypera postica. *Hypera (Hypera) postica* (Gyllenhal, 1813) (Coleoptera, Curculionoidea) (=*Rhynchaenus postica Gyllenhal,* 1813, *Curculio haemorrhoidalis* Herbst, 1784, *C. variabilis* Herbst, 1795, *C. bimaculatus* Marsham, 1802, *Phytonomus picipes* Curtis, 1826, *P. sublineatus* Curtis, 1826, *P. villosulus* Curtis, 1826, *P. phaeopus* Stephens, 1831, *P. rufipes* Stephens, 1831, *P. parcus* Gyllenhal, 1834, *P. s tibialis* Hochhuth, 1851, *P. sericeus* Capiomont, 1868, *P. siculus* Capiomont, 1868, *P. brevipes* Desbrosher, 1875, *P. austriacus* Petri, 1901, *P. decoratus* Petri, 1901, *P. variabilis* Hbst., *P. posticus* (Gyll.), *P. transsylvanicus* Petri, și *P. murina* F.).

Actualmente genul *Hypera* include 5 subgenuri: *Boreohypera* (1 specie), *Dapalinus* (6 sp.), *Eririnomorphus* (7 sp.), *Hypera* (29 sp.) și *Tigrinellus* (2 sp.). Genul *Hypera* face parte din tribul *Hyperini*, subfamilia *Hyperinae*, familia *Curculionidae*.

Lungimea corpului insectelor adulte este de 4,0-5,5 mm. Rostrumul este aproape drept, relativ scurt și gros, fruntea de aproximativ 2 ori mai lată decât rostrumul. Tulpinile antenelor ating mijlocul ochiului. Ochii aproape plați. Pronotumul devine mai lat la mijloc. Colorația pronotumului constă din două benzi întunecate separate printr-o linie luminoasă îngustă. Elitrele mult mai largi decât pronotumul, umerii puternic proeminenți. Perii sunt puternic înclinați în urmă. Corpul tibiei la mascul este mai îngust și subțire decât la femele, ușor curbat în partea de sus, iar ultimul sternit abdominal la masculi are o adâncitură mică (figura 2.3).



a **b**

Fig. 2.3. *Hypera postica* (Gyll.), adult, (orig.)
a - aspect dorsal, **b -** aspect lateral

Ouăle sunt inițial de culoare gălbuie, apoi devin maro deschis, ovale, de 1,0 × 0,5 mm.

Larvele prezintă 8 segmente abdominale. Primul stadiu larvar de dezvoltare are o singură setă, al doilea stadiu, are trei, iar al treilea și al patrulea stadiu larvar au cinci sete pe fiecare segment abdominal I - VIII (Skuhrovec 2006) (figura 2.4.).

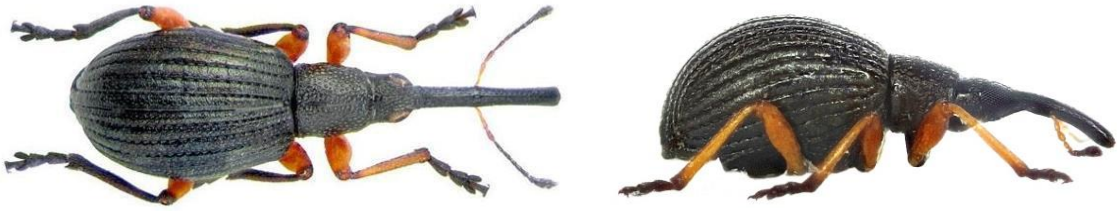


a **b** **c**

Fig. 2.4. *Hypera postica* larve, pupă şi ouă
a – larve pe frunze (Frank Peairs, Colorado State University, www.usu.edu), **b –** pupă (orig.);
c – ouă (Sue Blodgett, Iowa State University, www.forestryimages.org)

Protapion apricans. *Protapion apricans* (Herbst 1797) (Coleoptera, Curculionoidea) (= *Apion apricans* Herbst 1797, *Curculio ochropus* Muller 1776, *C. ochropus* Gmelin 1790, *Apion encaustum* Wencker 1864, *A. tubicen* Wencker 1864, *A. fuscipes* Desbrochers 1891, *A. curvipes* Desbrochers 1895). Actualmente genul *Apion* include 26 specii fiind plasat în tribul *Piezotrachelini,* subfamilia *Apioninae,* familia *Apionidae.*

Dimensiunea insectei 3-3,5 mm, neagră, cu o nuanță metalică, corp în formă de pară, rostrum lung, aproape drept, vârful antenelor negru, la bază - roșu. Lungimea corpului 2,2-2,7 mm fără rostrum. Rostrumul la masculi e mai scurt decât la femele, fiind evident mai mare decât capul și pronotumul. Pronotumul alungit, rareori pătrat. Elitrele mai largi în spate. Primii trei perișori antenali sunt roșii gălbui, segmentele de culoare maro sau neagră. Corpul și membrele sunt negre. Femurul și tibia pe prim-plan sunt gălbui-roșii, la mijloc și spate maro închis sau negru (figura 2.5).



a **b**

Fig. 2.5. *Protapion apricans* (Hbst.)
a - aspect dorsal (K.V. Makarov www.zin.ru), **b-** aspect lateral (Dave Huges, https://www.ukbeetles.co.uk/protapion)

Ouăle au 0,3-0,5 mm, sunt de culoare gălbuie, lungi, netede. Larva atinge 2-2,5 mm, de culoare albă, cu o nuanță crem, curbată, capul maro închis, maxilarul superior pe fiecare parte cu trei crestături. Pupa de 3-3,5 mm, alb-gălbuie.

2.1.1.2 Particularitățile ciclului vital

Conform particularităților ciclului vital curculionoidele pot fi divizate în două grupuri: 1) cele care iernează în stadiul de insectă adultă şi 2) cele care iernează în stadiul de larvă. Toate speciile incluse în studiu se referă la primul grup.

Sitona lineatus. Insectele adulte din specia *S. lineatus* iernează în fâșiile forestiere (Jackson 1920) sau în vecinătatea leguminoaselor perene, inclusiv trifoi şi specii de măzăriche (Schotzko, O'Keeffe 1988, Murray, Clements 1992). În perioada nereproductivă, adulţii sunt oligofagi şi consumă o gama mai largă de plante leguminoase (Landon et al. 1995). Insectele devin active

atunci când temperatura aerului atinge 12-14°C iar la nivelul solului se înregistrează 19-20°C (Petrukha 1969, Hamon et al. 1987). Se disting două perioade de zbor al insectei: zborul migrator de primăvară din locurile de iernare spre planta gazdă, mazăre sau fasole şi zborul pentru iernare vara târziu sau toamna (Fisher, O'Keeffe 1979a). Migrarea de primăvară a insectelor din locurile de iernare spre planta gazdă are loc doar dacă temperaturile favorabile se mențin timp de cel puțin 2-3 zile (Petrukha 1969). În funcție de regiune, insecta adultă migrează spre culturile de leguminoase anuale în lunile martie şi aprilie (Jackson 1920). În regiunile mai reci, spre exemplu în apropierea oraşului Moscova, zborul insectelor revine începutului lunii mai (Belyaev 1934). După ce gărgărițele ajung la planta gazdă (mazăre, fasole, bob, lucernă), are loc împerecherea şi femelele încep depunerea ouălor. Durata perioadei de ovipoziţie variază în funcție de regiune, constituind, în general, un interval de 10 zile (Williams, Schotzko, O'Keeffe 1995). Depunerea ouălor continuă până la o perioadă scurtă de timp înainte de deces, sau până la sfârşitul lunii iunie - începutul lunii iulie (Jackson 1920, Petrukha 1969). Valori maxime ale ovipoziţiei se înregistrează în intervalul dintre 12 - 22° C (Hans 1959). Numărul de ouă pentru o femelă variază de la 354 la 1655 (Jackson 1920) iar conform unor date până la 3500 ouă (Petrukha 1969). La începutul perioadei de ovipoziţie, femela produce doar 1-5 ouă pe zi, iar mai târziu rata crește până la aproximativ 24 de ouă/femelă pe zi (Jackson 1920). Ouăle sunt împrăştiate pe suprafața solului de către femelă concomitent cu hrănirea (Jackson 1920, Hoebeke, Wheeler 1985).

Stadiul de ou pentru specia *S. lineatus* variază în funcție de temperatură şi umiditate. Conform unor autori (Jackson 1920) ouăle eclozează timp de 20-21 zile, însă perioada de incubație poate fi uneori redusă la 18 zile (Prescott, Reeher 1961, Hoebeke, Wheeler 1985). Cercetările efectuate au indicat că ouăle necesită 70 ± 2,5 zile pentru a ecloza la temperatura de 8° C şi doar 6,2 ± 0,5 zile la 29°C. La temperaturi peste 30°C, timpul necesar pentru incubare și rata mortalității crește semnificativ. La temperatura de 33°C nu reușesc să eclozeze 100% din ouă, deși a avut loc dezvoltarea embrionară înaintată (Lerin 2004). Umiditatea relativă poate afecta, de asemenea, timpul de dezvoltare al ouălor. S-a remarcat faptul că ouăle supuse deshidratării excesive nu eclozează (Jackson 1920). După incubare, larva pătrunde în sol în căutarea plantei gazdă, produce o gaură aproape nedetectabilă în nodozitățile rădăcinii şi pătrunde în interior (Jackson 1920, Hoebeke, Wheeler 1985). Larva parcurge toate fazele de dezvoltare timp de 30-60 de zile, în funcție de regiunea geografică şi de temperatura solului (Jackson 1920, Hoebeke, Wheeler 1985, Landon et al. 1995). După maturizare, larvele formează în sol celule-pupale de formă ovală (Jackson 1920). Formarea pupei necesită 16 - 19 zile în Europa (Jackson 1920), şi aproximativ 15 zile în America de Nord (Prescott, Reeher 1961, Hoebeke, Wheeler 1985). Insecta adultă rămâne în sol până ce exoscheletul său este deplin sclerificat (Jackson 1920).

Noua generaţie de insecte adulte se hrăneşte pe ţesutul verde al frunzelor de mazăre şi fasole. Atunci când aceste surse de hrană se epuizează sau frunzele îmbătrânesc, începe o perioadă de zbor extins, în care gărgărițele se hrănesc pe o varietate mai mare de leguminoase gazde secundare (Jackson 1920, Fisher, O'Keeffe 1979 b, c, Hamon et al. 1987, Murray, Clements 1992). Aceasta perioadă continuă până la sfârșitul verii sau toamna, atunci când insectele adulte căută locuri pentru iernare (Jackson 1920, Hoebeke, Wheeler 1985). În America de Nord, Anglia şi Rusia *S. lineatus* este univoltină (Jackson 1920, Hoebeke, Wheeler 1985, Petrukha 1969) cu toate acestea, în unele regiuni specia poate fi bivoltină (Hans 1959, Hoebeke, Wheeler 1985). În câmp, insectele adulte pot trăi până la unsprezece luni, longevitatea fiind limitată de disponibilitatea resurselor alimentare şi densitatea populaţiei. Longevitatea femelelor este mai mare decât longevitatea masculilor la densități scăzute ale populaţiei (Schotzko, O'Keeffe 1988).

Hypera postica. Ciclul de viață al speciei *H. postica* poate fi caracterizat prin perioade scurte de activitate intensă și perioade lungi de inactivitate. *Hypera postica* prezintă o remarcabilă plasticitate comportamentală şi ecologică (Hsiao 1993). Cele mai multe populații sunt univoltine (Helgesen, Cooley 1976), dar în unele medii, în special în regiunile din sud, poate fi o a doua generație (Michelbacher 1943, White et al. 1969). Insecta iernează în stadiul de adult. În localitățile cu ierni blânde, ouăle, larvele și pupele, de asemenea, pot supraviețui iernii (Armbrust, White, deWitt 1969, Radcliffe, Flanders 1998).

În dependență de regiune, în special în cele sudice, depunerea pontei poate avea loc toamna, iarna și primăvara (Woodside, Bishop, Pienkowski 1968, Campbell et al. 1975, Whitford, Quisenberry 1990), ori de câte ori temperaturile depășesc 1,7˚C (Hsieh, Roberts, Armbrust 1974). Tulpina tânără a lucernei este locul preferat pentru depunerea pontei (Pass 1967), cu toate acestea, ouăle sunt depuse și în tulpinile buruienilor, printre care, *Poa bulbosa* L., *Stellaria sp*. (L.), *Capsella bursa - pastoris* (L.) (Ben Saad, Bishop 1969, Niemczyk, Flessel 1970). Odată ce locul pentru depunerea pontei este ales, femela perforează peretele plantei, introduce ovipozitorul și depune un grup de 9-10 ouă de culoare galbenă (Niemczyk, Flessel 1970).

În condiții optime de laborator potențialul de reproducere este ≈ 3650 de ouă per femelă (Coles, Day 1977). Rata de ovipoziție crește liniar cu temperatura până la 30 °C (LeCato, Pienkowski 1972, Hsieh, Roberts, Armbrust 1974). Incubația necesită 156 DD (degree days), cu un prag al temperaturii de 9,0 °C per zi (Roberts, DeWitt, Armbrust 1970). Larva apărută, se alimentează cu măduva tulpinii, apoi creează galerii spre exterior, ieșind urcă pe mugurii foliari terminali cu care se hrănește în continuare. Insecta posedă patru stadii larvare. Temperatura limită de dezvoltare este de 8,9 °C, cu suma temperaturilor necesare pentru a finaliza dezvoltarea larvelor egală cu 148 °C (Litsinger, Apple 1973). Insecta imatură se transformă în pupă și imago, după

acumularea de 77 DD (Hsieh, Roberts, Armbrust 1974). Insecta adultă rămâne în câmpurile de lucernă timp de 1-3 săptămâni pentru hrănirea suplimentară sau până la prima recoltare apoi migrează spre locurile potrivite pentru estivare, de obicei, în afara câmpurilor de lucernă (Tysowsky, Dorsey 1970, Kuhar, Youngman, Laub 2010, Zahiri et al. 2014) unde are loc dezvoltarea sexuală iar activitatea metabolică este încetinită (Litsinger, Apple 1973). Datorită schimbării fotoperioadei, insectele adulte devin din nou active, migrează înapoi spre câmpurile de lucernă, ating maturitatea sexuală, și încep depunerea pontei (Kuhar, Youngman, Laub 2000).

Protapion apricans. Insectele adulte ale speciei *Protapion apricans* hibernează în resturile vegetale de la suprafața solului în câmpurile de trifoi și terenurile adiacente. Unele insecte adulte pot rămâne în diapauză până la 2 ani. Migrația gândacilor din locurile de iernare coincide cu faza de creștere a trifoiului. Hrănirea suplimentară are loc pe frunzele de trifoi sălbatic, și apoi pe cele de cultură (Friedman, Freidberg 2007). Insectele hrănindu-se produc leziuni pe frunze în formă de găuri mici, și, de asemenea, deteriorează, tulpinile, muguri apicali și florali.

Femela depune ouăle în bobocii florilor sau în florile înflorite. Ouăle sunt depuse între staminele florii, fiind aproape de aceeași culoare cu acestea. O femelă poate depune 11-217 ouă, cu o medie de 35 de ouă. Depunerea pontei începe la sfârșitul lunii mai, cu atingerea valorii maximale în luna iunie. Dezvoltarea embrionară durează 8-12 zile. Larvele eclozate pătrund în ovarul florii unde încep nutriția. De-a lungul perioadei de dezvoltare, 15-25 zile, o larvă distruge 7-11 ovare și alte 8-10 ovare pentru împupare, în care larva perforează găuri (Hansen, Boelt 2008, Lundin et al., 2012). Astfel, o larva poate distruge 30-40 % din ovarele unui capitul de trifoi. Pupa se dezvoltă în 5-9 zile (conform altor date 5-12). Insectele adulte apar din a doua jumătate a lunii iulie până în septembrie, uneori - până în octombrie. Înainte de iernare insectele se hrănesc cu o gamă variată de gazde (circa 160 specii de plante). Cele mai mari daune trifoiului sunt aduse de larve. Insecta este univoltină, dar adulții pot trăi 2-3 ani. Un ciclu de dezvoltarea normală de la ou până la insecta adultă durează 40-47 zile.

2.1.1.3 Relațiile trofice

Sitona lineatus. Preferinţele trofice ale speciei *Sitona lineatus* pot fi divizate în 4 grupuri: I. surse alimentare de bază (mazărea, fasolea, bobul şi vicia); II. plante utilizate în absenţa celor de bază (trifoi, lucernă, esparcetă); III. culturi leguminoase pe care insectele le utilizează rar, chiar şi în absenţa plantelor din grupurile I şi II (soia, lupin, linte, latirul, măzărichea păroasă); IV. plante care nu sunt utilizate (agriş, sfecla de zahăr, pin, zmeură, vişine, cireşe, prune, ş.a.) (Turaev 1957).

Adulţii speciei *S. lineatus* după diapauză în calitate de plantă gazdă preferă mazărea de câmp şi fasolea (Landon et al. 1995). Ambele specii de plante au o relaţie simbiotică cu bacteria

azot-fixatore, *Rhizobium leguminosarum* var. *viciae* ceea ce poate explica preferinţa insectei (Spaink 1994, Mutch, Young 2004). Dezvoltarea funcţiei reproductive a femelelor are loc din iulie până în martie în timpul hrănirii pe gazde atât primare cât şi secundare (Schotzko, O`Keeffe 1986a). Cu toate acestea, se crede că oogeneza solicită hrănire post-diapauză pe ambele plante *P. sativum* şi *V. faba* (Hans 1959, Fisher, O`Keeffe 1979a, Schotzko, O`Keeffe 1986a, Hamon et al. 1987, Landon et al. 1995).

Preferințele trofice ale speciei *Sitona lineatus* pot varia de asemenea între genotipurile gazdelor primare, insectele adulte preferând anumite soiuri de mazăre (Havlickova 1980, Cantot 1989, Kordan, Sledz 1994, Wojciechowicz-Zytko, Mlynarczyk 2002). S-a constatat că rata de supraviețuire şi durata de viață a insectei variază în funcție de soiurile de fasole (Wojciechowicz-Zytko, Mlynarczyk 2002). Un număr mare de fabacee perene servesc drept gazde pentru *S. lineatus* primăvara, înainte de apariția leguminoaselor anuale, la sfârşitul verii şi toamna când leguminoasele anuale îmbătrânesc, şi în timpul perioadei de iernare (Jackson 1920, Fisher, O`Keeffe 1979a; Hoebeke, Wheeler 1985, Hamon et al. 1987, Murray, Clements 1992, 1995). Conform unor date, reprezentanții genului *Sitona* au constituit 59- 96% din exemplarele de insecte colectate la sfârşitul verii, pe trifoiul alb, *Trifolium repens* L. (Fabales, *Fabaceae*) (Markkula, Koppa 1960). În Anglia, gărgăriţa frunzelor de mazăre deteriorează în mod semnificativ trifoiul alb, consumând în timpul iernării până la 30% din suprafaţa fotosintetizatoare a plantelor (Murray, Clements 1995). În testările de teren, insectele au preferat trifoiul dulce, *Melilotus albus* L. (Fabales, *Fabaceae*), şi lucerna (Krasnopolskaya 1966, Zlatanov 1966, Lykouressis, Emmanouel 1991, Murray, Clements 1994). Lupinul, *Lupinus albus* L. (Fabales, *Fabaceae*), a înregistrat niveluri semnificative ale deteriorărilor în Germania (Ferguson 1994). În consecinţă *S. lineatus* prezintă un comportament eurioligofag, consumând plante din genurile familiei *Fabaceae* (Petrukha 1969). Conform unor autori *S. lineatus* prezintă „un comportament limitat polifag" (Greib, Klingauf 1977), deoarece în absența de leguminoase în experimentele de laborator și câmp au fost consumate *Polygonum aviculare* L. (Polygonales, *Polygonaceae*) şi speciile de trandafiri *Rosa* spp. (Rosales, *Rosaceae*).

În rezultatul studiilor efectuate în Republica Moldova pentru *S. lineatus* a fost stabilit următorul spectru trofic incluzând reprezentanți ai familiei Fabaceae: *Medicago sativa* (lucerna), *Pisum sativum* (mazăre), *Vicia faba* (bob de fasole), *Trifolium* spp. (trifoiul), *Lotus* spp., *Melilotus* spp., *Ononis* spp. (osul iepurelui), *Robinia* spp. (salcâm) (Malevanciuc, Munteanu 2010).

Hypera postica. Specia *H. postica* se hrănește cu o mare varietate de plante fabacee și este cunoscută în America de Nord ca unul dintre cei mai periculoși dăunători ai lucernei (Hsiao 1993). *H. postica* este o insectă tipic oligofagă care se hrănește aproape exclusiv pe plantele leguminoase

din genul *Medicago*, ocazional, se poate hrăni cu câteva specii din genuri apropiate, inclusiv: *Trifolium* și *Trigonella* (Kuwata et al. 2005, Talwar 2015). De asemenea se mai dezvoltă pe *Medicago lupulina, Melilotus alba, M. officinalis, Trifolium pratense, T. repens, T. hybridum*, și *T. incarnatum.*

Specia are patru stadii larvare: Primul (L1) și a doilea (L2) se hrănesc de obicei cu florile *Medicago sativa* L. Cel de a treilea (L3) și al patrulea (L4) se hrănesc, de asemenea, pe frunze și pot provoca defolieri grave (Hoff, Brewer, Blodgett et al. 2002, Skuhrovec 2006)

Protapion apricans. Habitatele tipice sunt speciile de pajiști montane, și habitatele ruderale segetale (graminee perene), fiind mai rar întâlnită în lizierele pădurilor. În mod regulat și în cantități mari, se găsește pe *Trifolium pratense* (care predomină întotdeauna printre alte specii) (Nazarenko 2013), mai puțin pe *Amoria hybrida, A. repens* și alte leguminoase (*Lupinaster pentaphyllus, Lathyrus vernus, Vicia cracca* și *V. teniuifolia*), la mijlocul verii, adulții, de obicei, pot fi găsiți în coroanele arborilor și arbuștilor.

2.1.2 Speciile de fungi entomopatogeni (Hypocreales) incluse în cercetare

2.1.2.1 Poziția taxonomică și caracteristica morfologică

Beauveria bassiana. *Beauveria bassiana (Balsamo-Crivelli) Vuillemin* (1912) (Hypocreales, *Cordycipitaceae*) (=*Botrytis bassiana* Bals.-Criv., Linnaea 10: 611 (1835), *Spicaria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. (1910), *Penicillium bassianum* (Bals.-Criv.) Biourge, La Cellule 33: 101 (1923), Sporotrichum densum Link, (1809), *Sporotrichum larvatum* Peck, (1879), *Sporotrichum globuliferum* Speg., (1880), *Sporotrichum minimum* Speg., (1882), *Botrytis bassiana* subsp. *tenella* Sacc., (1882), *Botrytis brongniartii* subsp. *delacroixii* Sacc., (1892), *Isaria vexans* R.H. Pettit, (1895), *Isaria citrinula* Speg., (1911), *Sporotrichum epigaeum* var. *terrestre* Dasz., (1912), *Botrytis necans* Massee, (1914), *Botrytis stephanoderis* Bally, (1923), *Sporotrichum sulfurescens* J.F.H. Beyma, (1928), *Isaria shiotae* Kuru, (1932), *Beauveria doryphorae* R. Poiss. & Patay, (1935), *Trichoderma minima* (Speg.) Gunth. Müller (1965)) (de Hoog, 1972). Actualmente genul *Beauveria* include 26 specii descrise (Rehner et al. 2011, Sanjuan et al. 2014, Kepler et al. 2017, Chen et al. 2018, Bustamante et al. 2019).

Ciupercile microscopice din genul *Beauveria* pot fi identificate până la nivel de gen folosind caracterele morfologice. Conidioforii sunt formați din grupuri dense de celule conidiogene, hialine, cu pereții netezi, celulele simpodiale, scurte, globoase, cu rahis apical denticulat sub formă de zig-zag, formând o succesiune de conidii sesile unicelulare (de Hoog 1972, Rehner, Buckley 2005).

In vitro, speciile din genul *Beauveria* cresc de obicei încet, au aspect lânos, de culoare albă, gălbui sau roz. Hifele aeriene sunt hialine, cu pereți netezi și subțiri. Coloniile vechi au aspect de praf datorită unui număr mare de conidii produse de forme variabile, sferice, subsferice, elipsodiale (de Hoog 1972, Rehner et al. 2011). În plus, unele specii sau tulpini pot produce pigmenți, de culoare roșie, (de Hoog 1972). Caracterele morfologice nu sunt suficiente pentru a identifica cu exactitate reprezentanții genului *Beauveria* până la nivel de specie (Robene-Soustrade et al. 2015, Imoulan et. al. 2017).



Fig. 2.6. Tulpină de *Beauveria bassiana*, aspect macroscopic (Lucille K. Georg http://www.publicdomainfiles.com/show_file.php?id=13518211215847)

Tulpinile de *B. bassiana* fiind cultivate *in vitro* formează colonii cu diametrul de 6-23 mm în 8 zile, (de Hoog 1972), 15–32 mm timp de 10 zile la 23 °C (Rehner et al. 2011) au aspect lânos, catifelat, de pudră cu înălțimea de până la 5 mm, la început alb, după care gălbui sau roz. Rar formează exudat, mirosul lipsește. Hifele submerse cu pereții netezi, 1,5-3 µm. Hifele miceliului aerian hialine, cu pereții netezi, 1-2 µm, târâtoare sau ascendente care poartă grupuri de celule laterale umflate, de cele mai multe ori de 3-6 × 3-5 µm, care prin ramificare ulterioară dau naștere la celule mai mici umflate sau 1-5 celule conidiogene. La tulpinile proaspăt izolate, conidiile sunt strâns grupate; la tulpinile mai vechi ramificarea devine mai puțin strânsă, celulele conidiogene apar în grupuri mici sau solitar pe celule laterale elipsoidale până la subcilindrice (până la 15 × 6 µm), sau apar direct din hife. Celulele conidiogene sunt formate dintr-o parte bazală, uneori alungită globuloasă, în formă de balon, de cele mai multe ori cu dimensiunile 3-6 × 2,5-3,5/6 µm (de Hoog 1972, Rehner et al. 2011), celule terminale mai subțiri cu un rahis bine dezvoltat, cu lungimea de aproximativ 20 µm lungime și lățimea de 1 µm, geniculat sau îndoit neregulat, denticulat, denticulele cu lățimea și lungimea de 1 µm. Conidiile sunt hialine sau rar gălbui, netezi,

sferice până la elipsoidale, uneori cu o bază apiculată, (1,5-) 2-3 (-4) × (1,5-) 2-2,5 (-3) µm (de Hoog 1972, Rehner et al. 2011). Nu au fost observați clamidospori. Miceliul pe substrat natural formează de obicei o pâslă deasă, granular-pulverulentă, gălbuie, rar roșiatică. Partea bazală a celulelor conidiogene sferică, sub-sferică, cu dimensiunile de 2,5-4×2-3 µm (de Hoog 1972) (figura 2.6).

Isaria fumosorosea. *Isaria fumosorosea* Wize, (1904) (Hypocreales, *Cordycipitaceae*) (=*Paecilomyces fumosoroseus (Wize) A.H.S. Brown & G.Smith, (1957), Spicaria fumosorosea* (Wize) Vassiljevsky, (1929), *Cordyceps fumosorosea* (Wize) Kepler, B. Shrestha & Spatafora, (2017), *Spicaria aphodii* Vuill., (1910), *Monilia aquatilis* Malguth, (1928), *Paecilomyces hibernicus* Kennelly & Grimes, (1930), *Paecilomyces isarioides* N. Inagaki, (1962). Conform studiilor recente de reconstrucție a relațiilor filogenetice cu utilizarea metodelor molecular genetice (Kepler et al 2017) genul este redenumit în *Cordyceps*, aparținând familiei Cordycipitaceae.

Coloniile au o rată de creștere moderată, ating 3-4 cm în diametru timp de 10 zile, coloniile tinere au aspect pulverulent, sporulează activ, unele tulpini pot produce coremii (numite și sinemate) distinctive, culturile sunt albe la început, culturile bătrâne au aspect de fulgi, zonele conidiale pot dezvolta lent nuanțe de roz (figura 2.7).



Fig. 2.7. Tulpină de *Isaria fumosoroseus*, aspect macroscopic (F. Ihara http://www.naro.affrc.go.jp/org/fruit/epfdb/Deutte/Paecilo/fumo/P_fumos.htm)

De obicei exudatul este absent, unele tulpini produc picături incolore mici. Mirosul lipsește. Miceliul cu pereți netezi, hialini, 1,0-3,2 µm lățime. Conidioforii provin preponderent din miceliu cufundat în substrat, având lungimea de până la 60 µm lungime, 2,0-3,0 µm lățime, cu pereți netezi, ramificați neregulat, sau care poartă verticile dispuse câte 2-5 pe ramuri divergente; ramuri

cilindrice scurte, 4-10 × 2,3-3,5 um, purtând frecvent ramuri secundare. Conidioforii și ramurile acestora se termină cu fialide dispuse în grup de 1-6 (de obicei 2-4). La culturile mai vechi conidioforii apar de obicei ca ramuri laterale scurte pe miceliu aerian, cu lungimea de 7-28 µm, puțin ramificate, frecvent monoverticilate, sau cu fialide solitare sau verticile de fialide dispuse neregulat pe miceliu. Pe conidioforii complecși fialidele sunt relativ scurte, 5-9 × 2,5-3,3 µm, elipsoidale în partea inferioară, îngustându-se brusc într-un gât scurt de aproximativ 1 µm lățime; fialidele solitare și fialidele de pe conidiofori simpli, au 8-30 × 1,5-2,5 µm, alungite sau ușor umflate la bază, trecând treptat într-un gât relativ lung. Conidiile sunt hialine, cu pereți netezi, cu forma elipsoidală spre alungite, cu vârful rotund sau ascuțit, 2,5-4,0 × 1,4-2,2 µm (în mediu 3,6 × 1,7 µm), conidiile ocazionale până la 5,0 × 2,6 µm; în lanțuri scurte (Brown, Smith 1957).

2.1.2.2 Particularitățile ciclului vital

Beauveria bassiana. Tulpinile de micromicete din specia *B. bassiana* sunt răspândite în sol. Deși se pot nutri saprofit fiind cu ușurință cultivate în vitro pe medii nutritive, acestea în ciclul său vital au nevoie de insecte pentru a produce cantități semnificative de spori care vor asigura supraviețuirea și răspândirea speciilor. Speciile de fungi din ordinul Hypocreales sunt concurenți slabi pentru substanțele organice din sol comparativ cu micromicetele saprofite oportuniste care sunt omniprezente în soluri (Meyling, Eilenberg 2007). Conidiile prezente în sol fiind hidrofobe se atașează la stratul ceros/suprafața chitinoasă a gazdei, Are loc recunoașterea receptorilor de la suprafața acestora (Holder, Keyhani 2005, Mora et al. 2017). Conidiile germinează, cu formarea tubului germinativ, acesta crește la suprafața cuticulei și o penetrează prin rupturi mecanice și digestie enzimatică (Vega et al. 2012, Mora et al. 2017). Ulterior micromiceta ajunge în hemolimfă și produce blastospori. Aceștia se reproduc prin înmugurire ocolind răspunsul imun al gazdei (Lord, Stanley 2012, Saranraj, Jayaprakash 2017). După epuizarea resurselor blastosporii produc hife care cresc spre exteriorul gazdei producând la suprafața insectei cantități impunătoare de conidii. Pe parcursul perioadei de vegetație sunt înregistrate focare de infecție în populațiile de insecte. Intensitatea focarelor depinde mai mulți factori abiotici și biotici (Inglis et al. 2001, Meyling, Eilenberg 2007, Jaronski 2010). Conidiile sunt răspândite prin intermediul vântului, ploii și a insectelor. Din numărul total de conidii produse doar o cantitate mică va reuși să infecteze noi gazde (Meyling, Eilenberg 2007). De asemenea tulpinile de *B. bassiana* pot exista în calitate de endofiți ai plantelor de cultură precum porumbul (*Zea mays* L.) (Wagner, Lewis 2000), sorg (*Sorghum* spp.) (Tefera, Vidal 2009), fasole (*Phaseolus vulgaris* L.) (Parsa, Ortiz, Vega 2013, Afandhi, Widjayanti, Emi 2019), bumbac (*Gossypium hirsutum* L.) (Lopez, Sword 2015), ardei

dulce (*Capsicum annum* L.) (Jaber, Alananbeh 2018) fără a produce daune plantelor, asigurând protecția acestora față de dăunători și patogeni.

Isaria fumosorosea. Ciclul vital al speciei este similar cu cel al altor specii de fungi entomopatogeni din ordinul Hypocreales. Conidiile de *I. fumosorosea* care intră în contact cu cuticula gazdei produc enzime capabile de a penetra cuticula gazdei. Are loc formarea tubului germinativ (inclusiv a apresoriului) care penetrează cuticula și pătrunde în hemocel. Micromiceta poate de asemenea să pătrundă în corpul insectei prin orificiul bucal, sau anal. Miceliul se dezvoltă în interiorul insectei și ulterior crește spre exterior producând conidii. Insecta piere datorită lipsei de substanțe nutritive, distrugerii țesuturilor și din cauza toxinelor produse de fungi (Castellanos-Moguel, 2013).

Tulpinile de *I. fumosorosea* de asemenea sunt obiectul cercetărilor privind existența în calitate de endofiți ai plantelor de cultură fiind date privind potențialul de a coloniza grâul (*Triticum aestivum* L.) (Werner, Saar, Stephan 2015, Koch et al. 2018).

2.1.2.3 Relațiile trofice

Beauveria bassiana. *B. bassiana* este o specie cosmopolită care poate fi izolată din sol, insecte, filosferă și ocazional din țesuturile vii ale plantelor. *Beauveria bassiana* (*Bb*) este un agent patogen fungic comun dar puțin înțeles al multor grupuri de insecte, fiind cunoscută pentru capacitatea de a infecta mai mult de 700 de specii de insecte din majoritatea ordinelor (Goettel et al 1990, Inglis et al. 2001, Meyling, Eilenberg 2007, Rohrlich et al. 2018). Cu toate acestea, tulpinile individuale de *B. bassiana* izolate de pe anumite specii de insecte, pot prezenta un spectru îngust de acțiune (Rohrlich et al. 2018). Spectrul trofic în condiții de câmp este de obicei mai îngust decât în condiții de laborator, fiind influențat de componenta spațio-temporală, planta-gazdă și de factorii abiotici. Specificitatea față de gazdă a tulpinilor de *B. bassiana* este încă insuficient studiată fiind necesare studii minuțioase (Rohrlich et al. 2018).

Isaria fumosorosea. Specia prezintă un spectru relativ mare de gazde cu răspândire largă pe glob. Este întâlnită în sol, pe plante, în aer (Zimmermann 2008). A fost izolată din aproximativ 40 de specii de artropode din 10 ordine de insecte, mai frecvent fiind izolată din lepidoptere (Smith 1993, Hoy, Raghuwinder, Rogers 2010, Majeed et al. 2017, Jessica et al. 2018, Usanmaz-Bozhuyuk et al. 2018). Tulpinile de *I. fumosorosea* sunt considerate non-toxice pentru om și au efect minim asupra speciilor nevizate dacă sunt aplicate corect (Osborne, Landa 2002, Copping 2004, Zimmerman 2008). Unele tulpini au spectru îngust de acțiune pe când altele spectru larg de acțiune (Zimmerman 2008). Există puține date privind ecologia și biologia acestei specii fiind necesare studii extensive.

2.2 Metodele de studiu

2.2.1 Metode entomologice

Pentru a izola micromicete din corpul insectelor au fost colectate exemplare adulte din speciile *Sitona lineatus*, *Hypera postica* și *Protapion apricans*. Colectările au fost realizate în perioada lunilor aprilie - septembrie 2010 și 2016 în 6 localităţi din Nordul, Centrul şi Sudul Republicii Moldova (Glodeni, Lozova, Siret, Ivancea, Copanca, Congaz) (tabelul 2.1).

Tabelul 2.1. Data şi locul colectării materialului biologic

Nr.	Locul colectării	Coordonate geografice	Data colectării	Planta gazdă	Specia	Nr. de exemplare
1.	**Copanca**	N 46° 42′ 55″ E 29° 37′ 37″	03.09.2010	lucernă	*H. postica*	13
					S. lineatus	10
					P. apricans	9
2.	**Ivancea**	N 47° 17' 08" E 28° 51' 17"	14.07.2010		*H. postica*	11
					S. lineatus	7
					P. apricans	8
3.	**Glodeni**	N 47° 46′ 15″ E 27° 30′ 52″	27.04.2010		*H. postica*	12
					S. lineatus	11
					P. apricans	4
4.	**Siret**	N 47° 08′ 02″ E 28° 42′ 51″	27.04.2010		*H. postica*	6
					S. lineatus	8
					P. apricans	5
5.	**Lozova, r. Codrii**	N 47° 07' 58" E 28° 23' 09"	15.04.2010		*H. postica*	6
					S. lineatus	3
					P. apricans	3
6	**Vrănești-Orhei**	N 47° 24' 11" E 27° 36' 07"°	09.06.2016		*H. postica*	200
					S. lineatus	100
					P. apricans	50
7	**Congaz**	N 46° 03' 04" E 28° 34' 13"	10.06.2016		*H. postica*	100
					S. lineatus	200
					P. apricans	50

Pentru colectarea insectelor au fost utilizate metode clasice entomologice (Bacal, Cocîrță, Munteanu 2014), care includ cosirea cu fileul entomologic, scuturarea insectelor pe bucăți de pânză, colectarea manuală. Insectele vii din aceeași specie au fost transportate în masă în cutii cu lucernă proaspătă asigurând accesul aerului, evitând expunerea la radiațiile UV și căldură excesivă. Insectele evident infectate cu micromicete patogene prezentând simptome și semne caracteristice ale bolii (modificări de culoare, melanizarea cuticulei, creșterea agentului patogen la exteriorul insectei, semnele agentului în interiorul gazdei, vizibile prin cuticulă, comportament ciudat, inclusiv lipsa hrănirii sau poziția neobișnuită pe planta gazdă, mumifierea, fragilitatea sau întărirea tegumentului, diferențe notabile în mărime și alte semne și simptome) au fost transportate în

laborator separat în eprubete de sticlă sterile cu dop de bumbac și plasate individual în cutii de plastic. Confirmarea corectitudinii identificării speciilor a fost realizată prin consultarea materialului Muzeului de Entomologie al Institutului de Zoologie al AȘM. Identificarea apartenenței specifice a coleopterelor curculionoide a fost efectuată cu utilizarea lupei binoculare BEL Photonics.

2.2.2 Metode microbiologice

2.2.2.1 Izolarea și evidențierea în cultură pură a tulpinilor fungice

Izolarea fungilor din exemplare fără semne de infecție fungică. Pentru a izola micromicetele din insectele vii suprafața insectelor adulte a fost sterilizată în alcool de 70%, după care insectele au fost spălate în apă distilată sterilă. Eficacitatea procedurii de sterilizare a fost confirmată prin agitarea insectei tratate în mediul nutritiv Nutrient Agar (NA) steril lichid (1L H_2O dublu-distilată; 5g Tryptone, 3g extract de drojdii, 5g NaCl, pH 7,4) fiind verificată prezența dezvoltării microorganismelor după 1-3 zile. Pentru cultivare au fost utilizate 4 tipuri de medii nutritive (tabelul 2.2).

Tabelul 2.2. Denumirea și compoziția mediilor nutritive utilizate pentru izolarea micromicetelor

Nr. d/o	Denumirea	Produ-cător	Compoziție chimică	Condiții de preparare
1.	**PDA (Potato Dextrose Agar)**	Merck	1L H_2O dublu-distilată; 4g infuzie din cartofi; 20g D-glucoză; 15g Agar microbiologic; pH 5,6±0,2.	autoclavare 15 min, 121°C, 1,1 bar
2.	**PDA selectiv**	Merck	1L H_2O dublu-distilată; 4g infuzie din cartofi; 20g D-glucoză; 15g Agar microbiologic; pH 5,6±0,2; suplimentat cu 2ml/L Ampicilină cu concentrația de 25 mg/ml	autoclavare 15 min, 121°C, 1,1 bar
3.	**SAPF (Selectiv Agar for Pathogenic Fungi)**	Merck	1L H_2O dublu-distilată; 10g peptonă din soia; 10g D-glucoză; 0,4g Cicloheximidă; 0,05g Cloramfenicol; 12,5g Agar microbiologic; pH 6,9±0,2	fierbere până la dizolvarea completă
4.	**SAPF înalt selectiv**	Merck	1L H_2O dublu-distilată; 10g peptonă din soia; 10g D-glucoză; 0,4g Cicloheximidă; 0,05g Cloramfenicol; 12,5g Agar microbiologic; pH 6,9±0,2; suplimentat cu 5ml/L dodine, 65 mg/L	fierbere până la dizolvarea completă

Corpurile insectelor au fost plasate în tuburi Ependorff de 1,5 ml conținând 800 µl de apă dublu-distilată sterilă și triturate intens cu ajutorul bețișoarelor sterile. Câte 100 µl de suspensie au fost aplicate pe suprafața cutiilor Petri.

Au fost însămânțate 40 de cutii Petri, câte 8 de pe fiecare exemplar selectat. Cutiile Petri au fost incubate timp de 2-3 zile la temperaturile 20 și 25°C (câte 10 cutii respectiv). Ulterior coloniile fungice au fost selectate și reinoculate pe cutii Petri cu mediile PDA și SAPF, respectiv până la obținerea culturilor pure.

Pentru obținerea unei culturi pure ce conține un singur genotip au fost izolate conidii individuale. Câte 15 µl de suspensie de conidii cu concentrația de 10^4 conidii/ml au fost dispersate la suprafața mediului nutritiv solid PDA. Culturile au fost examinate în câmp luminos la obiectivul 10X al microscopului, în scurt timp după ce suspensia a fost absorbită de mediu. După ce a fost identificată o conidie izolată, zona respectivă cu diametrul de 4-5 mm a fost excizată aseptic și transferată într-o cutie Petri nouă cu mediul PDA steril.

Izolarea fungilor din exemplare de insecte cu semne de infecție fungică. Micromicetele au fost recoltate direct de pe suprafața cadavrelor de insecte cu semne vizibile de micoză. Sporii distali au fost transferați în cutii Petri ce conțineau mediu nutritiv steril (tabelul 2.2) utilizând o cantitate mică de mediu nutritiv plasat pe vârful unui ac steril.

Dacă sporularea externă nu a apărut, cadavrele au fost plasate în cutii Petri pe hârtie de filtru sterilă umectată cu apă dublu distilată sterilă pentru ca micromiceta să producă hife sau conidii externe. Pentru insectele care au murit de micoze, creșterea vegetativă și/sau sporularea pe suprafața tegumentului, la temperatura de 20-25 °C, are loc, de obicei, în decurs de câteva zile (Lacey, Solter 2012). După 2-3 zile a fost observată creșterea pronunțată a fungilor la suprafața cadavrelor, acestea au fost transferate pe cutii Petri cu mediu nutritiv selectiv steril.

2.2.2.2 Cultivarea și păstrarea tulpinilor fungice

Tulpinile de micromicete entomopatogene izolate în cultură pură au fost cultivate la suprafață pe mediul PDA pentru întreținerea de rutină și producerea de conidiospori. Pentru a evita deshidratarea cutiile Petri au fost sigilate cu parafilm.

Reinocularea în serie pe medii artificiale a fost evitată, deoarece acest lucru duce la modificări genetice care pot afecta fenotipul (atenuarea virulenței). Sporularea se produce în decurs de 7-10 zile. Conidiile au fost recoltate direct de pe suprafața mediului cu ajutorul ansei microbiologice sterile. Conidiile și miceliul pot fi depozitate la 4-5 ºC, timp de până la câteva săptămâni sau chiar luni. Pentru păstrarea de lungă durată a genotipului inițial al tulpinilor izolate acestea au fost plasate în soluție de glicerol 10% la temperatura de -80 ºC. Tulpinile fungice entomopatogene de interes au fost depuse în Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie.

2.2.2.3 Identificarea fungilor în baza caracterelor morfologice

Tulpinile fungice izolate au fost identificate morfologic în baza examinării microscopice a conidiilor și celulelor conidiogene. Din mediul nutritiv au fost excizate blocuri mici (cu suprafața de cca 1cm^2) și au fost plasate pe o lamă de sticlă sterilă. Blocul de mediu solid a fost inoculat cu țesut fungic, și acoperit cu o lamelă sterilă. Capacul cutiei Petri a fost înlocuit cu unul steril, iar cultura a fost incubată la temperatura de 25ºC.

După 3 zile devine vizibilă creșterea vegetativă a micromicetei la suprafața lamelei. După 4-5 zile lamelele au fost scoase din blocul de agar, culturile au fost tratate cu lacto-fucsină și examinate la microscopul optic în câmp luminos (metoda Brightfield). Pentru identificare au fost folosite chei dihotomice de identificare (Humber 2012).

2.2.2.4 Estimarea susceptibilității insectelor țintă la infecția cu tulpinile fungice potențial patogene

Identificarea prezenței unui agent patogen suspectat într-o insectă bolnavă nu incriminează întotdeauna organismul ca agent cauzal al bolii. Verificarea satisfacerii postulatelor lui Koch este cel mai bun mod de oferi un diagnostic final corect. Pentru a confirma că microorganismul izolat este agentul cauzal al bolii trebuie parcurși următorii pași (Kaya, Vega 2012, Lacey, Solter 2012):

1. Agentul patogen trebuie să fie izolat din toate insectele bolnave examinate, iar semnele și/sau simptomele bolii înregistrate.

2. Agentul patogen trebuie să fie cultivat în cultură aseptică pe un mediu nutritiv (pentru agenți facultativ patogeni), sau într-o insectă susceptibilă (pentru agenți obligat patogeni), și trebuie să fie identificat și/sau caracterizat.

3. Agentul patogen trebuie sa fie inoculat pe/în insecte sănătoase din aceeași specie sau o specie înrudită cu originalul, fiind prezente aceleași semne și simptome ale bolii.

4. Agentul patogen trebuie să fie izolat în cultură aseptică sau într-o insectă susceptibilă, din nou, iar caracteristicile sale trebuie să fie exact ca și cele observate la pasul 2.

Pregătirea inoculului. Pentru a pregăti inoculul, conidiile au fost recoltate de pe suprafața mediului și transferate cu ajutorul ansei microbiologice sterile într-un tub de 1,5 ml ce conținea 0,5 ml de apă distilată sterilă. Masa de conidii a fost agitată ușor manual (prevenind eliberarea conidiilor în aer). Pentru a suspenda uniform conidiile hidrofobe în apă, au fost folosite metode de suspensie mecanică fără a provoca deteriorarea celulelor. Ulterior micropistilul a fost atașat la motor și suspensia a fost agitată viguros cu deplasarea pistilul pe verticală și orizontală timp de cca 30 s. La suspensia obținută au fost adăugat suplimentar 0,5 ml apă distilată sterilă. Conidiile recent recoltate dintr-un mediu agarizat pot fi rehidratate prin plasare directă în apă cu luarea unor

măsuri de precauție. Îmbibarea rapidă a apei de conidiile deshidratate poate deteriora membranele celulare. Acest lucru poate fi evitat prin utilizarea apei calde (33 °C) sau prin rehidratarea prealabilă în condiții de umiditate ridicată (Inglis, Enkerli, Goettel 2012).

Cuantificarea conidiilor în inocul. Cuantificarea numărului de propagule per unitate de volum a fost realizată cu utilizarea hemocitometrului (camera Goreaev). Suspensia apoasă ce conține propagule a fost centrifugată și aproximativ 10 µl au fost transferate în camera hemocitometrului. Pentru a asigura sedimentarea conidiilor hemocitometrului a fost plasat în poziție orizontală timp de aproximativ 5 min. evitând evaporarea excesivă a apei. Conidiile fungice au fost numărate în 5 pătrate mari divizate în 16 mici (total 80 pătrate mici) situate pe diagonală. Volumul unui pătrat mic este de 0,00025 mm^3 (µl) = 1/4000 mm^3 (µl). Pentru a evita numărarea dublă a conidiilor unei celule i-au fost atribuite doar conidiile care intersectează sau ating laturile de sus și din stânga. Numărul de propagule a fost calculat conform formulei (2.1):

$$C=\frac{N\times d\times 4\times 10^6}{80} \qquad (2.1)$$

unde: C – concentrația propagule/ ml,
N – numărul de propagule în 80 pătrate mici ale camerei Goreaev,
d – diluția suspensiei.

A fost calculat numărul mediu de propagule per pătrat și deviația standard. Cuantificarea a fost validată dacă valoarea deviației standard a fost de maxim 10-15% din valoarea medie.

Suspensia inițială a fost diluată pentru a obține concentrația dorită cu ajutorul formulei (2.2):

$$C_1\cdot V_1= C_2\cdot V_2 \qquad (2.2)$$

unde: C_1 - este concentrația inițială,
V_1- este volumul necesar pentru diluarea suspensiei inițiale,
C_2 este concentrația dorită,
V_2 - este volumul final dorit.

Evaluarea viabilității conidiilor. Deoarece metoda hemocitometrului nu face distincție între conidiile viabile și non-viabile, pentru a ajusta dozele utilizate în teste a fost determinată viabilitatea conidiilor. De asemenea a fost evaluată viabilitatea conidiilor după păstrarea timp de ~90 de zile a tulpinilor la diferite temperaturi, valori ale pH, salinitate, ș.a. Rezultatele au fost obținute în termen de 24 de ore.

Astfel, 100 µl suspensie de conidii ce conținea 10^6 conidii a fost distribuită uniform pe suprafața cutiei Petri cu diametrul de 90 m ce conținea mediu PDA steril. Conidiile au fost incubate la întuneric, la temperatura de 25 ºC timp de 24 h. Conidiile au fost considerate viabile, dacă lungimea tubului germinativ a fost de două ori mai mare decât diametrul acestora. Pentru *B. bassiana*, umflarea vizibilă a conidiilor germinate a fost utilizată ca semn al viabilității. Au fost enumerate 200 conidii. Viabilitatea conidiilor a fost determinată conform formulei (2.3):

$$R=\frac{N}{T}\times 100\% \qquad (2.3)$$

unde: R – viabilitatea/rata de germinare,

N – numărul de conidii ce au germinat,

T– numărul total de conidii enumerate.

Metoda a fost reluată în 3 repetiții pentru fiecare tulpină fungică. Pentru a calcula numărul de spori viabili per unitate de volum, cantitatea de conidii/ml determinată cu ajutorul hemocitometrului a fost multiplicată cu valoarea ratei de germinare.

Testarea activității insecticide a tulpinilor fungice în condiții controlate. În scopul cercetării susceptibilității dăunătorilor țintă la infecția cu tulpinile fungice cu potențial entomopatogen și selectării celei mai active tulpini au fost pregătite suspensii cu concentrația de 10^9 spori/ml din fiecare tulpină fungică identificată ca aparținând genului *Beauveria* și *Isaria*. În experiențe au fost utilizate exemplare adulte din speciile *Sitona lineatus*, *Hypera postica* și *Protapion apricans.* Insectele au fost inoculate indirect la suprafața tegumentului. În calitate de martor a fost utilizată soluția de apă distilată sterilă. 1 ml de inocul a fost aplicat pe hârtie de filtru sterilă plasată în cutii Petri sterile. Ulterior în fiecare cutie Petri au fost plasate câte 10 exemplare din fiecare specie de insectă. Insectele au fost lăsate să se deplaseze pe suprafața hârtiei de filtru timp de 1 h pentru a intra în contact cu sporii fungici (Watson et al. 1995).

După inoculare, insectele au fost incubate câte 10 în cuști cu lucernă proaspătă, la temperatura camerei de 25±1 ºC și durata zilei de 14h. Verificarea mortalității a fost efectuată fiecare 24 de ore. Cadavrele insectelor au fost îndepărtate înainte ca micromiceta să sporuleze pentru a preveni transmiterea orizontală. Ulterior cuștile au fost spălate, sterilizate iar lucerna a fost schimbată. Pentru a confirma că moartea insectelor a fost cauzată de infecția fungică cadavrele au fost plasate în eprubete sterile cu dop de bumbac în condiții de umiditate sporită urmărind dezvoltarea miceliului. Pentru a urmări respectarea postulatelor lui Koch fungii au fost inoculați pe mediu nutritiv PDA steril și confirmată identitatea prin analiza microscopică.

Mortalitatea insectelor a fost calculată folosind formula lui Abbott (1925). Mortalitatea insectelor cauzată de tulpina fungică (exprimată în procente) este (2.4):

$$P=\frac{C - T}{C}\times 100\% \quad (2.4)$$

unde: P – este procentul estimat al insectelor ucise doar de patogen,

C – este numărul de insectele vii în tratamentul de control,

T – este numărul insectelor care au supraviețuit după tratament.

Determinarea activității insecticide a tulpinilor selectate. În scopul stabilirii corelației doză-timp-mortalitate pentru tulpinile fungice care au demonstrat activitate insecticidă sporită a fost pregătită o serie din cinci diluții ale culturii tulpinii în apă distilată sterilă cu pasul 10. În calitate de martor a fost utilizată apa distilată sterilă. Insectele au fost inoculate conform metodei descrise mai sus. Pentru fiecare concentrație au fost folosite câte 10 exemplare adulte din speciile *Sitona lineatus* și *Hypera postica.* Experiențele au fost realizate în 3 repetiții.

Activitatea biologică a tulpinilor exprimată în LC_{50} a fost calculată după formula lui Spearman-Karber în valorile concentrației de spori în diluții ale culturilor fungice (Rath 2011) (2.5):

$$\log_{10} LC_{50}= \log_{10} C_m - \delta(\sum L-0,5) \quad (2.5)$$

unde : C_m – concentrația maximală, δ – logaritm zecimal din raportul dintre concentrația precedentă și concentrația următoare testată, (2.6)

$$L=\frac{(\rho_0 - \rho_k)}{(1 - \rho_k)} \quad (2.6)$$

unde: ρ_0 – raportul de insecte moarte în lotul experimental,

ρ_k – raportul de insecte moarte în lotul martor.

2.2.2.5 Caracterizarea particularităților de creștere și dezvoltare a tulpinilor fungice cu activitate insecticidă sporită în diferite condiții ale mediului ambiant

Pentru a caracteriza tulpinile fungice care au demonstrat potențial insecticid maximal în condiții de laborator și a prezice eficiența contra speciilor de insecte testate în condiții de câmp au fost întreprinse un șir de studii suplimentare.

Studierea efectului temperaturii asupra creșterii și dezvoltării tulpinii fungice. Temperatura este un factor important ce determină rata de germinare, creștere și sporulare a tulpinilor fungice.

a) Determinarea influenței temperaturii asupra creșterii vegetative.

A fost pregătită suspensie de conidii în apă distilată sterilă, cu concentrația de 10^5 conidii/ml. Câte 100 µl suspensie au fost distribuite uniform la suprafața mediului nutritiv PDA steril cu ajutorul spatulelor Drigalski sterile și cultivate timp de 3 zile la temperatura de 25°C. Din aceste culturi fungice în faza activă de creștere au fost excizate discuri de miceliu cu diametrul de 5 mm fără semne de sporulare. Câte un disc a fost transferat în condiții aseptice în centrul unei noi cutii Petri cu mediu PDA steril. Cutiile Petri însămânțate au fost plasate la temperaturile de 15, 20, 25, 30 și 35°C. Pentru fiecare temperatură și fiecare tulpină fungică investigată au fost folosite câte 4 cutii Petri. Cutiile fungice au fost sigilate cu parafilm și plasate în termostat pentru o perioadă de 2 săptămâni. Creșterea radială a micromicetei a fost înregistrată zilnic cu ajutorul riglei prin efectuarea a două măsurări reciproc perpendiculare. Creșterea radială a majorității fungilor entomopatogeni din ziua a 3-a până în a 12-a urmează un model linear. Luând în considerare acest lucru viteza de creștere (în mm/zi) a fost utilizată ca parametru de bază pentru caracterizarea influenței temperaturii asupra creșterii vegetative a tulpinilor investigate (Fargues et al. 1997).

b) Determinarea influenței temperaturii asupra sporulării și viabilității conidiilor.

O porțiune de miceliu cu diametrul de 5 mm a fost excizată din culturile fungice menținute timp de 30 de zile la temperaturile 15, 20, 25, 30 și 35 °C. Pentru fiecare temperatură au fost luate câte 4 discuri cu diametrul de 5 mm și plasate în tuburi Eppendorf de 1,5 ml ce conțineau 1000 µl de apă distilată sterilă. Conținutul eprubetelor a fost vortexat la viteza 1000 rot/min. Din fiecare eprubetă au fost luate câte 100 µl suspensie și transferate în eprubete noi ce conțineau 300 µl de apă distilată sterilă (diluând suspensia de 4 ori). Conținutul a fost amestecat prin vortexare la viteza 1000 rot/min. Cantitatea de conidii a fost cuantificată folosind hemocitometrul conform metodei descrise mai sus. Numărul de conidii a fost raportat la suprafața discurilor. Viabilitatea conidiilor a fost evaluată conform metodei descrise mai sus.

Studierea efectului luminii solare asupra creșterii și dezvoltării tulpinilor fungice. Lumina solară este unul din factorii de bază care afectează rata de supraviețuire a conidiilor în câmp, razele UV-B (295-320 nm) fiind cele mai distructive. Totodată iradierea cu raze UV activează procesul de reparare prin fotoreactivare. Pentru a estima efectul luminii solare asupra conidiilor au fost pregătite suspensii ce conțineau 10^6 conidii în apă distilată sterilă, și expuse radiațiilor UV cu lungimea de undă 312 nm cu maxima la 300-310 nm timp de 10, 20, 30 și 40 (Mustafa, Gurvinder 2008 cu unele modificări) În calitate de martor au servit propagulele neiradiate plasate în condiții similare. După expunere la UV câte 100 µl suspensii conidiale au fost inoculate la suprafața cutiilor Petri cu mediu PDA steril și plasate pentru creștere la temperatura de 25°C. După 24h de la inoculare a fost determinată rata de germinare conform metodei descrise

mai sus. Viabilitatea conidiilor iradiate a fost comparată cu viabilitatea conidiilor neiradiate folosind formula (2.7):

$$R=\frac{N}{T}\times 100\% \qquad (2.7)$$

unde: R – viabilitatea conidiilor iradiate,

N – numărul de conidii iradiate ce au germinat,

T– numărul de conidii germinate în proba martor.

Din aceste culturi fungice în faza activă de creștere au fost excizate discuri de miceliu cu diametrul de 5 mm fără semne de sporulare. Câte un disc a fost transferat în condiții aseptice în centrul unei noi cutii Petri cu mediu PDA steril. Cutiile Petri însămânțate au fost plasate la temperatura de 25 °C. Pentru fiecare durată de expunere la UV și fiecare tulpină fungică investigată au fost folosite câte 4 cutii Petri. Cutiile fungice au fost sigilate cu parafilm și plasate în termostat. Datele privind creșterea radială au fost înregistrate zilnic timp de 2 săptămâni.

Studierea influenței pH-ului mediului nutritiv asupra creșterii vegetative, sporulării și viabilității conidiilor. Au fost pregătite 5 variante de mediu nutritiv PDA cu diferit pH după cum urmează 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 și 9.0 utilizând NaOH (cristalin) și 1M HCl. Mediul nutritiv PDA cu pH 5.6 a fost folosit în calitate de martor. Discuri de miceliu excizate din culturi proaspete în faza activă de creștere au fost transferate pe cutiile Petri respective și incubate la temperatura de 25℃. Pentru fiecare variantă de mediu nutritiv au fost folosite câte 4 cutii Petri. Viteza de creștere radială, sporularea și viabilitatea conidiilor au fost determinate conform metodelor descrise mai sus.

Studierea influenței salinității mediului nutritiv asupra creșterii vegetative, sporulării și viabilității conidiilor. Au fost pregătite 6 variante de mediu nutritiv PDA cu diferite concentrații de sare după cum urmează 1, 2, 3, 5, 7 și 9% de NaCl. Mediul nutritiv PDA fără adăugare de NaCl a fost folosit în calitate de martor (Mert, Dizbay 1977). Discuri de miceliu excizate din culturi proaspete în faza activă de creștere au fost transferate pe cutiile Petri respective și incubate la temperatura de 25 °C. Pentru fiecare concentrație de sare au fost folosite câte 4 cutii Petri. Viteza de creștere radială, sporularea și viabilitatea conidiilor au fost determinate conform metodelor descrise mai sus.

Studierea influenței presiunii osmotice asupra viabilității tulpinii, creșterii și dezvoltării. Au fost pregătire suspensii ce conțineau 10^6 conidii/ml în câte 1 ml soluție de NaCl cu următoarele concentrații: 0,006 M, 0,06 M și 0,6 M în 4 repetiții. Conidiile au fost menținute în soluțiile respective timp de 24h la temperatura 25 °C. Suspensiile de conidii menținute în apă distilată sterilă au fost folosite în calitate de martor (Piatkowski, Krzyzewska 2007 cu unele

modificări). După 24h a fost evaluată rata de germinare a conidiilor. Ulterior câte 100 µl suspensie au fost distribuite uniform la suprafața mediului nutritiv PDA cu ajutorul spatulelor Drigalski sterile. Pentru fiecare concentrație de NaCl testată au fost utilizate câte 4 cutii Petri. După 72h de la inoculare, din mediul nutritiv au fost excizate discuri de miceliu cu d=5mm și transferate pe mediu nutritiv PDA steril. Viteza de creștere radială, sporularea și rata de germinare au fost înregistrate conform metodelor descrise mai sus.

2.2.3 Metode molecular-genetice

Metodele molecular-genetice de cercetare oferă perspective valoroase în cunoașterea biologiei micromicetelor entomopatogene. Revizuirea informației taxonomice bazată pe relațiile filogenetice a transformat fundamental taxonomia fungilor și a avut efecte profunde asupra multor grupuri taxonomice de micromicete entomopatogene.

Utilizarea metodelor molecular-genetice a devenit un lucru obișnuit în microbiologie, inclusiv pentru identificarea fungilor entomopatogeni. Metodele biologiei moleculare reprezintă instrumente puternice care facilitează detectarea, identificarea/caracterizarea și/sau cuantificarea ciupercilor microscopice. Pentru identificarea și caracterizarea tulpinilor fungice izolate au fost folosite metode molecular-genetice dependente de cultivare.

2.2.3.1 Protocolul de extragere a acizilor nucleici din materialul experimental

Pentru procedura de extragere a ADN au fost utilizate tulpini fungice izolate din corpul insectelor *S. lineatus*, *H. postica* și *P. apricans*. Extragerea acizilor nucleici din tulpinile fungice izolate a fost efectuată cu ajutorul kit-ului de extragere a ADN-ului genomic, DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN). Pentru aceasta, 100 mg de cultură fungică au fost omogenizate în mojar cu adăugare de azot lichid până la obținerea unei pulberi fine. Omogenizatul a fost transferat într-un tub Eppendorf de 2 ml pentru evaporarea azotului evitând dezghețarea materialului biologic. La omogenizat au fost adăugate 400 µl AP1 Buffer și 4 µl ARN-aza A (100 mg/ml) și vortexate minuțios. Amestecul obținut a fost incubat la 65 °C timp de 10 min. inversând de 2-3 ori tuburile. Această etapă asigură lizarea celulelor. La amestecul de lizare s-au adăugat 130 µl AP2 Buffer cu incubare pe gheață timp de 5 min. Această procedură asigură precipitarea detergenților, a proteinelor și polizaharidelor. Lizatul a fost centrifugat timp de 5 min. la 14 mii rot/min. Supernatantul a fost transferat într-o coloană QIAshredder Mini plasată într-un tub de colectare de 2 ml și centrifugat timp de 2 min la 14 mii rot/min pentru înlăturarea debrisului celular. Faza filtrată a fost transferată atent într-un tub nou. La această etapă, se obțin 450 µl de soluție ce conține ADN. Au fost adăugate 675 µl de Buffer AP3/E amestecând prin pipetare. 650 µl de amestec au fost

transferate într-o coloană DNeasy Mini plasată într-un tub de colectare şi centrifugate la ≥ 8000 rot/min. Filtratul a fost înlăturat atent şi procedura a fost reluată utilizând amestecul rămas. Ulterior coloana DNeasy Mini a fost plasată într-un tub de colectare nou, adăugând 500 µl Buffer AW, şi centrifugând timp de 1 min la 8 mii rot/min. Filtratul a fost înlăturat atent, au fost adăugate din nou 500 µl Buffer AW şi amestecul a fost centrifugat timp de 2 min la 14 mii rot/min.

ADN-ul purificat a fost eluat din coloana Dneasy utilizând soluția AE Buffer sau apă sterilă deionizată. Rezultate optimale au fost înregistrate în cazul unei eluări repetate. Coloana DNeasy Mini a fost transferată într-un tub de microcentrifugare și adăugate 100 µl AE Buffer (10 mM Tris·Cl; 0,5 mM EDTA; pH 9,0.) direct pe membrana Dneasy. Incubăm timp de 5 min. la temperatura camerei (15-25 °C) și centrifugăm timp de 1 min. la 8000 rot/min. Volumul eluat a fost de 100 µl soluție ce conține ADN.

Cantitatea de ADN a fost estimată vizual prin electroforeză în gel de agaroză de 1,5 % (1,5 g agaroză, 100 ml soluție tampon Tris-Acetat-EDTA TAE 1x, 3 µl bromură de etidiu) timp de 30 min, la 150V, 100 A, 1x. Pentru prepararea a 1 L de soluție tampon TAE 50x au fost necesare 242 g baza Tris 57, 10 ml acid acetic glacial, 100 ml 0,5M EDTA pH 8,0 şi H_2O distilată până la 1 L. În calitate de colorant a fost folosit Loading Dye. Gelul a fost vizualizat sub UV la 264 nm, în camera de vizualizare.

2.2.3.2 Amplificarea fragmentelor ADN polimorfice (PCR)

Amplificarea fragmentelor de ADN s-a bazat pe procedeul PCR (Polymerase Chain Reaction) sau reacţia de polimerizare în lanţ. Amplificarea ADN s-a realizat în termocicler automat, iar testarea calității ADN s-a realizat prin metoda electroforezei în gel de agaroză.

Genele nucleare ce codifică ARN*r*-ul fungilor sunt constituite din regiuni înalt conservative şi regiuni variabile. Ele includ genele pentru ARN*r* care formează subunitățile mică (18S ARN*r*) şi mare (5,8S şi 28S ARN*r*) a ribozomilor (White et al. 1990). Porțiunile de genă ITS (Internal Transcribed Spacer) sunt alcătuite din 2 regiuni necodificatoare variabile localizate între regiunile codificatoare 18S şi 5,8S (ITS 1) şi între regiunile 5,8S şi 28S (ITS 2) (figura 2.8).

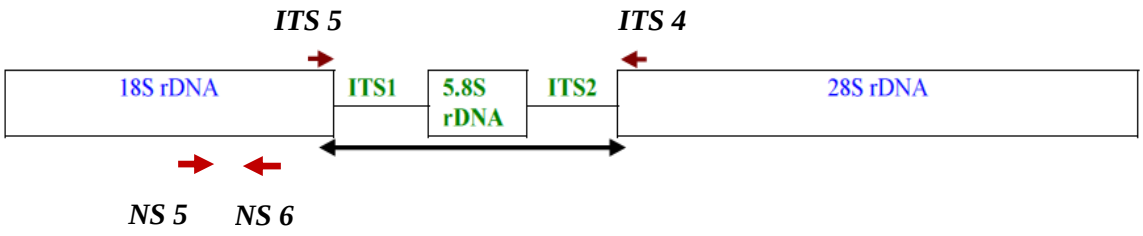


Fig. 2.8. Schema amplasării genelor ce codifică ARN*r* fungic şi situs-urile de aliniere a primerilor

Amplificarea fragmentelor de ADN a fost realizată cu utilizarea a două perechi de primeri (figura 2.8, tabelul 2.3).

Tabelul 2.3. Primerii utilizați pentru identificarea tulpinilor fungice

Nr. d/o	Denumire primer	Succesiunea nucleotidică	Porțiunea de ADN amplificată	Lungimea fragmentului de ADN amplificat	Autor
1.	**ITS4**	5′ TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3′	spacer-ul transcriptibil şi porțiunea de genă care codifică ARN*r* 5,8S	570-590 pb	White et al. 1990
	ITS5	5′ CAA GGC ATC CAC CGT 3′			
2.	**NS5**	5′AAC TTA AAG GAA TTG ACG GAA G 3′	gena ce codifică ARN*r* 18S	310 pb	White et al. 1990
	NS6	5′ GCA TCA CAG ACC TGT TAT TGC CTC 3′			

Amestecul de reacție pentru fiecare probă (10 µl) a fost compus din:

- $_{dd}H_2O$ 8,1 µl;
- PCR Buffer 10 x 1,0 µl;
- dNTP 5 mM 0,2 µl;
- Primer 1 0,05 µl;
- Primer 2 0,05 µl;

- RedHot polymerase 0,1 µl;
- ADN testat 0,5 µl (≈0,1µg/ml).

Amplificarea ADN s-a realizat în amplificatorul automat T1 Plus Thermocycler Biometra în următoarele regimuri termice:

1. 94°C pauză
2. 94°C 2:00 min
3. 94°C 0:30 min
4. 55°C 0:30 min — 34 cicluri
5. 72°C 2:00 min
6. 72°C 5:00 min — 1 ciclu
7. 4°C pauză

Vizualizarea produsului amplificării a fost efectuată prin electroforeză în gel de agaroză (1,5 %) conţinând bromură de etidiu, în lumina ultravioletă. De asemenea s-a folosit un marker (Smart Ladder) care a confirmat mărimea corectă a benzii amplificate, şi colorantul Loading Dye 6x 3 µl la 3 µl de produs PCR.

2.2.3.3 Protocolul de purificare a produsului PCR

Purificarea produsului PCR a fost efectuată cu ajutorul setului de reagenți Mini Elute PCR Purification Kit (QIAGEN). La 1 volum de produs PCR se adaugă 5 volume de soluție PB Buffer și se amestecă. Nu este necesar de a înlătura uleiul mineral sau petrolul lampant. Dacă soluția tampon PB conține indicator al pH -ului, se verifică ca culoarea amestecului să fie galbenă. În caz contrat adăugăm 10 µl de acetat de sodiu, 3M, pH 5,0. Pentru a lega ADN amestecul obținut a fost transferat într-o coloană MinElute plasată într-un tub de colectare de 2 ml şi centrifugat timp de 1 min. Filtratul a fost înlăturat. Coloana MinElute a fost plasată în același tub de colectare, au fost adăugate 750 µl de PE Buffer şi tuburile au fost centrifugate timp de 1 min. pentru a spăla ADN. Filtratul a fost vărsat și tuburile au fost centrifugate adițional timp de 1 min. la viteză maximală. După centrifugare coloana MiniElute a fost plasată într-un tub nou de microcentrifugare de 1,5 ml.

Pentru a elua ADN pe centrul membranei au fost adăugate 10 µl de soluție EB Buffer (10 mM Tris·Cl, pH 8,5) sau apă deionizată, sterilă, tubul a fost lăsat în repaus timp de 1 min. apoi centrifugat timp de 1 min. Important este ca soluția de eluare să fie picurată direct în centrul membranei. Eluarea maximă se obține la pH 7-8,5. ADN-ul poate fi eluat de asemenea în soluție-tampon TE (10 mM Tris·Cl, 1 mM EDTA, pH 8,0) însă EDTA poate să inhibe reacțiile enzimatice ulterioare.

Produsul PCR a fost analizat prin electroforeză în gel de agaroză (1,5 %) conținând bromură de etidiu, în lumina ultravioletă. De asemenea s-a folosit un marker (Smart Ladder) care a confirmat mărimea corectă a benzii amplificate, şi colorantul Loading Dye 6X, 3 µl la 3 µl de produs PCR.

2.2.3.4 Secvențierea produselor PCR

Secvențierea produselor PCR a fost efectuată prin metoda dideoxi-terminală (metoda Sanger) utilizând kit-ul ABI PRISM TM Dye Terminator Cycle Ready Reaction, AmpliTaq® DNA Polymerase (Perkin-Elmer) şi ABI PRISM TM 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems).

Esenţa metodei dideoxi-terminale constă în introducerea în amestecul de reacție a unor dideoxi-nucleotide, incapabile de a forma legături fosfo-diesterice cu alte nucleotide. La inserarea acestor nucleotide în lanțul nou sintetizat de ADN, elongarea este stopată. În rezultat se obțin fragmente de ADN care diferă în lungime cu câte un nucleotid. La electroforeză cel mai scurt fragment care conține un dideoxi-nucleotid va migra primul. În continuare aparatele de detecție înregistrează nucleotidul marcat ca primul din succesiunea fragmentului ADN.

Metoda Dye-terminator constă în utilizarea dideoxi-nucleotidelor marcate fluorescent, care emit lumină de lungimi de undă diferite. Acest lucru permite secvențierea fragmentului de ADN într-o singură reacție, comparativ cu patru reacții necesare în cazul utilizării nucleotidelor marcate radioactiv. Secvențierea regiunilor ITS și a porțiunilor din gena ARNr 18S, amplificate și purificate a fost realizată în SeqLab GmbH**,** Germania.

2.2.4 Metode statistice și bioinformaţionale

2.2.4.1 Metode statistice și bioinformaţionale utilizate pentru analiza succesiunilor nucleotidice.

Prelucrarea statistică a datelor a fost efectuată cu ajutorul programului de calcul PRIMER 6.0. Editarea și alinierea nucleotidelor sectoarelor de ADN secvenţiat au fost efectuate cu ajutorul softurilor BioEdit 4.0 şi Mega 7.

Secvenţierele regiunii ITS şi ale fragmentului genei 18S ARNr au fost aliniate cu secvenţierile similare disponibile în baza de date GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) utilizând programul de căutare BLAST (Altschul et al. 1990, 1997).

Reconstruirea arborelui filogenetic a fost efectuată cu ajutorul metodelor matricelor-distanţate (algoritmele [Neighbour-joining] şi [UPGMA]) utilizând programele de calcul TreePuzzle 5.2, PhyML v3.0 şi MEGA 7.0 (Kumar, Stecher, Tamura 2016).

2.2.4.2 Metode statistice utilizate pentru analiza și interpretarea datelor

Pentru prelucrarea statistică a datelor obținute au fost utilizați următorii indici statistici:

Media aritmetică (notată cu m *)* reprezintă raportul dintre suma valorilor individuale sau a datelor numerice şi numărul lor (2.8):

$$m = \frac{\sum x}{N} \qquad (2.8)$$

unde:

m = media aritmetică,

$\sum x$ = suma valorilor/rezultatelor individuale,

N = numărul total al valorilor, rezultatelor pe întregul eșantion.

Amplitudinea/ variaţia posibilă (notată cu **d)** reprezintă abaterea fiecărei valori a caracteristicii de la nivelul mediu al caracteristicii respective. Ea se obţine calculand diferenţa dintre fiecare valoare individuală a variabilei (x) şi nivelul mediu (m) al caracteristicii (2.9):

$$d = x - m \qquad (2.9)$$

unde:

x = valoarea caracteristicii,

m = media aritmetică.

Abaterea/ deviaţia medie (notată cu D_m) reprezintă media abaterilor de la *medie* (este vorba de media aritmetică) ale fiecărei valori, fără să se ţină cont de sensul şi semnul acestor valori, adică luând in considerare abaterile de la medie in valoare absolută (2.10):

$$D_m = \frac{\sum d}{N} = \frac{\sum |x - m|}{N} \tag{2.10}$$

unde:

x = valoarea caracteristicii,

m = media aritmetică,

N = numărul total al valorilor, rezultatelor pe întregul eșantion.

Dispersia/ varianţa (notată cu $\boldsymbol{\sigma^2}$ sau $\mathbf{s^2}$) se calculează cu ajutorul formulei (2.11):

$$\sigma^2 = \frac{\sum (x - m)^2}{N - 1} \tag{2.11}$$

unde:

x = valoarea caracteristicii,

m = media aritmetică,

N = numărul total al valorilor, rezultatelor pe întregul eșantion.

Abaterea standard/ abaterea medie pătratică/ abaterea tip (notată cu **σ** sau **s**) se calculează cu ajutorul formulei (2.12):

$$\sigma = \sqrt{\sigma^2} \tag{2.12}$$

Abaterea standard este cel mai răspândit indicator de dispersie, care caracterizează nivelul de omogenitate/ eterogenitate al unui set de date, în raport cu o variabilă. Ea urmărește să exprime gradul de împrăștiere/ dispersie a valorilor in jurul mediei.

Calcularea intervalelor de încredere a fost realizată folosind formula (2.13):

$$\left(m - t_{\alpha,\, n-1} \frac{\sigma}{\sqrt{N}};\ m + t_{\alpha,\, n-1} \frac{\sigma}{\sqrt{N}}\right) \tag{2.13}$$

unde:

m = media aritmetică,

σ = abaterea standard,

$t_{\alpha,\, n-1}$ = coeficientul student,

N = numărul total al valorilor, rezultatelor pe întregul eșantion.

Analiza dispersională unifactorială (ANOVA)

Analiza unifactorială de varianță (ANOVA) a fost utilizată pentru a determina, dacă există diferențe semnificative din punct de vedere statistic între mediile a trei sau mai multe grupuri independente.

Toate calculele și reprezentările grafice au fost realizate folosind aplicația MS Office Excel 2010 și MS Office PowerPoint 2010.

2.3 Concluzii la capitolul 2

1. Metodele clasice și modern, utilizate în acest studio, au permis de a izola și identifica noi tulpini fungice cu potențial insecticide, constituind bazele unei colecții de tulpini autohtone, agenți bioactivi pentru obținerea biopesticidelor în Republica Moldova.
2. Metodele molecular-genetice au permis identificarea la nivel de specie a tulpinilor fungice izolate și au redus substanțial timpul necesar pentru identificare.
3. Metodele microbiologice, utilizate pentru caracterizarea proprietăților fiziologice ale tulpinii de *Beauveria bassiana,* permit prognozarea eficacității tulpinii în diverse condiții ale mediului ambiant, elaborarea procedeului de obținere și aplicare a preparatului insecticid.
4. Metodele statistice și bioinformaționale au contribuit la interpretarea și validarea rezultatelor obținute.

3. MICROFLORA FUNGICĂ A SPECIILOR DE COLEOPTERE CURCULIONOIDE INVESTIGATE

Cercetările prezentate în acest capitol au urmărit caracterizarea microflorei fungice a coleopterelor curculionoide incluse în studiu. Au fost investigate modalitățile de izolare și identificare a tulpinilor native de micromicete cu potențial entomopatogen și optimizarea procedurilor de obținere a agenților de control biologic. În acest scop au fost utilizate două metode de izolare a micromicetelor: 1 - izolarea fungilor din exemplare de insecte fără semne de infecție fungică și 2 – izolarea directă a fungilor din exemplare de insecte cu semne de infecție fungică. În total au fost izolate 55 tulpini fungice dintre care 42 tulpini fungice au fost izolate din exemplare fără semne de micoză, iar 13 tulpini fungice au fost izolate prin recoltare directă din exemplare cu semne de micoză. Tulpinile de micromicete izolate din exemplare de insecte vii au fost identificate folosind metodele molecular-genetice iar cele izolate din exemplare cu semne de infecție au fost identificate morfologic.

3.1 Identificarea tulpinilor fungice cu utilizarea metodelor molecular-genetice

Studiile comparative a secvenţierilor genelor ARN*r* oferă posibilitatea de a evidenția relațiile filogenetice a diferitor grupuri taxonomice (Woese, Olsen 1986, Medlin et al. 1988, Jorgensen, Cluster 1989). Genele ce codifică ARN*r* a subunităţilor mici ribozomale (ARN*r* 18S) sunt conservative şi evoluează relativ lent fiind utile în studiul organismelor îndepărtate filogenetic. Regiunile ITS (Internal Transcribed Spacer – Spațiator Intern Transcris) evoluează mult mai rapid şi pot varia în cadrul speciilor unui gen sau în cadrul populațiilor (White et al. 1990). În ultimii 15 ani regiunea ITS a ADN-ului nuclear a fost utilizată pentru analiza diversității fungice în probele din mediu. Recent regiunea ITS a fost selectată în calitate de marker oficial pentru barcodarea ADN-ului fungic (Deliberation of 37 mycologists from 12 countries at the Smithsonian's Conservation and Research Centre, Front Royal, Virginia, May 2007) (Bellemain et al. 2010). Identificarea exactă a agenților de control biologic este un pas important pentru elaborarea programelor de control biologic al dăunătorilor. Ca urmare a studiilor filogenetice moleculare, au fost realizate modificări considerabile în clasificarea fungilor. Utilizarea metodelor molecular-genetice a permis de a reuni formele sexuate (teleomorfe) de formele asexuate (anamorfe) ale aceleași specii, care mult timp au considerate specii diferite și a permis reclasificarea speciilor de micromicete entomopatogene în încrengătura Ascomycota. Studiul filogenetic este de asemenea important deoarece permite de a prezice trăsăturile comune ale speciilor înrudite, inclusiv spectrul de gazde.

Identificarea tulpinilor de fungi în baza succesiunii nucleotidice parţiale ale genei *ARNr* 18S. În rezultatul studiului întreprins au fost identificate folosind metodele molecular-genetice 42 tulpini fungice, 38 dintre ele aparținând încrengăturii Ascomycota (L1/4, L1/6, L1/7, L1/8, L2/2, L2/5, L2/6, L3/5, L5/4, L5/6, B, C, N, Hp1/4, Hp1/6, Hp2/2, Hp3/2, Hp3/3, Hp3/4, Hp3/5, Hp3/9, Hp4/2, Hp4/3, Hp5/4, Hp5/5, Hp5/6, Hp5/7, Hp5/41, Hp5/12, Hp5/13, Hp6/1, Hp6/3, Pa1, Pa2, Pa3, Pa4, Pa7, Pa8), 2 tulpini fiind din încrengătură Basidiomycota (L1/5, L2/1) şi două din încrengătura Mucormycota (L6/4, Hp3/13). Datele privind rezultatul analizei BLAST a succesiunilor nucleotidice parțiale ale genei ARN*r* 18S (NCBI GenBank) și speciile fungice asociate tulpinilor izolate sunt prezentate în tabelul 3.1.

Tabelul 3.1. Rezultatele analizei BLAST a secvenţelor parţiale a genei ARNr 18S

Tulpina fungică izolată	**Specia fungică asociată**	**Numărul de acces**	**Similaritatea (%)**	**Referinţă bibliografică**
L1/4	*Aspergillus flavipes* HKF6	HM773224	100	Nepublicată
	Aspergillus flavipes	JF831014	100	Nepublicată
L1/5	*Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*, CBS 132	HQ596559	99	Nepublicată
	Cryptococcus neoformans var. *neoformans* AFLP2_CBS918	JN939440	99	Nepublicată
	Cryptococcus neoformans var. *neoformans* AFLP2_CBS6995	JN939439	99	Nepublicată
	Cryptococcus gattii gsk	HQ659559	99	Nepublicată
L1/6, B, N	*Cordyceps tuberculata* NBRC 106956	JN941744	100	Nepublicată
	Cordyceps militaris NBRC 30377	JN941756	100	Nepublicată
	Beauveria bassiana STB	JF429894	100	Nepublicată
L1/7, L3/5, Hp3/2, Hp3/4, Hp4/2	*Paraconiothyrium africanum* STE-U 6316	EU295654	98	Damm et al. 2008
	Paraphaeosphaeria sporulosa	AB303549	98	Takano et al. 2006
	Paraphaeosphaeria sp. B19	GQ253350	98	Zhou et al. 2010
	Didymocrea sadasivanii PF12	FJ941861	98	Ding et al. 2011
	Didymocrea sadasivanii CBS 438.65	DQ384066	98	Kruys, Eriksson, Wedin 2006
	Phaeosphaeria eustoma AFTOL-ID 1570	DQ678011	97	Schoch et al. 2006
	Phaeosphaeria avenaria f. sp. *avenaria* ATCC 58582	EU189207	97	Nepublicată
L1/8, Hp5/6, Hp5/7	*Fusarium equiseti* Salicorn 8	KJ413063	100	Nepublicată
	Fusarium oxysporum MMS5A	KF691805	100	Nepublicată
	Fusarium proliferatum EFB3b	KF691815	100	Nepublicată
	Fusarium oxysporum H3	HM210090	100	Gong, Lu, Xu 2011

Tulpina fungică izolată	Specia fungică asociată	Numărul de acces	Similaritatea (%)	Referinţă bibliografică
L2/1	*Rhodotorula graminis* SCAU-13	HM371376	99	Nepublicată
	Rhodotorula graminis NCYC 502	X83827	99	Cai, Roberts, Collins 1996
	Rhodotorula glutinis AFTOL-ID 720	DQ832194	99	Matheny et al. 2006
	Rhodotorula graminis WP1	EU563924	99	Xin, Glawe, Doty 2009
L2/2, Hp5/5, Hp6/3	*Alternaria alternata* HA4087	KF962959	99	Nepublicată
	Alternaria alternata SRC1lrK2f	HM216191	99	Santelli et al. 2010
	Alternaria alternata NCPF 7147	HQ691422	99	Pashley et al. 2012
	Alternaria alternata S-f6	HM165489	99	Tang, Zhao, Li 2011
	Alternaria maritima CBS 126.60	GU456294	99	Zhang et al. 2009
	Alternaria cheiranthi B2F-25c-3	JX456605	99	Nepublicată
L2/5, C, Pa2, Pa3	*Penicillium commune* MA09-AL	GQ458026	99	Arteau, Labrie, Roy 2010
	Penicillium commune IBT 15141	AF548089	99	Wu et al. 2003
	Penicillium expansum BS30	EF491160	99	Subramanian et al. 2008
	Penicillium italicum UPSC 1577	AF548091	99	Wu et al., 2003
	Aspergillus cervinus	AB003808	99	Tamura, Kawahara, Sugiyama 2000
	Penicillium solitum 20-01	JN642222	98	Eldarov et al. 2012
L2/6, L5/4, Hp5/4	*Aureobasidium pullulans* HN6.2	FJ023536	98	Nepublicată
	Aureobasidium pullulans	JN546123	98	Nepublicată
	Aureobasidium pullulans var. *pullulans* CBS 584.75	EU682922	98	Loncaric et al. 2009
	Aureobasidium pullulans DSM 62074	EU707930	99	Loncaric et al. 2009
L5/6	*Paecilomyces lilacinus* TS02	FJ941875	98	Ding et al. 2011
	Paecilomyces lilacinus SF1	HQ600978	98	Nepublicată
	Isaria fumosorosea	AB023944	98	Nepublicată
	Paecilomyces marquandii MC-ARA-LD1	HQ263110	98	Nepublicată
L6/4	*Rhizopus stolonifer* var. *stolonifer* CBS 150.83	AB250176	99	Abe et al. 2006
	Rhizopus stolonifer ss8	JN974022	99	Nepublicată
	Rhizopus sexualis var. *americanus* CBS 340.62.	AB250169	99	Abe et al. 2006
	Rhizopus stolonifer SP-1	HM152768	99	Nepublicată
Hp1/4, Hp1/6, Pa7	*Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423	JQ698926	99	Kurtzman, Robnett 2013
	Yarrowia lipolytica MA09-W	GQ458023	99	Arteau, Labrie, Roy 2010
	Yarrowia lipolytica 7B3	EU434621	99	Nepublicată
	Yarrowia lipolytica M 18S	EF141323	99	Nepublicată
	Candida oslonensis CBS 10148	HM627143	99	Nepublicată
Hp3/9, Hp4/3,	*Cladosporium cladosporioides SPPRISTMF7*	JX982602	100	Nepublicată
	Cladosporium sp. A3-E	KF768876	99	Nepublicată

Tulpina fungică izolată	Specia fungică asociată	Numărul de acces	Similaritatea (%)	Referinţă bibliografică
Hp5/41, Hp6/1, Pa1	*Cladosporium sp. 3146-iG3*	KF769001	99	Nepublicată
	Cladosporium sp. HDJZ-ZWM-25	JF835997	99	Nepublicată
	Cladosporium sp. OUCMDZ-2046	KJ621682	99	Nepublicată
Hp2/2	*Zopfiella karachiensis* IFO 32902	AY999106	98	Nepublicată
	Chaetomium globosum C2F-4c-1	JX470335	98	Nepublicată
Hp3/3	*Dendryphion sp.* F9	JQ390144	98	Miller et al. 2012
	Dendryphion nanum ATTC 16226	AY382475	99	Inderbitzin et al. 2006
Hp3/5, Hp5/12	*Acremonium sp.* 11665 DLW-2010	GQ867783	98	Klinger et al. 2013
	Sarocladium strictum CBS 346.70	HQ232211	98	Summerbell et al. 2011
	Acremonium implicatum Trg-1	KC460207	98	Nepublicată
Hp3/13	*Mucor mucedo*	X89434	99	Nepublicată
	Mucor hiemalis 58	FJ590647	95	Molitor et al. 2009
	Mucor luteus WA0000009410	FJ605511	95	Budziszewska, Piatkowska, Wrzosek 2010
	Mucor parvisporus	KC977561	94	Nepublicată
Hp5/13	*Apiospora montagnei* PF17	FJ941864	99	Ding et al. 2011
	Arthrinium arundinis MUCL 14429	AB220229	99	Nepublicată
	Arthrinium sacchari ATCC 76289	AB220188	99	Nepublicată
Pa4	*Debaryomyces hansenii ZH12*	JQ838012	99	Nepublicată
	Debaryomyces hansenii NRRL Y-7426	JQ698910	99	Kurtzman, Robnett 2013
Pa8	*Trichothecium roseum*	JN176579	99	Nepublicată
	Trichothecium roseum	TRU69892	96	Seifert, Louis-Seize, Savard 1997

În rezultatul reconstituirii arborelui filogenetic în baza secvenței parțiale a genei ARNr 18S în microflora fungică a speciilor *Sitona lineatus, Hypera postica* și *Protapion apricans* au fost identificaţi 17 reprezentanţi din clasa Dothideomycetes, 3 din ordinul Dothideales (L2/6, L5/4 și Hp5/4), 5 din ordinul Capnodiales (Hp3/9, Hp4/3, Hp5/41, Hp6/1 și Pa1) și 9 din ordinul Pleosporales (L1/7, L2/2, L3/5, Hp3/2, Hp3/3, Hp3/4, Hp4/2, Hp5/5 și Hp6/3); 12 reprezentanți din clasa Sordariomycetes, 1 din ordinul Sordariales (Hp2/2), 1 din ordinul Xylariales (Hp5/13) și 10 din ordinul Hypocreales (L1/6, L1/8, B, N, L5/6, Hp3/5, Hp5/6, Hp5/7, Hp5/12 și Pa8); 5 reprezentanți din clasa Eurotiomycetes, ordinul Eurotiales, (L1/4, L2/5, C, Pa2 și Pa3), 4 reprezentanți din clasa Saccharomycetes, ordinul Saccharomycetales (Hp1/4, Hp1/6, Pa4 și Pa7), doi reprezentanți din ordinul Mucorales (L6/4 și Hp/13) și câte 1 reprezentant din ordinele Sporidiobolales (L2/1) și Tremellales (L1/5) (figura 3.1).

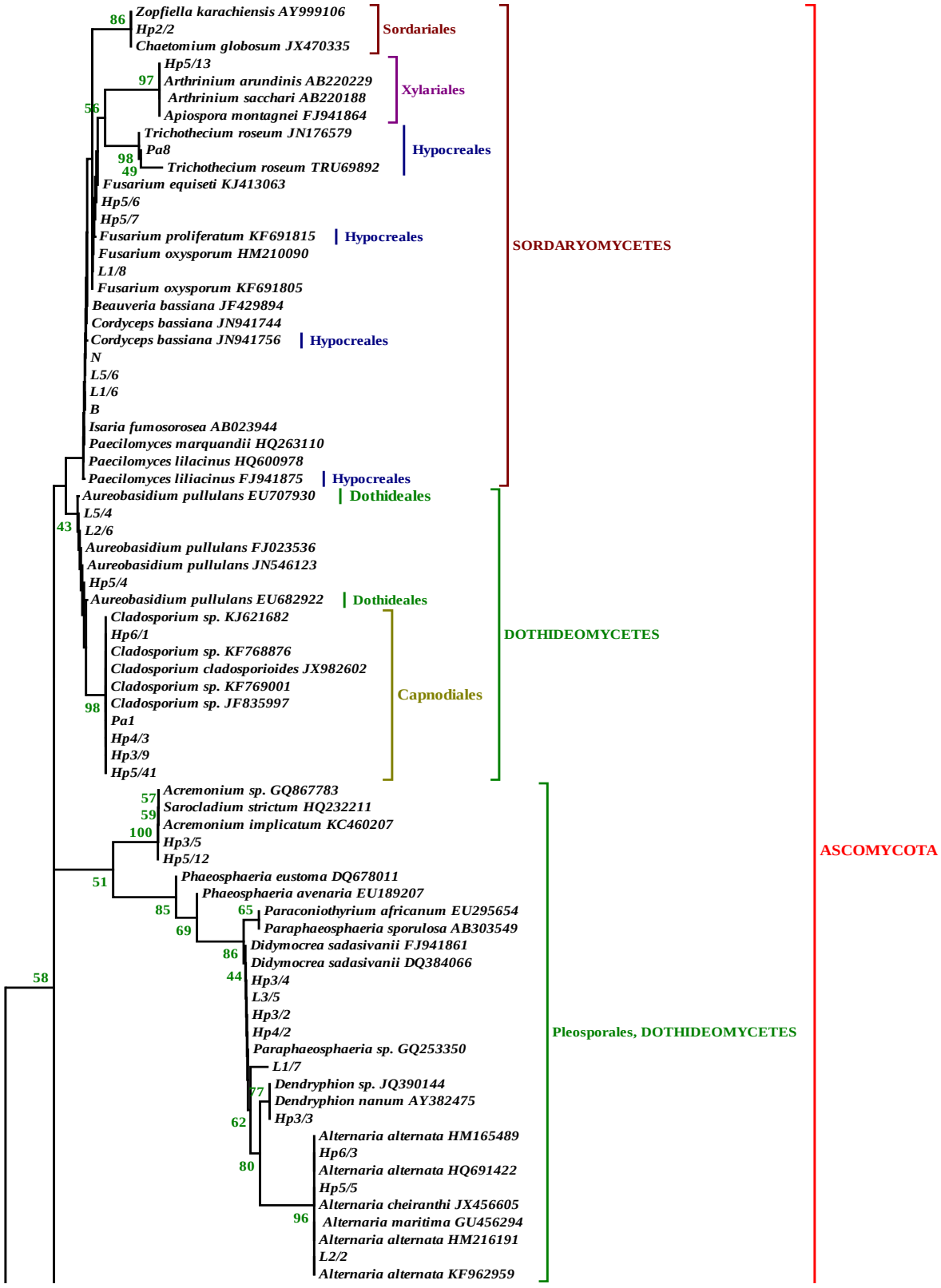


Fig. 3.1. Arborele filogenetic al tulpinilor fungice, reconstituit în baza secvenţei parţiale a genei ARNr 18S (orig.)

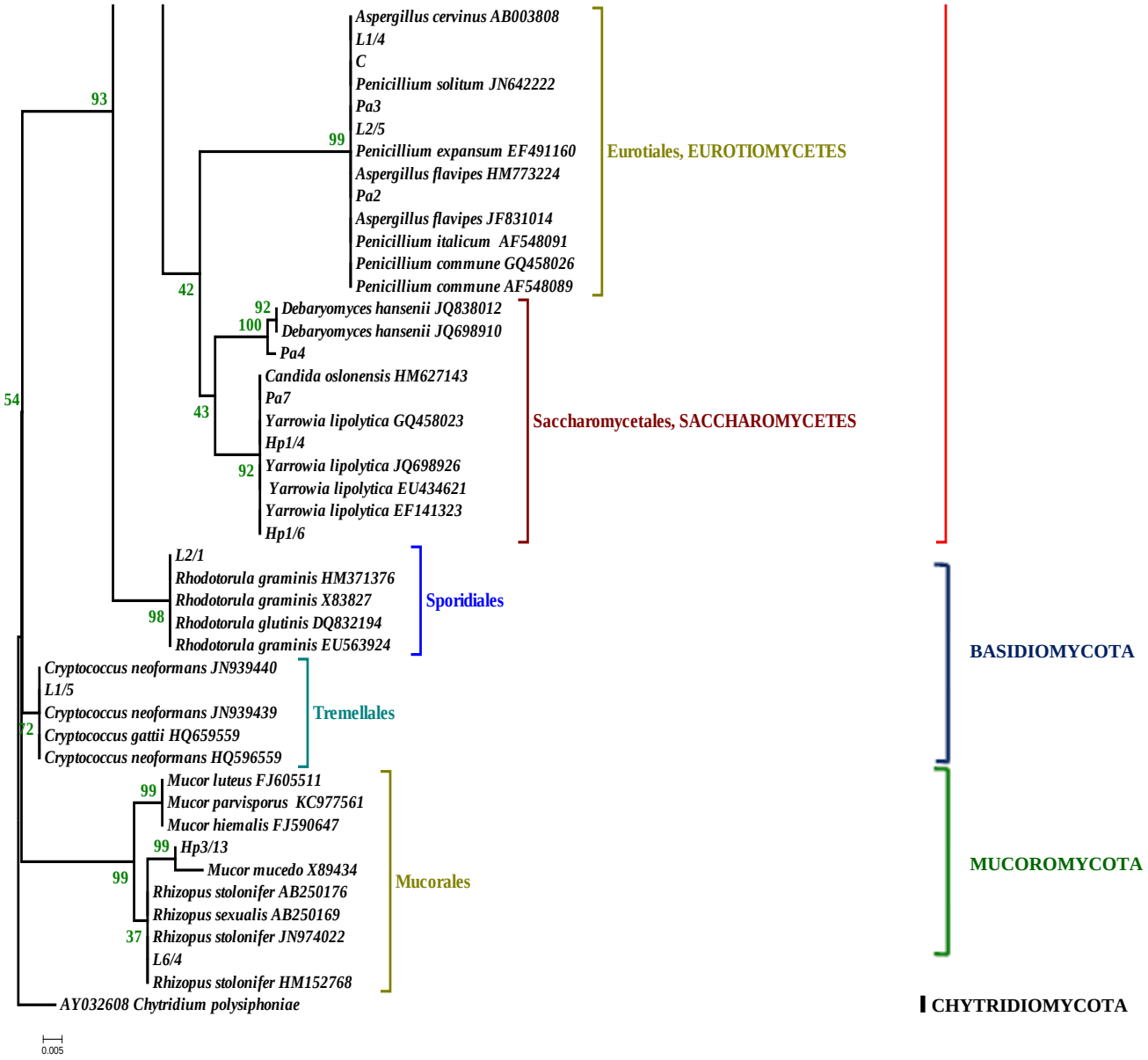


Fig. 3.1. ***(continuare)*** **Arborele filogenetic al tulpinilor fungice, reconstituit în baza secvenţei parţiale a genei *ARN*r 18S (orig.)**

Identificarea microflorei fungice în baza succesiunii nucleotidice a regiunii ITS. În rezultatul analizei filogenetice în baza succesiunii nucleotidice a regiunii ITS 16 tulpini fungice izolate din corpul insectei *Sitona lineatus* au fost identificate ca: *Aspergillus flavipes* (L1/4), *Papiliotrema laurentii* (L1/5), *Beauveria bassiana* (L1/6, B și N), *Torula sp.* (L1/7), *Fusarium equiseti* (L1/8), *Rhodotorula graminis* (L2/1), *Alternaria alternata* (L2/2), *Penicillium polonicum* (L2/5), *Penicillium brevicompactum* (C), *Torula caligans* (L3/5), *Aureobasidium pullulans* (L2/6 și L5/4), *Isaria fumosorosea* (L5/6), *Rhizopus stolonifer* (L6/4).

Tulpinile fungice (20) izolate din corpul dăunătorului *Hypera postica* au fost identificate ca *Yarrowia deformans* (*Candida deformans*) (Hp1/4 și Hp1/6), *[Phialophora] cyclaminis* (Hp2/2), *Torula caligans* (Hp3/2 și Hp4/2), *Torula sp.* (Hp3/4), *Dendryphion nanum* (Hp3/3), *Sarocladium strictum* (Hp3/5 și Hp5/12), *Cladosporium cladosporioides sensu lato* (Hp3/9, Hp4/3, Hp5/41 și Hp 6/1), *Mucor racemosus* (Hp3/13), *Aureobasidium pullulans* (Hp5/4), *Alternaria alternata* (Hp5/5 și Hp6/3), *Fusarium oxysporum* (Hp5/6), *Fusarium tricinctum* (Hp5/7) și *Apiospora montagnei* (Hp5/13).

Cele 6 tulpini fungice izolate din corpul insectei *Protapion apricans* au fost identificate ca *Cladosporium cladosporioides* (Pa1), *Penicillium polonicum* (Pa2 și Pa3), *Debaryomyces hansenii* (Pa4), *Yarrowia deformans* (*Candida deformans*) (Pa7) și *Trichothecium roseum* (Pa8).

Datele privind analiza BLAST a succesiunilor nucleotidice și speciile de ciuperci asociate tulpinilor izolate sunt prezentate în tabelul 3.2. Majoritatea tulpinilor fungice analizate sunt însoțite de referințe bibliografice. Datele referitoare la unele tulpini nu au fost publicate.

Tabelul 3.2. Rezultatele analizei BLAST a succesiunilor nucleotidice pentru porțiunea de genă ITS (Internal Transcribed Spacer)

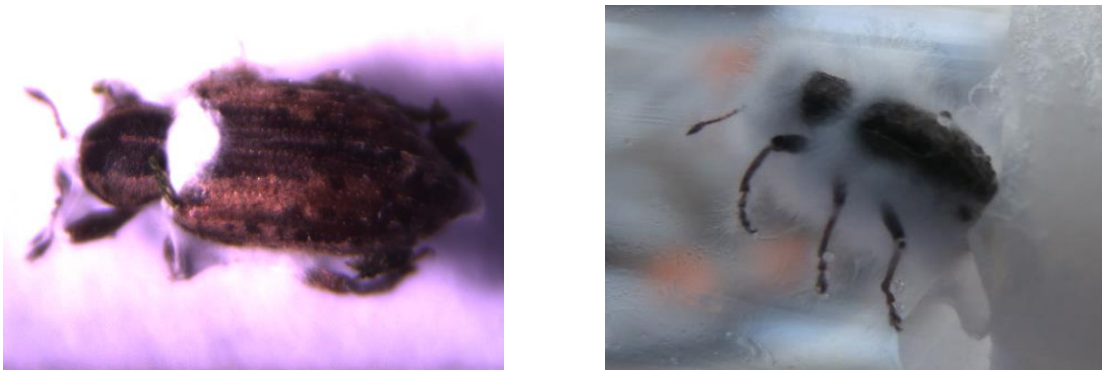
Tulpina fungică izolată	Specia fungică asociată	Numărul de acces	Similaritatea (%)	Referinţă bibliografică
L1/4	*Aspergillus flavipes* A13	JN246076	97	Daynes et al. 2012
	Aspergillus flavipes E14	GU566238	97	Bukovska et al. 2010
	Aspergillus flavipes BH	GU566209	96	Bukovska et al. 2010
	Aspergillus flavipes M1	HM595494	95	Yuan et al. 2011
	Aspergillus flavipes ATCC 1030	AY373849	94	Haugland et al. 2004
L1/5	*Papiliotrema laurentii* bca-415	MN128857	99	Nepublicată
	Papiliotrema laurentii R97200	MK268130	99	Nepublicată
	Vishniacozyma tephrensis	MN128859	97	Nepublicată
	Cryptococcus tephrensis	JX188134	97	Bourret et al. 2013
	Cryptococcus tephrensis DBVPG	GQ911538	96	Branda et al. 2010
L1/6, B, N	*Beauveria bassiana* 2594	GU373829	99	Nepublicată
	Cordyceps bassiana BCMU BB01	AB079609	99	Yokoyama, Yamagishi, Hara 2002
	Beauveria bassiana SASRI C2	JX110371	99	Goble et al. 2012

Tulpina fungică izolată	Specia fungică asociată	Numărul de acces	Similaritatea (%)	Referinţă bibliografică
	Beauveria bassiana 2773	KC753391	99	Landa et al. 2013
	Beauveria bassiana KTU-25	FJ177441	99	Sevim et al. 2010
	Beauveria bassiana KTU-11	FJ177436	99	Sevim et al. 2010
	Beauveria bassiana KVL 04-93	GU354338	99	Meyling, Schmidt, Eilenberg 2012
L3/5, Hp3/2, Hp4/2	*Torula caligans* CZ16	JN104523	98	Ferrari, Zhang, van Dorst 2011
	Torula caligans xsd08057	FJ478093	98	Nepublicată
	Torula caligans MMI00054	JQ246356	98	Nepublicată
L1/7, Hp3/4,	*Torula herbarum CBS 246.57*	KF443411	98	Ahmed et al. 2014
	Torula herbarum	LT963446	98	Nepublicată
	Torula herbarum	KT315411	96	Nepublicată
	Torula pluriseptata	MH010646	98	Nepublicată
	Torula pluriseptata	MN061338	98	Nepublicată
L1/8	*Fusarium equiseti GGF2*	HM008677	99	Nepublicată
	Fusarium equiseti isolate r234	HQ649906	99	Macia-Vicente et al. 2012
C	*Penicillium brevicompactum NRRL 35184*	DQ123641	99	Vega et al. 2006
	P.brevicompactum AS3.15323	KC427185	100	Wang, Wang 2013
	P. brevicompactum KUC1628-1	HM469408	100	Jang et al. 2011
L2/1	*Rhodotorula graminis* WP1	EU563927	99	Xin, Glawe, Doty 2009
	Rhodotorula graminis	FR717631	99	Yurkov et al. 2012
	Rhodotorula graminis	AF387779	99	Gadanho, Sampaio 2002
L2/2, Hp5/5, Hp6/3	*Alternaria alternata*	AY433814	99	Nepublicată
	Alternaria alternata GL22	GQ169728	99	Nepublicată
	Alternaria alternata IEIHBT	GQ121322	99	Shanmugam, Dhyani, Ananthapadmanaban 2011
L2/5, Pa2, Pa3	*Penicillium polonicum* C6	GU566221	100	Bukovska et al. 2010
	Penicillium polonicum IBT 11388	AJ005492	100	Skouboe et al. 1999
	Penicillium polonicum 4.2	EU888924	99	Nepublicată
L2/6, L5/4, Hp5/4	*Aureobasidium pullulans* wb149	AF455533	99	Buzina et al. 2003
	Aureobasidium pullulans C202	AM076661	99	Renker et al. 2006
	Aureobasidium pullulans F42	JF439463	99	Han et al. 2011
	Aureobasidium pullulans	AJ876481	99	Renker et al. 2005
	Aureobasidium pullulans	EF690466	99	Nepublicată
L5/6	*Isaria fumosorosea* CG 684	EU553335	96	Inglis, Tigano 2006
	Isaria fumosorosea FI 1217	EU553294	96	Inglis, Tigano 2006
	Paecilomyces fumosoroseus ARSEF3590	DQ069285	96	Kalkar et al. 2006
L6/4	*Rhizopus stolonifer*	FN401528	99	Gherbawy, Hussein 2010
	Rhizopus stolonifer	AM933543	99	Gherbawy, Hussein 2010
	Rhizopus stolonifer	AY625075	99	Meklin et al. 2004
	Rhizopus stolonifer ATCC 14037	AF117935	96	Choi, Westerman, Morrison 1998
	Rhizopus stolonifer	MF461022	96	Nepublicată
Hp1/4, Hp1/6,	*Candida deformans*	AM279256	97	Knutsen 2007
	Candida deformans	KU052793	96	Nepublicată

Tulpina fungică izolată	Specia fungică asociată	Numărul de acces	Similaritatea (%)	Referinţă bibliografică
Pa7	*Yarrowia deformans*	KY105963	95	Vu et al. 2016
	Yarrowia deformans	NR161005	94	Vu et al. 2016
Hp2/2	*[Phialophora] cyclaminis*	AB190390	99	Nepublicată
	[Phialophora] cyclaminis	HQ713776	99	Nepublicată
	[Phialophora] cyclaminis	LC062621	99	Nepublicată
	[Phialophora] cyclaminis	NR 145368	99	Nepublicată
Hp3/3	*Dendryphion nanum*	AY387657	100	Inderbitzin et al. 2006
	Dendryphion nanum 29_83F	KC989061	99	Nepublicată
Hp3/5, Hp5/12	*Acremonium strictum*	AM161121	99	Molnar, Wuczkowski, Prillinger 2008
	Sarocladium strictum 8174	JX982442	100	Garcia et al. 2013
	Sarocladium strictum NRRL 46128	GU219468	99	Wicklow, Poling, Summerbell 2008
	Sarocladium strictum	MH864442	99	Vu et al. 2019
	Sarocladium strictum	KJ702043	99	Linnakoski et al. 2018
	Sarocladium strictum	AY138845	99	Novicki et al. 2003
	Sarocladium strictum	HM216211	99	Santelli et al. 2010
Hp3/9, Hp4/3, Hp5/41, Hp6/1 Pa1	*Cladosporium cladosporioides CPC 12764*	HM148031	99	Bensch et al. 2010
	C. cladosporioides A07I	JQ781718	99	Trovao et al. 2013
	C. cladosporioides KUC1701	JN033471	99	Lee et al. 2012
	C. cf. cladosporioides 1 JZG-2010 CPC 14238	HM148055	99	Bensch et al. 2010
	C. tenuissimum A84B	JQ781836	99	Trovao et al. 2013
	C. perangustum CPC 18229	JF499836	99	Crous, Groenewald 2011
	C. cladosporioides 2728	EU272532	99	Nepublicată
	Cladosporium pseudocladosporioides strain CPC 14382	JF499836	99	Crous, Groenewald 2011
	C.perangustum CPC 13730	HM148140	91	Bensch et al. 2010
Hp3/13	*Mucor racemosus*	HM776428	99	Nepublicată
	Mucor racemosus ATCC 42647	JF440624	99	Nepublicată
	Mucor racemosus	FJ345353	99	Khot, Ko, Fredricks 2009
	Mucor racemosus CBS 260	AY213659	99	Rakeman et al. 2005
Hp5/6	*Fusarium oxysporum*	AY147369	99	Mishra, Fox, Culham 2003
	Fusarium oxysporum REF213	JN859433	99	Knapp, Pintye, Kovacs 2012
	Fusarium oxysporum	AB685181	99	Inokoshi et al. 2013
	Fusarium oxysporum, FuO139	KC196121	99	Lops et al. 2013
Hp5/7	*Fusarium tricinctum*	DQ132835	99	Vujanovic et al. 2007
	Fusarium tricinctum 124	KC989063	99	Nepublicată
Hp5/13	*Apiospora montagnei* ToD.7.1	FJ824610	99	Persson et al. 2009
	Arthrinium arundinis CBS:124788	KF144885	99	Crous, Groenewald 2013
	Arthrinium arundinis G41	GU566268	99	Bukovska et al. 2010
	Arthrinium arundinis KUC4003	HM008923	99	Kim et al. 2011a
Pa4	*Debaryomyces hansenii var. fabryi CBS789*	AF210326	99	Petersen, Moller, Jespersen 2001
	Debaryomyces hansenii ATCC 60978	GQ458041	99	Arteau, Labrie, Roy 2010
Pa8	*Trichothecium roseum LCP 47.624*	JQ434579	99	Ropars et al. 2012
	Trichothecium roseum E04 18S	HQ115655	99	Gorfer et al. 2011

3.2 Identificarea tulpinilor fungice în baza caracterelor morfologice

În rezultatul izolării tulpinilor fungice din corpul insectelor cu semne vizibile de micoză au fost evidențiate 12 tulpini fungice morfologic similare cu *Beauveria* spp. și o tulpină similară cu *Isaria* sp. (figura 3.2, 3.3).



a **b**

Fig. 3.2. Exemplare de insecte cu semne de micoză (orig.)
a – *H. postica*, **b -** *S. lineatus*

Ulterior tulpinile fungice izolate au fost reinoculate în cultură pură, și au fost identificate folosind chei dihotomice de determinare ca *Beauveria* spp și *Isaria* sp.



a **b**

Fig. 3.3. Tulpini fungice izolate din corpul insectelor din speciile *Sitona lineatus* și *Hypera postica.*
a – tulpina Cg13**, b -** Hp5Cg (orig.)

Următoarele caracteristici morfologice au fost folosite pentru identificare (Humber 2012):

1. sporii, hifele și alte structuri fungice sunt vizibile la suprafața insectei gazdă, (2)
2. pe suprafața corpului insectei gazdă se observă structuri lungi macroscopice, (3)

3. pe miceliul aerian dezvoltat la suprafața corpului insectei gazdă se formează conidii, (4)

4. Conidiile se formează în lanțuri scurte sau lungi, (5)

4a. Conidiile sunt produse câte una, pe denticule separate, aparte pe fiecare celulă condiogenă, sau produse pe multe denticule separate pe fiecare celulă conidiogenă sau, în grupuri mici, (7)

5. celulele conidiogene au baza umflată și gâtul lung, se formează câte una sau în grupuri, lanțurile de conidii deseori sunt lungi și divergente (atunci când se formează pe grupuri de celule conidiogene) *Paecilomyces (Isaria)*

7a. celulele conidiogene produc câteva sau mai multe conidii, fiecare formată pe denticule separate, (8)

8. celulele conidiogene au un apex denticulat extins, (apexul în creștere, formează în mod repetat conidii și se ramifică, sau crește la baza conidiei nou formate) *Beauveria*

Pentru comparație au fost utilizate tulpinile de *Brauveria bassiana* L1/6, B și N, și *Isaria fumosorosea* L5/6 identificate anterior folosind metodele molecular-genetice.

Șapte dintre tulpini au fost izolate din corpul insectelor din specia *S. lineatus*, iar șase din corpul insectelor din specia *H. postica* (tabelul 3.3). Cercetările ulterioare vor viza virulența acestor tulpini. Acele tulpini care vor prezenta activitate insecticidă promițătoare pentru a fi aplicate în calitate de agenți de control biologic vor fi identificate la nivel de specie cu utilizarea metodelor molecular-genetice.

Tabelul 3.3. Tulpinile de fungi izolate direct de pe insecte cu semne vizibile de infecție fungică

Nr. d/o	**Insecta gazdă**	**Tulpina fungică**	**Identificare morfologică**
1	*Sitona lineatus*	Cg1	*Beauveria* spp.
2		Cg6	
3		Cg7	
4		Cg10	
5		Cg11	
6		Cg12	
7		Cg13	
8	*Hypera postica*	Hp1Cg	
9		Hp2Cg	
10		Hp3Cg	
11		Hp4Cg	
12		Hp8Cg	
13		Hp5Cg	*Isaria* sp.

3.3 Poziția taxonomică și importanța practică a tulpinilor fungice identificate

În rezultatul cercetărilor efectuate cu utilizarea metodelor clasice și molecular-genetice în microflora fungică a speciilor *Sitona lineatus*, *Hypera postica* și *Protapion apricans* au fost descrise 55 tulpini fungice aparținând la 23 specii din 19 genuri.

În microflora fungică a speciei *Hypera postica* au fost evidențiate cel puțin 16 specii fungice aparținând la 14 genuri, în microflora dăunătorului *Sitona lineatus* au fost evidențiate cel puțin 12 specii fungice aparținând la 11 genuri. În microflora fungică a dăunătorului *P. apricans* au fost identificate 5 specii fungice din 5 genuri (figura 3.4).

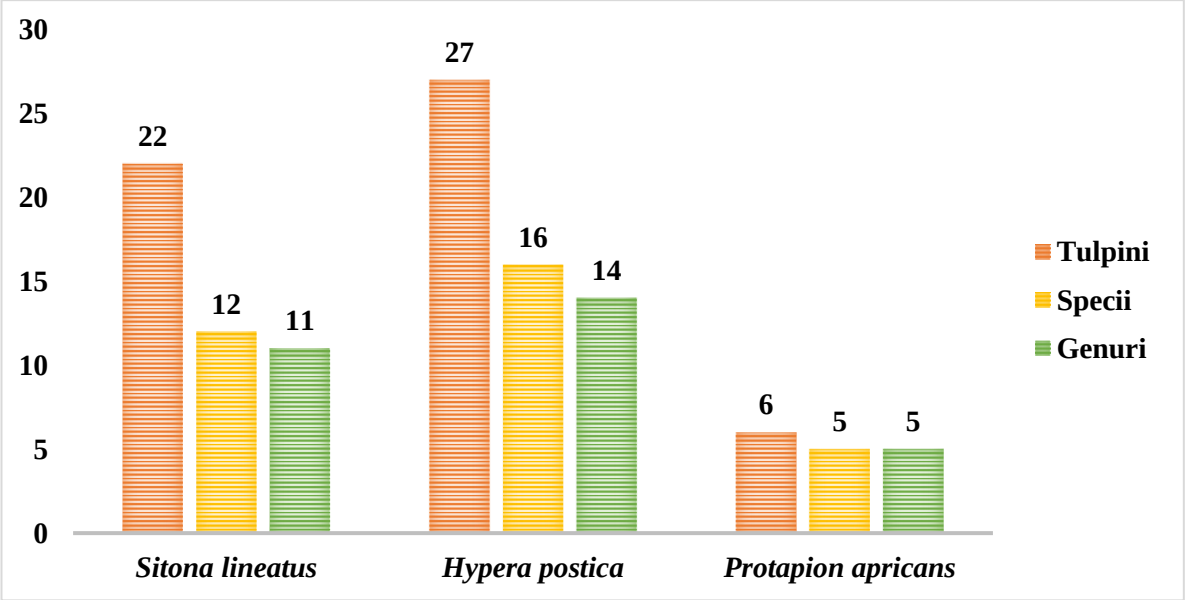


Fig. 3.4. Numărul de tulpini, specii și genuri de fungi identificate în microflora fungică a dăunătorilor

Din speciile fungice evidențiate 19 specii aparțin încrengăturii Ascomycota, și câte 2 specii aparțin încrengăturii Basidiomycota şi Mucormycota.

Clasa Sordariomycetes este cea mai diversă după numărul de specii identificate (9 specii) fiind urmată de Clasa Dothideomycetes (5 specii), Clasa Eurotiomycetes (3 specii), Clasa Saccharomycetes și Mucormycetes, câte 2 specii, iar din Clasele Tremellomycetes și Microbotryomycetes câte 1 specie (figura 3.5).

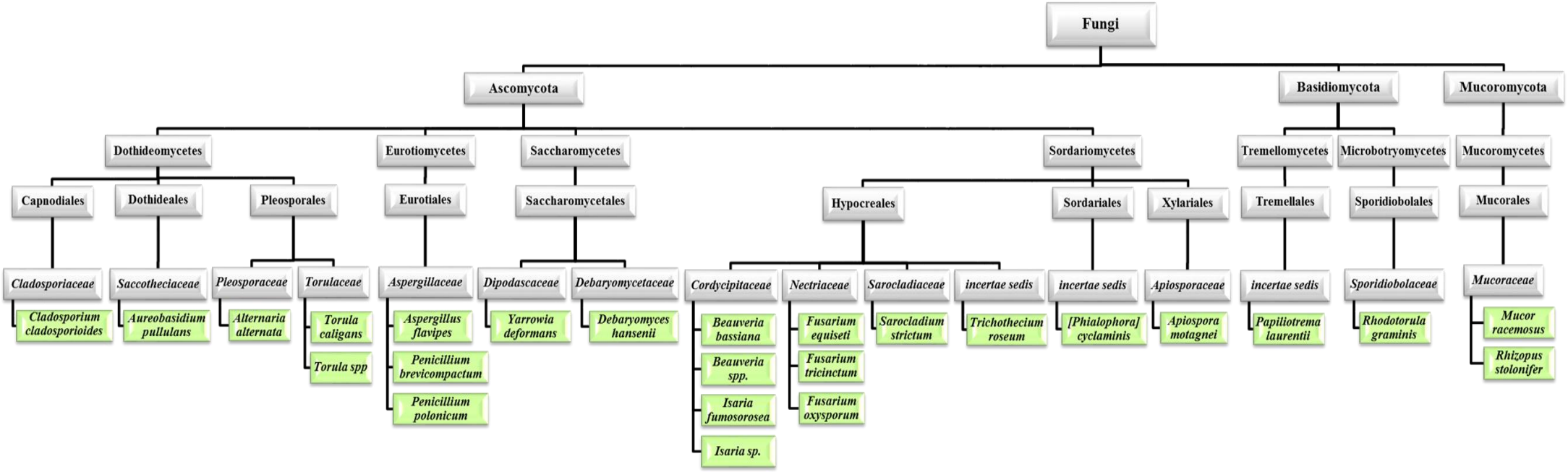


Fig. 3.5. Diversitatea speciilor fungice identificate în microflora coleopterelor curculionoide investigate

Dintre speciile de micromicete evidențiate, cel puțin 8 specii din 7 genuri au avut câte 2 insecte gazdă. Speciile *Torula caligans* și *Torula sp.*, *Aureobasidium pullulans*, *Alternaria alternata și Beauveria sp.* au fost evidențiate în microflora dăunătorilor *S. lineatus* și *H. postica*. Cât privește specia *Penicillium polonicum*, aceasta a fost evidențiată în microflora speciilor *S. lineatus* și *P. apricans*, iar *Cladosporium cladosporioides* și *Candida deformans* au fost comune pentru alte 2 specii de curculionoide, *H. postica* și *P. apricans.* Nici una dintre speciile identificate nu a fost comună pentru toate cele 3 specii de insecte investigate (figura 3.6).

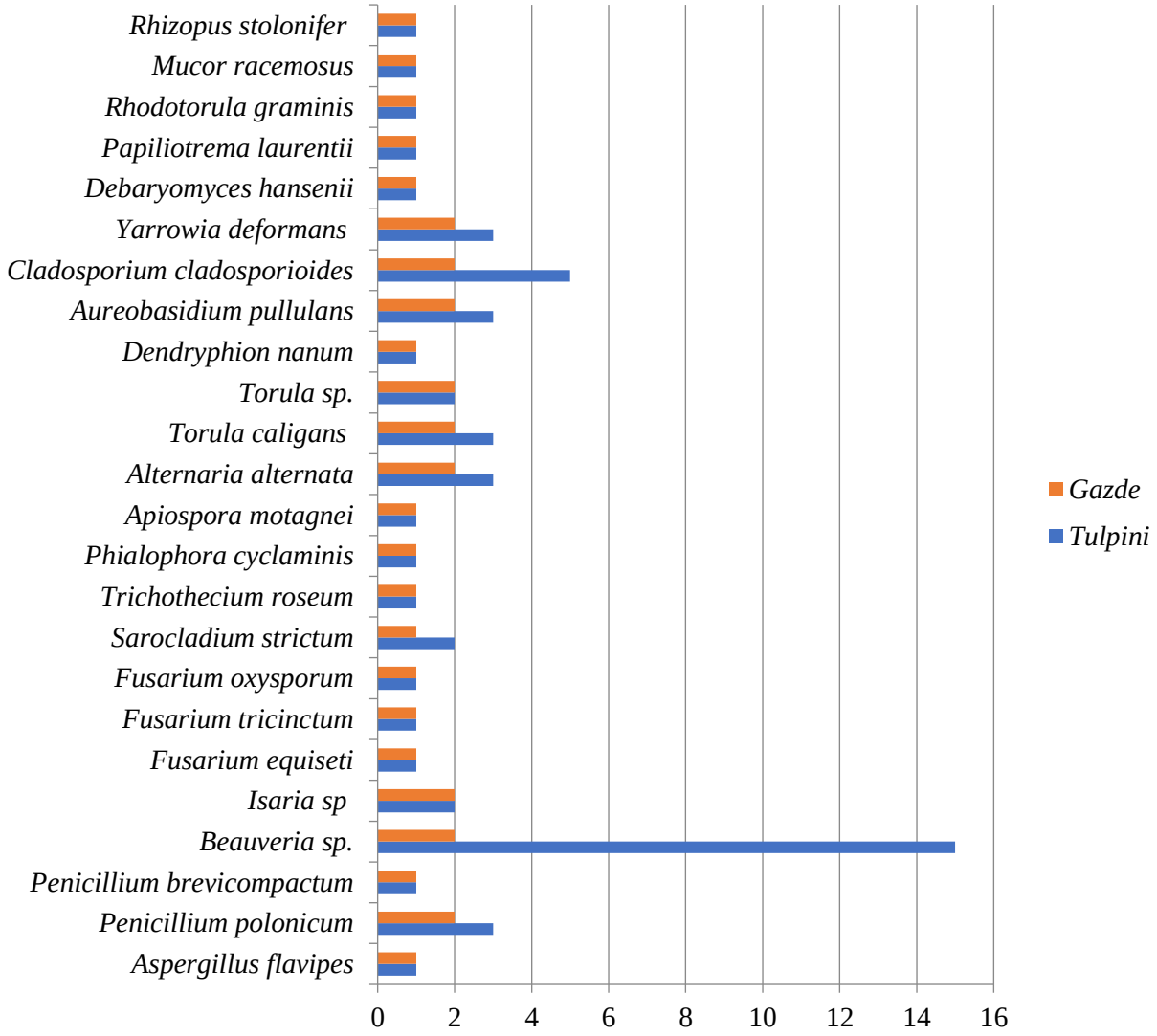


Fig. 3.6. Repartizarea tulpinilor fungice izolate conform speciilor și numărului de gazde

Pentru fiecare tulpină de fungi semnalată în microflora insectelor investigate a fost elaborată fișa conținând arborele filogenetic reconstituit în baza regiunii barcod ITS, descrierea morfologică și importanța economică. Informațiile pentru complexul de fungi evidențiat sunt prezentate mai jos:

Încrengătura ASCOMYCOTA,

Clasa Dothideomycetes, Ordinul Capnodiales, Familia *Cladosporiaceae*,

Genul *Cladosporium* Link, 1816, *C. cladosporioides* (Fresen.) G.A. de Vries, 1952

Tulpinile Hp3/9, Hp4/3, Hp5/41, Hp6/1, izolate din corpul dăunătorului *H. postica*, și Pa1, izolată din corpul speciei *P. apricans*, aparțin complexului *Cladosporium cladosporioides sensu lato*, în rezultatul reconstituirii arborelui filogenetic, obținând-se o valoare bootstrap de 99% (figura 3.7 a).

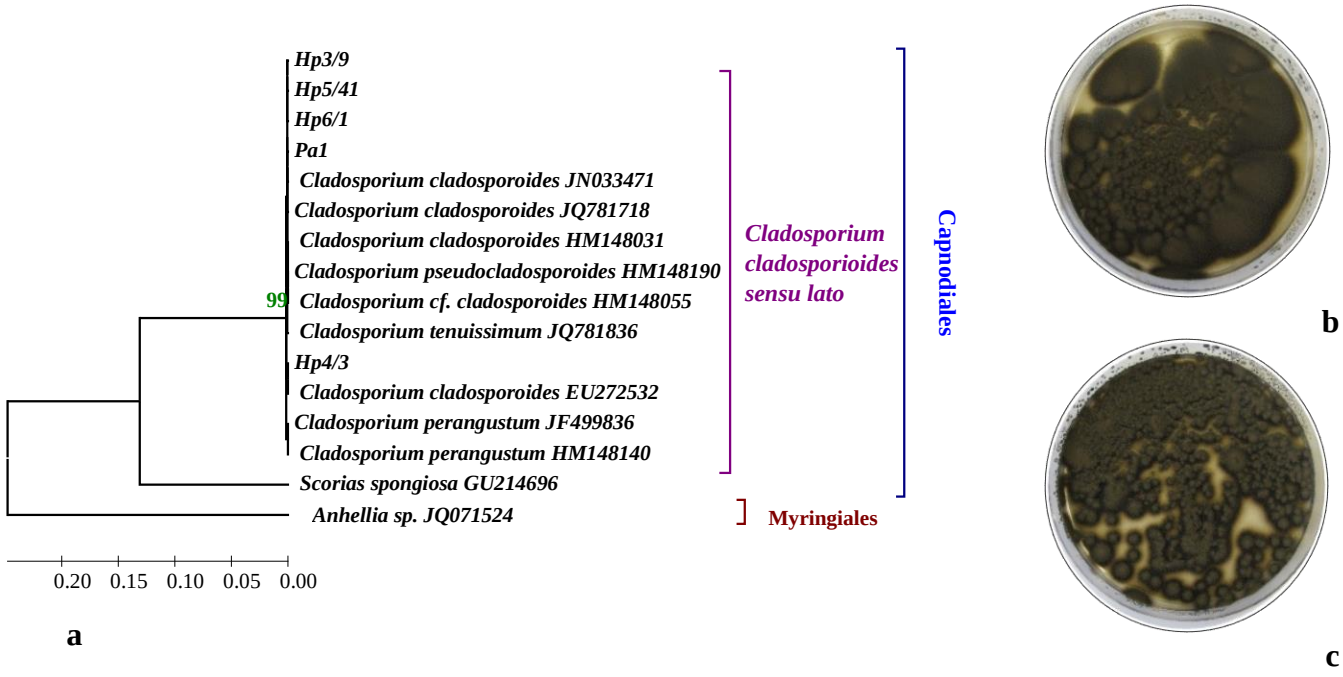


Fig. 3.7. Relațiile filogenetice și aspectul morfologic (orig.) ale tulpinilor Hp3/9, Hp4/3, Hp5/41, Hp6/1 și Pa1 (*Cladosporium cladosporioides sensu lato*)
a – arborele filogenetic reconstruit, **b –** tulpina Pa1, **c** – tulpina Hp3/9

Particularități morfologice: Specia produce colonii de culoare sur-verde, olivacee-maro sau maro-negre, și au conidii închis-pigmentate. Coloniile pot atinge dimensiunile între 2,5-5,5 cm în diametru. Hifele sunt septate, hialine până la gri-verzi în lumină, netezi, de circa 3,1-5,0 µm. Conidiile formează lanțuri dens aglomerate, abundent ramificate, alungite, elipsoide sau fusiforme, cu capete trunchiate (figura 3.7 b) (Bensch et al. 2012).

Importanţa practică: Cele mai multe specii de *Cladosporium* se dezvoltă pe materie vegetală moartă. Unele specii sunt patogene pentru plante, altele parazitează alte ciuperci (Torres et al 2017). *Cladosporium cladosporioides* apare de obicei pe plantele erbacee și lemnoase . Este o componentă stabilă a microflorei părților subterane și aeriene ale plantelor. De asemenea, este o micromicetă de sol larg răspândită. Sporii se dispersează ușor cu ajutorul vântului abundenți în aerul liber (Domsch, Gams, Anderson 2007). Tulpinile de *C. cladosporioides* sunt producătoare

de substanțe biologic active și enzime care pot fi valorificate în scopuri medicale și industriale (AlMatar, Makky 2016).

Ordinul Dothideales, **Familia *Saccotheciaceae,***

Genul *Aureobasidium* Viala & G. Boyer, 1891, *A. pullulans* (de Bary) G. Arnaud, 1918

Reconstituirea arborelui filogenetic a tulpinilor L2/6, L5/4 izolate din corpul *S. lineatus* și Hp5/4, izolată din corpul *H. postica* a permis identificarea acestora ca *Aureobasidium pullulans* cu o valoare bootstrap de 99% (figura 3.8 a).

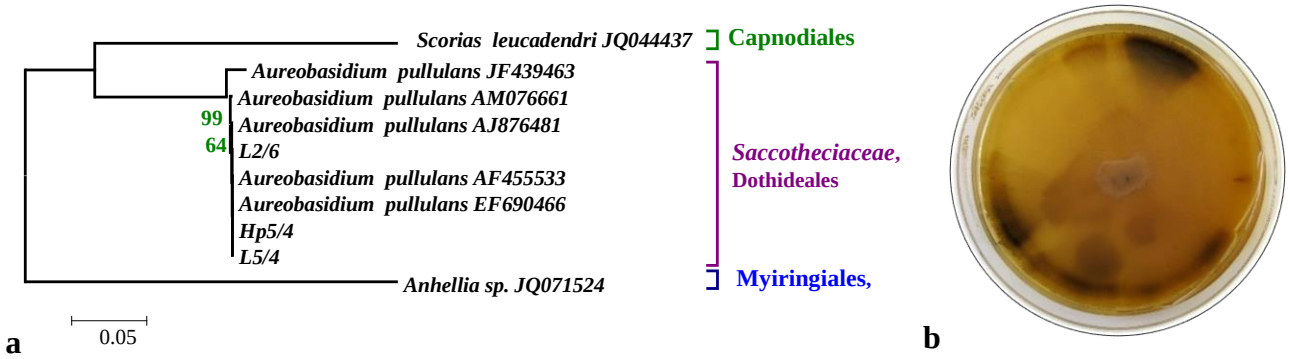


Fig. 3.8. Arborele filogenetic reconstruit (a) și aspectul morfologic (b) ale tulpinilor L2/6, L5/4 și Hp5/4 (*A. pullulans*) (orig.)

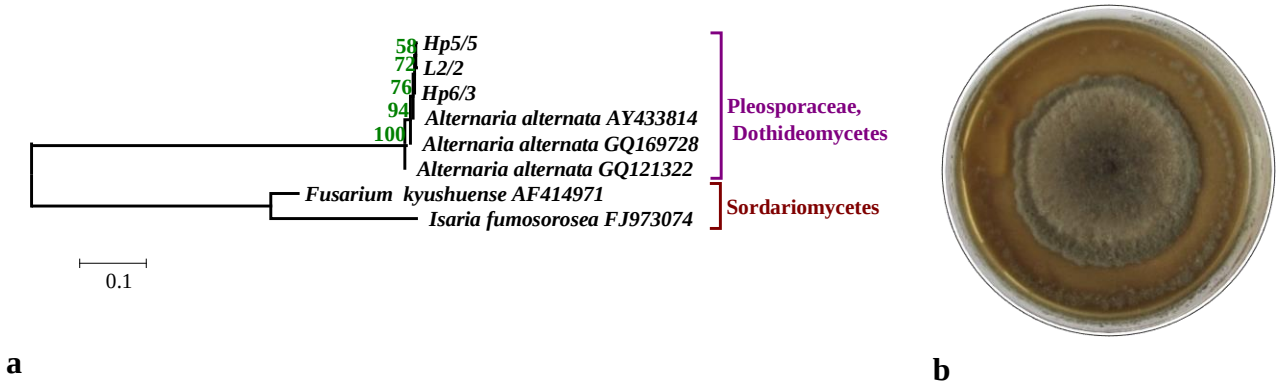
Particularităţi morfologice: este o specie ubicvistă, răspândită în mediile tropicale și temperate, în filosferă, pe hrană și furaje (Samson, Hoekstra, Frisvad 2004) fiind întâlnită de asemenea în apele hiper-saline. Coloniile sunt inițial netede și în cele din urmă devin zbârcite (figura 3.8 b). Inițial culoarea coloniilor este crem, roz sau maro deschis, iar în final ele devin negricioase din cauza producției de melanina la etapa de formare a clamidosporilor. Hifele au aspect neted cu pereți subțiri cu diametru 2 - 16 µm, formează un miceliu dur și compact (Gaur et al. 2010).

Importanţa practică: specia *Aureobasidium pullulans* este răspândită în majoritatea habitatelor filosferice (Gostincar et al. 2014). *A. pullulans* este o micromicetă asemănătoare drojdiilor, izolată frecvent din filosfera și carposfera culturilor de fructe și legume (Barata, Malfeito-Ferreira, Loureiro 2012). Tulpinile de *A. pullulans* sunt asociate comunităților de endofiți ai plantelor și manifestă efect antagonist împotriva speciilor fitopatogene (Mounir et al. 2007, de Curtis et al. 2012, Bozoudi, Tsaltas 2018). *A. pullulans* produce o varietate de metaboliți importanți, enzime, antibiotice, proteine şi polizaharide (Chi et al. 2009, Bozoudi, Tsaltas 2018). Micromiceta poate fi utilizată în monitorizarea poluării mediului.

Ordinul Pleosporales, Familia *Pleosporaceae*,

Genul *Alternaria* Nees, 1817, *A. alternata* (Fr.) Keissl. 1912

În rezultatul reconstituirii arborelui filogenetic tulpina fungică L2/2, izolată din corpul dăunătorului *S. lineatus*, și tulpinile Hp5/5 și Hp6/3 izolate din corpul insectei *H. postica* au fost identificate ca *Alternaria alternata* cu o similaritate de 100 % (figura 3.9 a).



a b

Fig. 3.9. Arborele filogenetic reconstruit (a) și aspectul morfologic (b) ale tulpinilor L2/2, Hp5/5 și Hp6/3 (*Alternaria alternata*) (orig.)

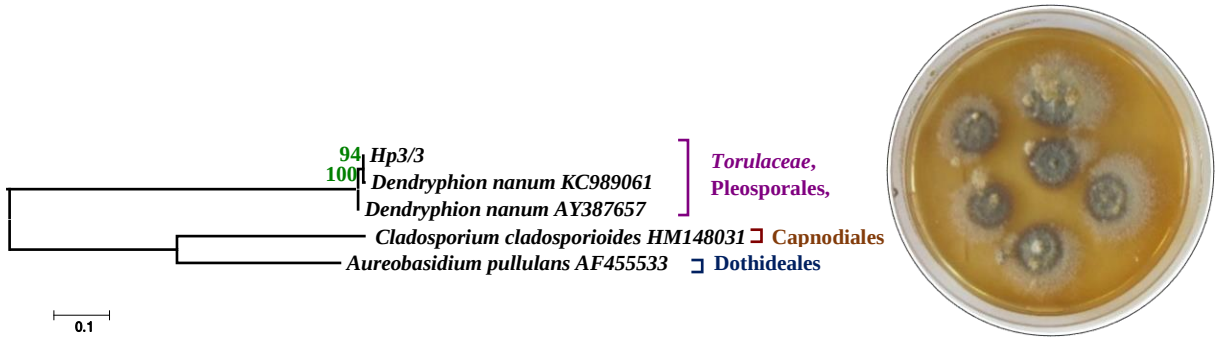
Particularităţi morfologice: Colonii extinse, gri până la olivacee, sub formă de pulbere sau lânoase. Conidioforii neramificați, până la 50 µm lungime, 3-6 µm lățime. Lanț conidian abundent ramificat. Conidiile obclavate până la elipsoidale, maro (de Hoog 2000) (figura 3.9 b).

Importanța speciei: *Alternaria alternata* provoacă pătarea și alte boli ablative la peste 380 de specii de plante gazdă. Este un agent patogen oportunist cu privire la numărul de gazde. Din produsele metabolice ale speciei investigate, acidul tenuazonic are acțiune larvicidă contra *Lucilia sericata*, tentoxin provoacă cloroza la castraveți și multe alte plante dicotiledonate prin inhibarea fosforilării, altenuisol, altenusin și dehidroaltenusin au activitate antifungică. Cerealele infectate sever sunt toxice pentru animalele homeoterme. Au fost raportate cazuri de leucopenie la om (Domsch, Gams, Anderson 2007). Au fost de asemenea, semnalate cazuri de infecții ale tractului respirator superior și astm cauzate de această specie la persoanele cu imunitate compromisă (Wiest et al. 1987). Iepurii și cobaii ca răspuns la inoculare au produs anticorpi și au prezentat leziuni cutanate. Extractele de miceliu s-au dovedit toxice pentru *Paramecium caudatum*, embrionii de pui și șobolani, și au cauzat leziuni ale mucoaselor la cai (Domsch, Gams, Anderson 2007). Conform datelor recente, o tulpină de *A. alternata* a prezentat activitate patogenă contra afidelor (Christias et al. 2000).

Familia *Torulaceae,*

Genul *Dendryphion* Wallr., 1833, *D. nanum,* (Nees) S. Hughes, 1958

Tulpina Hp3/3 izolată din corpul speciei *H. postica* a fost identificată ca *Dendryphion nanum* cu o valoare bootstrap de 100 % (figura 3.10 a).



a **b**

Fig. 3.10. Arborele filogenetic reconstruit (a) și aspectul morfologic (b) ale tulpinii Hp3/3 (*Dendryphion nanum*) (orig.)

Particularităţi morfologice: Specia formează colonii efuze, albe, gri pal, negre, cu aspect lânos, sporulație rară (figura 3.10 b). Conidioforii maro întunecați, netezi până la slab rugoși, 0-5-septați, cilindrici, 19,0 – 136,0 × 6,0-8,8 µm. Miceliul scufundat, compus din hife septate, subhialine până la maro, de 1,5-4 µm. Conidioforii erecți, individuali sau în grupuri de până la 4. Conidiile sunt obclavate sau strict elipsoidale sau subcilindrice, maro cu excepția celulelor terminale care sunt aproape incolore până la maro deschis ablativ (Hughes, Cooke 1979).

Importanța speciei: Specia a fost izolată din tulpini sau rădăcini de *Avena sativa*, câmpurile de varză, *Melilotus*, porumb, trifoi roșu și din sol. Studiile recente au identificat o tulpină de *Dendryphion nanum*, izolată din frunze de smochin religios, din Mumbai, producătoare de naftochinone cu activitate anti-inflamatorie și anti-diabetică (Mishra, Fox, Culham 2003).

Genul *Torula* Pers., 1794

În microflora fungică a speciilor *S. lineatus* și *H. postica* au fost identificate 5 tulpini ce aparțin genului *Torula*. Două dintre aceste tulpini (L1/7 și Hp3/4) au fost identificate până la nivel de gen, iar trei (L3/5, Hp3/2 și Hp4/2) au fost identificate până la nivel de specie ca *Torula caligans* prezentând valoare de bootstrap de 100%. (figura 3.11 a).

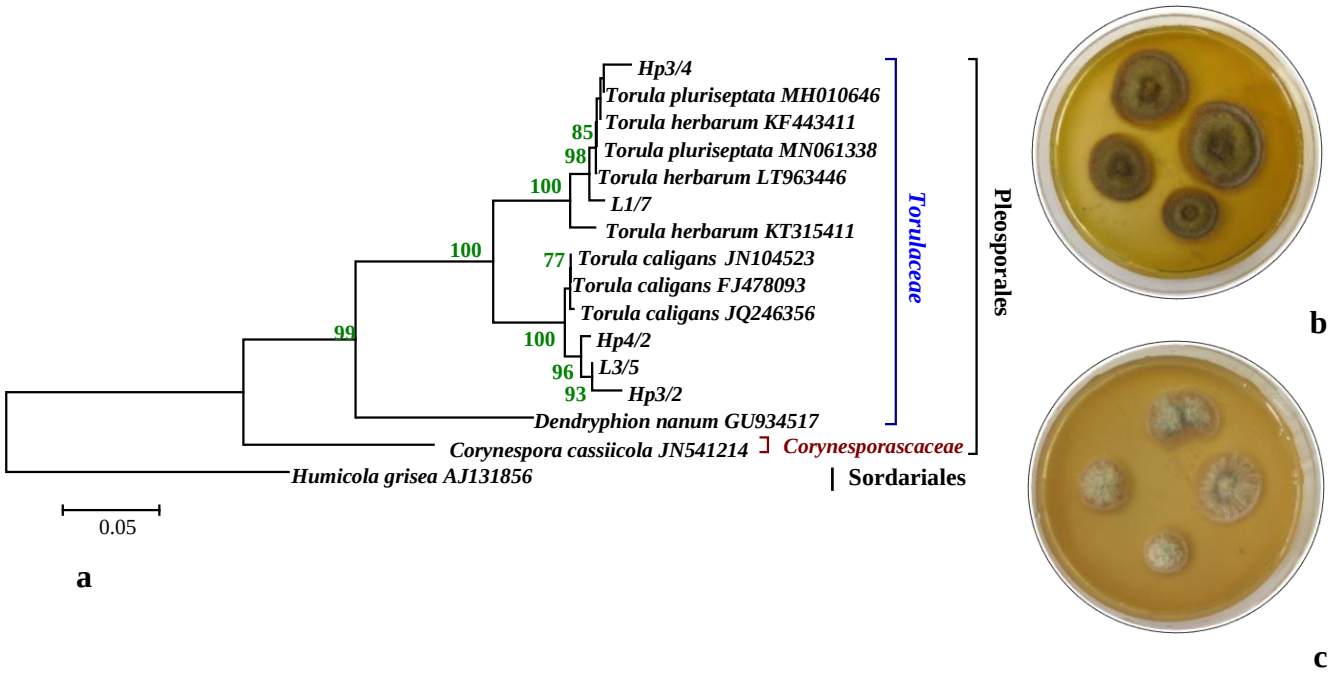


Fig. 3.11. Arborele filogenetic reconstruit și aspectul morfologic ale tulpinilor L1/7, L3/5, Hp3/2, Hp3/4, Hp4/2 (*Torula* spp.) (orig.)

a – arborele filogenetic reconstruit, **b** – aspect extern tulpina L1/7, **c** – aspect extern tulpina L3/5

***T. caligans* (Bat. and Upadhyay) Ellis, 1971**

Particularităţi morfologice: micromiceta se prezintă sub formă de colonii împrăștiate, mici și discrete, măslinii, maro sau negre, de multe ori catifelate. Miceliul este superficial şi scufundat. Conidioforii neramificaţi sau neregulat ramificaţi, drepţi sau sinuoşi. Celulele conidiale sunt poliblastice sau, uneori, monoblastice, de obicei, sferice, partea distală cu pereţi subţiri, partea proximală de culoare maro închis sau brun roşcat, cu pereţi groşi. Conidiile sunt dispuse în lanţuri simple sau ramificate, cilindrice cu capete rotunjite, elipsoidale sau sferice, maro, fără sau cu una şi mai multe septuri transversale.

Importanţa practică: *Torula caligans* a fost evidențiată ca endofit al plantei de deșert *Polycarpaea corymbosa* (Beena, Ananda, Sridhar 2000). De asemenea ciuperca a fost identificată în solurile sub – Antarctice poluate cu motorină (Ferrari, Zhang, van Dorst 2011).

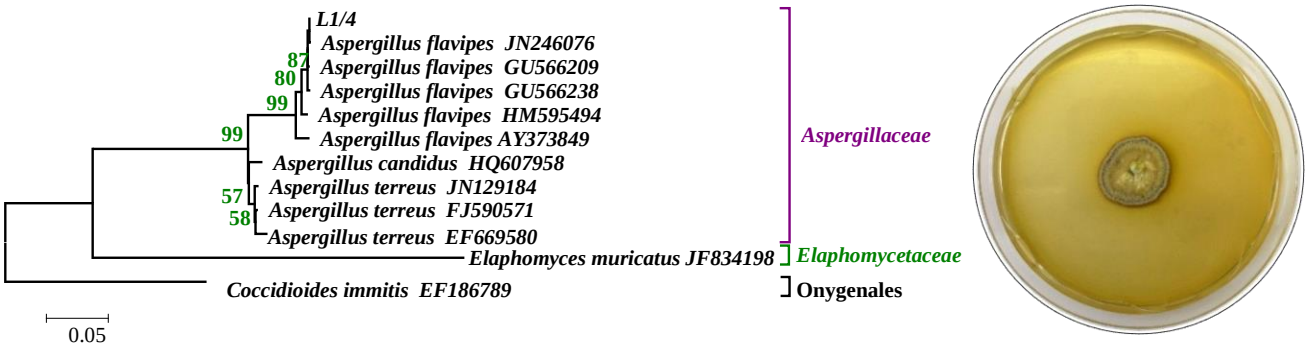
Clasa Eurotiomycetes,

Ordinul Eurotiales, Familia *Aspergillaceae,*

Genul *Aspergillus* Raper, K.B.; Fennell, D.I., 1965,

***A. flavipes* (Bain., Sart.) Thom, Church, 1926**

În rezultatul reconstituirii arborelui filogenetic tulpina L1/4 a fost identificată ca *Aspergillus flavipes* cu 99% similaritate (figura 3.12 a).



a **b**

Fig. 3.12. Arborele filogenetic reconstruit (a) și aspectul morfologic (b) ale tulpinii L1/4 (*Aspergillus flavipes*) (orig.)

Particularităţi morfologice: specie cosmopolită, frecvent întâlnită în sol participând la fazele inițiale de descompunere a materiei organice. Coloniile cresc destul de lent, atingând 3 - 5 cm în diametru; miceliul are nuanţe de la galben-brun la roşu-maro, uneori devine destul de întunecat, cu miros distinctiv (figura 3.12 b). Miceliul aerian produce deseori la suprafață un exudat intens care poate fi utilizat ca indicator al acidității mediului. Conidioforii au de la 300-500 µ până la 2-3 mm lungime şi 8-10 µm în diametru. Conidiile au 2-3 µm, sunt netede, de obicei incolore sau au nuanţe pale (Thom, Church 1926).

Importanţa practică: ciupercile speciei *Aspergillus flavipes* pot creşte în condiţii de umiditate redusă, nefavorabile altor microorganisme, astfel contribuind la fazele inițiale de descompunere a materiei organice. Există date privind capacitatea speciei de a produce o substanță cu activitate antibiotică contra *Staphylococcus aureus* Rosenbach (Bacteria, *Staphylococcaceae*) (Thom, Church 1926). Specia este asociată cu patologii umane severe precum bolile bronhopulmonare alergice, miocardite, aspergiloze, ș.a (Gehlot, Purohit, Singh 2011). Studiile recente remarcă capacitatea tulpinilor de *A. flavipes* de a produce substanțe cu efect antimicrobian, citotoxic și antiviral (El-Sayed, Yassin, Ali 2015) De asemenea specia *Aspergillus flavipes* a fost evidenţiată ca agent în controlul biologic al speciei *Pauropsylla depressa* Crawford (Homoptera, Psyllidae), dăunător al speciilor de ficus (Dhiman, Pooja 2005) și al speciei *Phytophtora parasitica* Dastur (Oomycetes, Peronosporales) patogen al plantelor (El Sayed, Ali 2020).

Genul *Penicillium* Link, 1809

În rezultatul analizei filogenetice întreprinse, în microflora fungică a speciilor *S. lineatus* și *P. apricans* au fost identificate 4 tulpini fungice din genul *Penicillium*. Tulpina L2/5, izolată din corpul insectei *Sitona lineatus* și tulpinile Pa2 și Pa3, izolate din corpul speciei *Protapion apricans* au fost identificate ca *Penicillium polonicum* cu o valoare bootstrap de 97%. Tulpina C, izolată din

corpul *S. lineatus* a fost identificată ca *Penicillium brevicompactum* cu o valoare a indicelui bootstrap de 96% (figura 3.13 a).

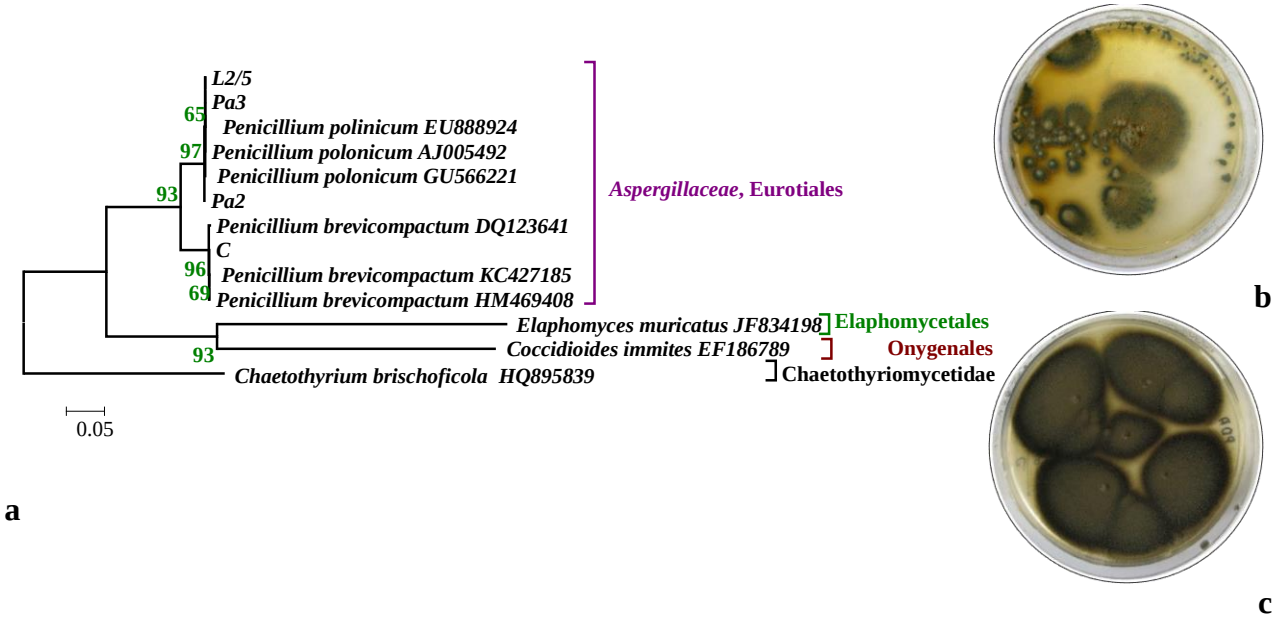


Fig. 3.13. Relaţiile filogenetice şi aspectul morfologic ale tulpinilor L2/5, Pa3, Pa2 (*Penicillium polonicum*) şi C (*Penicillium brevicompactum*) (orig.)
a – arborele filogenetic reconstruit, **b** – aspect extern tulpina L2/5 (*P. polonicum*), **c** – aspect extern tulpina C (*P. brevicompactum)*

***P. brevicompactum* Dierckx, 1901**

Particularităţi morfologice: formează colonii gălbui-gri în faza de creștere intensă, și devin de culoare gri-verzuie odată cu vârsta; au textură catifelată, de aproximativ 1 mm adâncime, de multe ori ridicată în zona centrală, cu zona marginală relativ subțire, câteodată brăzdată radial. Stolonii aerieni pot fi văzuți ocazional, fiind relativ scurți si robuști (figura 3.13 c).

Importanţa practică: *Penicillium brevicompactum* este cunoscut datorită proprietăților sale de a produce unii metaboliți prețioși, precum acidul micofenolic, brevianamida A, asperfenamat și ergosterol. Unele date sugerează faptul că extractul din *P. brevicompactum* are o puternică activitate de blocare *in-vivo* a hormonilor juvenili la *Oncopeltus fasciatus* Dallas (Castillo 1999), drept rezultat sunt dereglate procese precum metabolismul și apar modificări comportamentale ale insectei ceea ce duce la scăderea ratei de reproducere.

***P. polonicum* Zalessky, 1927**

Particularităţi morfologice: formează colonii verzi - albastre la suprafaţă şi gălbui până la roşii - maronii în substrat (figura 3.13 b). Conidioforii se formează din hifele subterane şi sunt triverticilaţi, rar biverticilaţi. Conidiile sunt netede, globulare, cu dimensiunile 3-4 × 2,5-3,5 µm. La suprafaţă coloniile formează un exudat transparent. Formează metaboliţi volatili care îi conferă miros specific (Zalessky 1927).

Importanţa practică: *Penicillium polonicum* deteriorează un şir de cereale (grâu, orz, secară, ovăz, orez, porumb, alune, carne uscată, ceapă) fiind semnalat şi în culturile vinicole (Kim, Hwang,Yu 2008). De asemenea ciuperca a fost izolată din carnea uscată (Silva et al. 2010). *Penicillium polonicum* produce un şir de exometaboliţi: acid penicilic, verrucosidin, cicloopeptin, ciclopenol, viridicatol, 3-metoxiviridicatin, anacină, metil-4-(2-(2R)-hidroxil-3-butiniloxi) benzoat. Sunt date privind rolul posibil al ciupercii în Nefropatia Endemică Balcanică (Zalessky 1927). Testările în laborator au confirmat efectul nefrotoxic al speciei *P. polonicum* (Mantle 2010).

Clasa Sordariomycetes,

Ordinul Hypocreales, Familia *Cordycipitaceae*,

Genul *Beauveria* Vuill., 1912, *B. bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill., 1912

Tulpinile B, N și L1/6 (izolate din corpul insectei *S. lineatus*) au fost identificate ca *Beauveria bassiana* prezentând 100% omologie în secvenţa nucleotidică a regiunii ITS (figura 3.14 a).

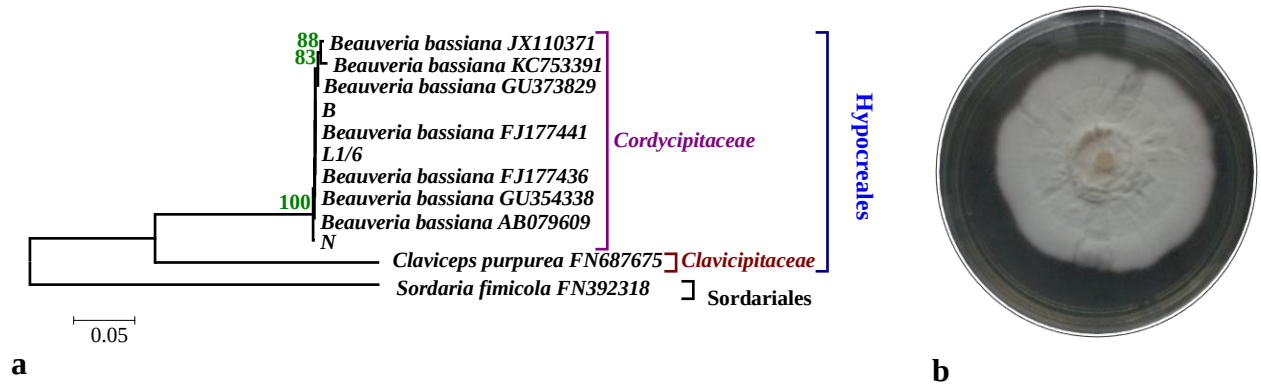


Fig. 3.14. Relațiile filogenetice și aspectul morfologic ale tulpinilor B, N și L1/6 (*B. bassiana*) (orig.)
a – arborele filogenetic reconstruit, **b** – aspect morfologic tulpina L1/6

Particularităţi morfologice: micromicetă cosmopolită entomopatogenă, răspândită în mod natural în sol (Hypocreales, *Cordycipitaceae*). Coloniile au creștere moderată până la rapidă au aspect catifelat, de praf; la început sunt albe, devenind mai târziu galben-deschise (figura 3.14b). Conidioforii sunt abundenți, apar din hifele vegetative și au 1-2 µm lungime. Celulele ce formează conidii se prezintă sub formă de agregate în grupuri dense, umflate. Conidiile sunt solitare, de formă sferică sau subsferică, netede și au 2-3 µm în diametru (de Hoog 2000).

Importanța practică: *Beauveria bassiana* este utilizată ca insecticid biologic în controlul biologic al unui spectru larg de dăunători, fiind activă de asemenea împotriva speciei *Sitona lineatus* L. (Steenberg, Ravn 1996, Riedel, Steenberg 1998) și *Hypera postica* (Yucel et al. 2018).

Specia fungică rareori infectează oamenii sau animalele, fiind considerată un insecticid sigur. Totuși a fost raportat cel puțin un caz de infecție umană a unei persoane cu imunodeficiență (Tucker 2004). În plus, ca orice praf, sporii pot determina dificultăți ale respirației. A fost constatată capacitatea micromicetei *B. bassiana* de a crește ca endofit al plantelor de cultură și avantajele pentru controlul biologic al dăunătorilor (Vidal, Jaber 2015, McKinnon et al. 2017). Specia *B. bassiana* produce un șir de substanțe biologic active printre care enzime proteolitice, lipolitice, amilaza, chitinaza cu ajutorul cărora penetrează integumentele, alcaloizi, toxina beauvericina, un ciclodepsipeptid care, alături de alte toxine are efect antibacterial (Patocka 2016). De asemenea specia posedă efect antagonist împotriva fungilor fitopatogeni (Yun et al. 2017).

Genul *Isaria* Persoon, 1794

***I. fumosorosea* Wize 1904**

În rezultatul analizei filogenetice tulpina L5/6 a fost identificată ca *Isaria fumosorosea* cu o similaritate de 99 % (figura 3.15 a).

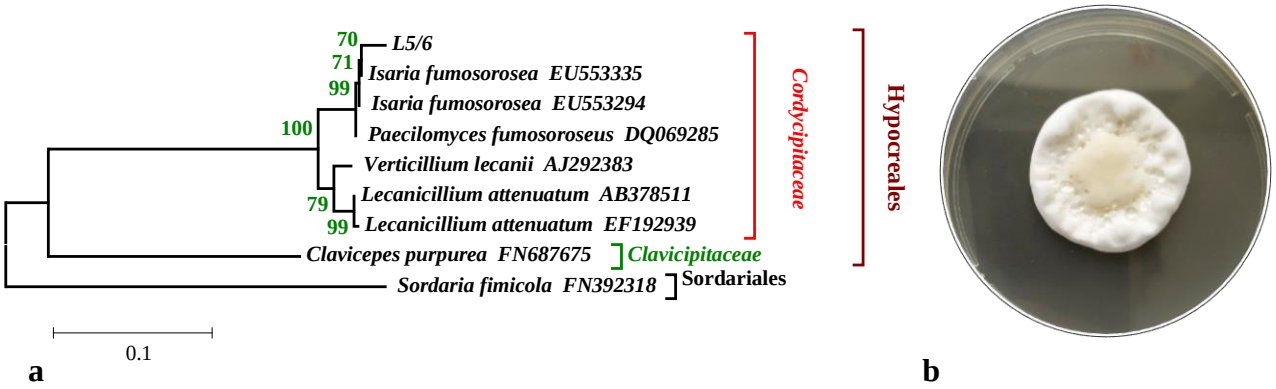


Fig. 3.15. Arborele filogenetic reconstruit (a) și aspectul morfologic (b) ale tulpinii L5/6 (*I. fumosorosea*) (orig.)

Particularități morfologice: este o micromicetă microscopică entomopatogenă, răspândită în sol. Coloniile au o creștere moderat rapidă, ating un diametru de aproximativ 4 cm, în termen de 14 zile la 25 °C, și au aspectul de pâslă. Atunci când sporulează intens coloniile au o nuanță roz. Partea reversă a coloniilor este incoloră sau galbenă, fără miros (figura 3.15 b). Structurile conidiale sunt complexe, conidioforii se formează din hifele submerse sau aeriene, ating 100 µm în lungime și 1,5-2 µm lățime, sunt formați din ramuri verticilate ce conțin 4-6 fialide. Conidiile sunt cilindrice sau fusiforme, având dimensiunile 3 - 4 × 1 - 2 µm (Samson 1974).

Importanţa practică: *Isaria fumosorosea* este o specie cosmopolită cu o gamă largă de gazde, care include insecte din peste douăzeci şi cinci familii (inclusiv suprafamilia *Curculionoidae*) și specii de acarieni. Micromiceta este folosită pentru controlul biologic al

insectelor, dăunători ai plantelor decorative, plantelor leguminoase, porumbului, bumbacului, orezului și a altor culturi. De asemenea, *I. fumosorosea* reduce dezvoltarea și răspândirea făinării castraveților, *Sphaerotheca fuliginea* (Schltdl.) Pollacci (Ascomycota, *Erysiphaceae*) (Kavkova, Curn 2005). Tulpinile de *I. fumosorosea* produc numeroși metaboliți, inclusiv proteaze, chitinaze, lipaze, beauvericină implicate în procesul de patogeneză la insecte (Luangsa-Ard et al. 2009, Ali, Huang, Ren 2010).

Familia *Nectriaceae*,

Genul *Fusarium* Link, 1809

În rezultatul reconstituirii arborelui filogenetic în microflora fungică a speciei *S. lineatus* a fost identificată o specie, iar în microflora dăunătorului *H. postica*, 2 specii din genul *Fusarium*. Tulpina L1/8 a fost identificată ca *F. equiseti*, tulpina Hp5/6 ca *F. oxysporum* și tulpina Hp5/7 ca *F. tricinctum* cu o valoare bootstrap de 100% (figura 3.16 a).

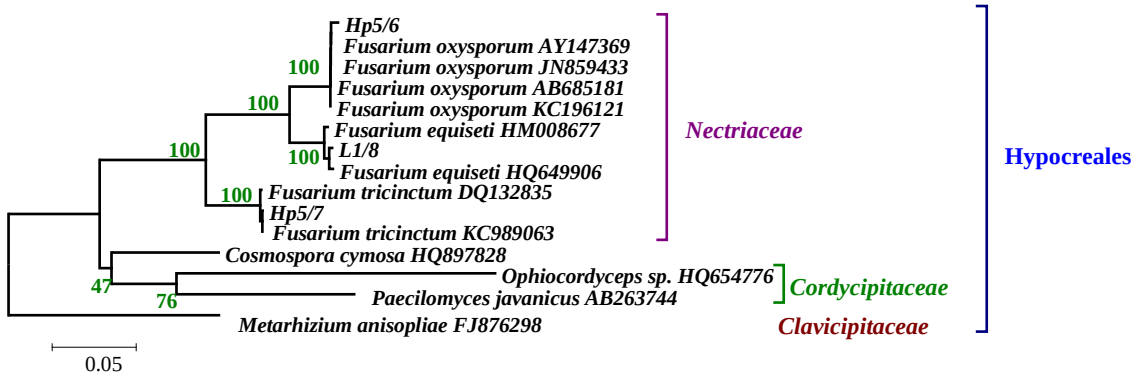
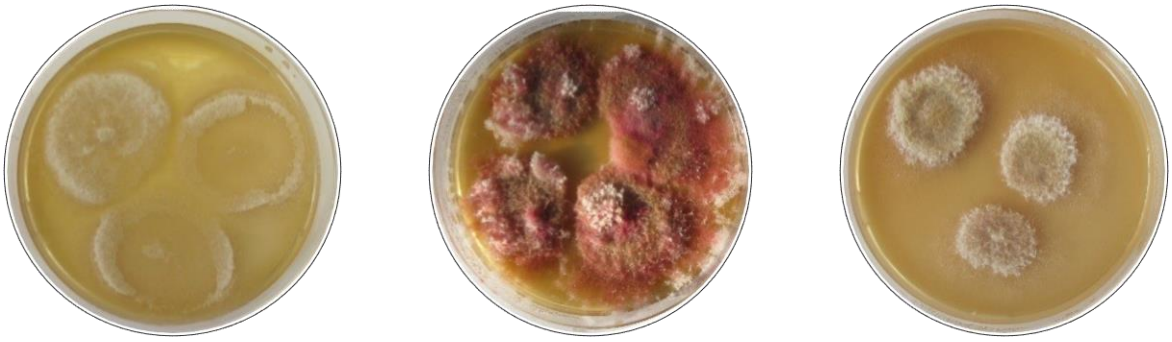


Fig. 3.16. Relaţiile filogenetice ale tulpinilor L1/8 (*Fusarium equiseti*), Hp5/6 (*F. oxysporum*) și Hp5/7 (*F. tricinctum*) (orig.)

***F. equiseti* (Corda) Sacc, 1886**

Particularități morfologice: Coloniile tinere au un miceliu pufos, alb, care în 7-10 zile își schimbă culoarea în bej ajung la nuanțe de maro închis în cele din urmă. Macroconidiile la început se dezvoltă slab pe fialidele laterale simple. Producția conidioforilor se intensifică după aproximativ 10 zile. Clamidosporii sunt intercalari, solitari, în lanțuri sau noduri, sferici, având 7-9 µm în diametru. Periteciile sunt rare, se dezvoltă slab, ovoide cu un perete exterior dur, având 200-350 µm lungime, 180-240 µm diametru. Ascele au 4-8 ascospori (figura 3.17 a).



a **b** **c**

Fig. 3.17. Aspectul morfologic ale tulpinilor (a) L1/8 (*Fusarium equiseti*), (b) Hp5/6 (*F. oxysporum*) și (c) Hp5/7 (*F. tricinctum*) (orig.)

Importanța practică: Speciile din genul *Fusarium* sunt patogeni ai plantelor și pot exista ca endofiți. *Fusarium equiseti* a fost izolat de pe o gamă largă de gazde, în special gazde tropicale aparținând următoarelor genuri: *Agave, Allium, Apium, Beta, Brassic, Cucumis, Cucurbita, Cupressu, Dianthus, Eucalyptus, Ficus, Gossypium, Helianthus, Hevea, Hordeum, Linum, Luffa, Lycopersicon, Nicotiana, Oryza, Panicum, Papaver, Pennisetum, Phaseolus, Pinus, Pisum, Prunus, Pyrus, Rosa, Solanum, Sorgum, Theobroma, Trifolium, Triticum, Vicia, Vigna* și *Zea*, de asemenea, este pe larg răspândită în sol. Sunt patogene pentru cucurbitacee, avocado, porumb, pentru cereale în stadiul de răsad și, de asemenea, cauzează putrezirea rădăcinilor. Studiile recente sugerează că *Fusarium equiseti* izolat din rizosfera plantelor ierboase poate promova semnificativ creșterea plantelor și suprima mai multe boli cauzate de *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii, Gaeumannomyces graminis var. tritici* și *Cochliobolus sativus* (Hyakumachi 1994, Hyakumachi, Kubota 2004).

***F. oxysporum* Schltdl., 1824**

Particularităţi morfologice: Miceliul este de culoare albă sau piersic, de obicei cu nuanțe mov, rar la început, apoi cu creștere abundentă, suprafața coloniilor devenind încrețită în culturile vechi (figura 3.17 b). Microconidiile apar pe fialide, care apar lateral pe hife sau din conidioforii scurți slab ramificați, în general abundenți, oval – elipsoidali până la cilindrici, cu dimensiunile de 5-12×2,2-3,5 microni. Macroconidiile la unele tulpini sunt rare și apar pe conidioforii mai evoluați. Unele tulpini formează pustule stromatice sterile de culoare violetă palidă sau intensă, asemănătoare periteciilor speciei *Gibberella*. Clamidosporii au pereți netezi și duri, în general sunt abundenți, se formează atât terminal, cât și intercalar, în general fiind solitari dar, ocazional, formează perechi sau lanțuri.

Importanţa practică: Aceste ciuperci extrem de diverse și adaptabile au fost găsite în solurile ecosistemelor de deșert, până la pădurile tropicale și temperate, pășuni și solurile de tundră (Stoner, 1981). Tulpinile de *F. oxysporum* sunt omniprezente în sol, existând ca saprofiți, având capacitatea de a degrada lignina (Rodriguez et al. 1996) și complexele de carbohidrați (Christakopoulos 1995, 1996), fiind asociate cu resturile organice din sol. Specia este, de asemenea, endofit al plantelor, având capacitatea de a coloniza rădăcinile plantelor (Kuldau, Yates 2000). Uneori specia poate fi folosită pentru suprimarea altor patogeni dar trebuie utilizată cu atenție (Larkin, Hopkins, Martin 1993, Lemanceau et al. 1993, Sajeena, Nair, Sreepavan 2020). Deși rolul predominant al acestor ciuperci în sol este de a fi saprofiți sau endofiți benefici pentru plante, există multe tulpini patogene pentru plante, în special pentru culturile agricole. Tulpinile patogene de *F. oxysporum* au fost studiate timp de mai mult de 100 de ani. Spectrul de gazde a acestor ciuperci este extrem de larg și include și unele animale, variind de la artropode (Teetor-Barsch, Roberts 1983) la om, (Nelson, Dignani, Anaissie 1994), precum o gamă largă de gimnosperme și angiosperme, inclusiv culturi cerealiere și furajere (Gordon, Martyn 1997, Infantino et al. 2006, Kraft, Larsen, Inglis 1998). În timp ce în mod colectiv, tulpinile patogene de *F. oxysporum* au o gamă largă de gazde, tulpinile individuale izolate, de obicei, sunt patogene pentru un spectru îngust de specii de plante.

***F. tricinctum* (Corda) Sacc., 1886**

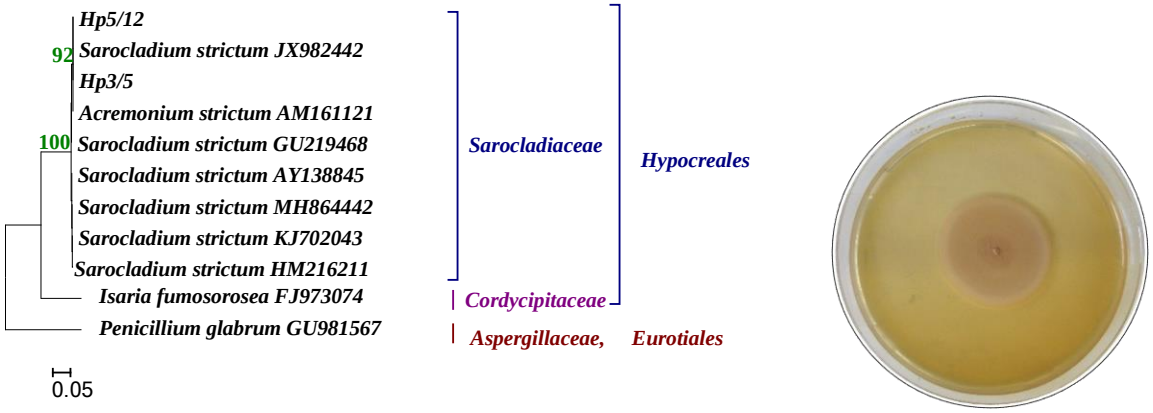
Particularități morfologice: După 10 zile de creştere coloniile pot atinge 8 - 9,35 cm lungime. La începutul cultivării specia formează un miceliu aerian dens de culoare albă, flocos, care cu timpul devine roz pastelat cu pigmentare roșie închisă (figura 3.17 c). Specia produce clamidospori netezi, dispuși individual sau în lanțuri. Conidiile sunt de două tipuri: macroconidii falcate sau puternic curbate, cu dimensiunile 25 - 55 × 3 - 4,5 µm, și microconidii abundente, napiforme, ovale sau piriforme, 7 - 20 × 4,5 - 7,5 µm, asemănătoare unui ciorchine de struguri, pe celulele conidiogene monofialide.

Importanța practică: Conform studiilor recente specia *F. tricinctum* a fost atestată ca patogen al semințelor de grâu (Castanares et al. 2011). *F. tricintum* face parte din grupul speciilor din genul *Fusarium*, responsabil de contaminarea boabelor de cereale cu eniatină și moniliformină, compuși toxici pentru om și animale (Kokkonen et al. 2010). Se întâlnește ca endofit al plantelor, produce micotoxine cu efect antagonist asupra altor patogeni. O tulpină de *F. tricinctum* izolată de pe *Rhododendron tomentosum*, un arbust întâlnit pe scară largă în emisfera nordică, produce compuși antimicrobieni, activi împotriva *Staphylococcus carnosus*, *Candida albicans* și *C. utilis*. (Tejesvi et al. 2013).

Familia *Sarocladiaceae*, Genul *Sarocladium* W. Gams & D. Hawksw., 1976

***Sarocladium strictum* (W. Gams) Summerbell, 2011 (=*A. strictum* W.Gams, 1971)**

Tulpinile Hp3/5 și Hp5/12, izolate din corpul speciei *H. postica* au fost identificate ca *Sarocladium strictum* prezentând o valoare bootstrap de 100% (figura 3.18 a).



a **b**

Fig. 3.18. Arborele filogenetic reconstruit (a) și aspectul morfologic (b) ale tulpinilor Hp3/5 și Hp5/12 (*S. strictum*)

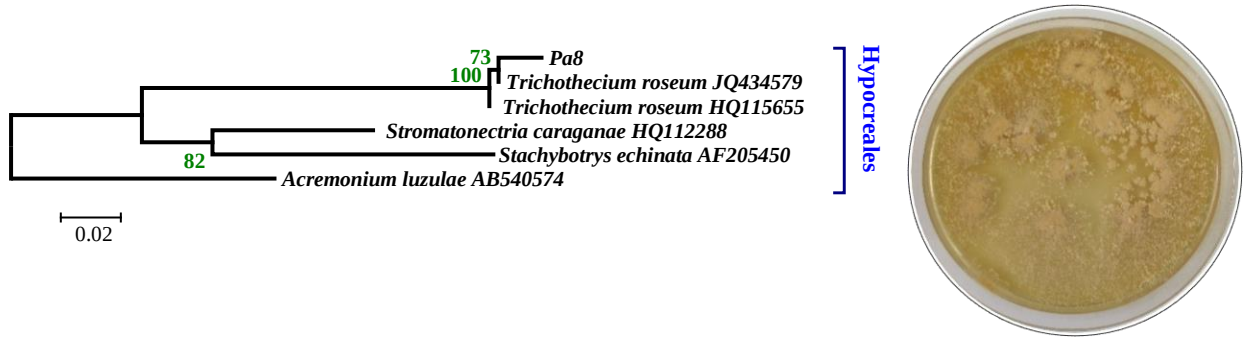
Particularităţi morfologice: Coloniile au creștere rapidă, suprafața este umedă până la lipicioasă, roz sau portocaliu (figura 3.18 b). Conidioforii sunt simpli, ocazional ramificați. Fialidele subțiri, pornesc de la hifele scufundate sau ușor fasciculate aeriene, 20-65 × 1,4-2,5 µm. În cazul fialidelor reduse se observă sporularea submersă. Conidiile sunt grupate în capitole cilindrice sau elipsoidale, 3,3-5,5 × 0,9-1,8 µM, hialine (de Hoog 2000).

Importanța practică: Genul *Sarocladium* conține în majoritate specii saprofite, fiind izolate din materialul vegetal mort și din sol. *Sarocladium strictum* este patogen pentru plante, fungi, oameni și alte animale. Ca plante gazdă putem menționa specii din genurile *Abies, Dianthus, Larix, Lycopersicon, Malus, Picea, Quercus, Zea*, ș.a. *S. strictum* este un parazit al altor fungi, inclusiv *Helminthosporium solani* Durieu, Mont. (Ascomycota, *Pleosporaceae*), care provoacă boli în culturile de cartofi (Rivera-Varas 2007). Specia poate deveni uneori un agent patogen uman, în special al bolnavilor de imunodeficiențe sau al persoanelor cu organismul slăbit, sau pot cauza infecții (Yalaz et al. 2003, Sener et al. 2008, Sharma et al. 2013).

Familia (*Incertae sedis)*, Genul *Trichothecium* Link, 1809

***T. roseum* (Pers.) Link, 1809**

Tulpina Pa8, izolată din corpul speciei *P. apricans* a fost identificată ca *Trichothecium roseum* prezentând 100% omologie în secvența nucleotidică a regiunii ITS (figura 3.19 a).



a **b**

Fig. 3.19. Arborele filogenetic reconstruit (a) și aspectul morfologic (b) ale tulpinii Pa8 (*Trichothecium roseum*) (orig.)

Particularităţi morfologice: Coloniile cresc moderat rapid, au aspect plat, sunt pulverulente datorită sporulării intense, inițial au culoare albă, dar devin roz, sau portocalii cu vârsta. Conidiofori se pot distinge de hifele vegetative fiind erecți, neramificați, de multe ori septați în apropierea bazei (figura 3.19 b).

Importanţa practică: *Trichothecium roseum* are o distribuție la nivel mondial și este de multe ori izolată din substraturi vegetale decadente, sol, semințe de porumb, și produse alimentare (în special produse din făină), cauzează putrezirea fructelor (Dal Bello 2008, Oh, Nam, Yoon 2014). Speciile din genul *Trichothecium* sunt capabile de a produce micotoxine (Lugauskas, Raudoniene, Sveistyte 2005). De asemenea tulpinile de *T. roseum* pot exista în calitate de endofiți ai plantelor, posedă efect antagonist față de unele micromicete fitopatogene, iar metaboliții săi au proprietăți antitumorale (Zhang et al. 2010). Specia *T. roseum* este cunoscută pentru producerea trihotecinei care are activitate antifungică, antibacteriană, antiviralș și insecticidă.

Ordinul Sordariales, **Familia *(Incertae sedis)***,

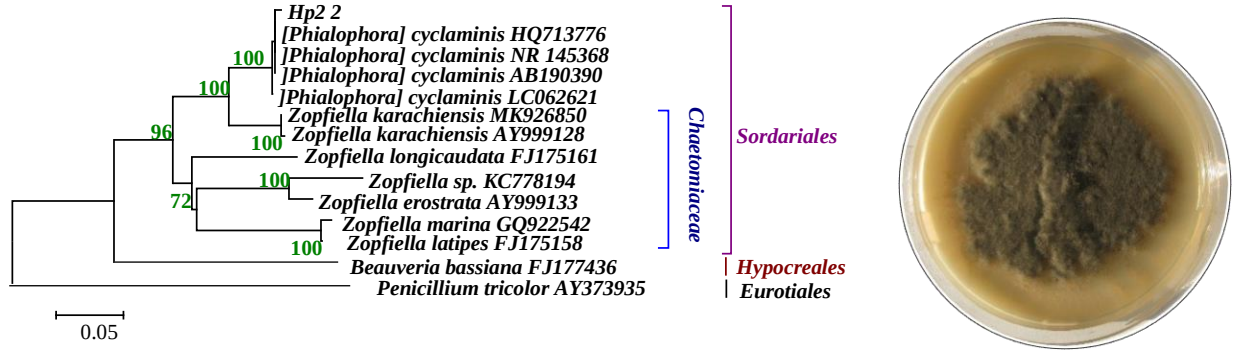
***[Phialophora] cyclaminis* J.F.H. Beyma 1942**

Tulpina Hp2/2 izolată din corpul insectei *H. postica* a fost identificată ca *[Phialophora] cyclaminis* prezentând 100% omologie în secvenţa nucleotidică a regiunii ITS (figura 3.20 a).

Denumirea genului este dată în paranteze pătrate, deoarece conform ultimilor date ale filogeniei moleculare, această specie așteaptă să fie reclasificată în alt gen din cadrul ordinului Sordariales (Vu et al. 2019). Genul *Phialophora* Medlar 1915 aparține clasei Eurotiomycetes, odinului Chaetothyriales, familiei *Herpotrichiellaceae.*

Particularităţi morfologice: Coloniile izolate au aspect lânos sau sunt catifelate, olivacee până la maro închis, hifele cu pereți netezi maro pal (figura 3.20 b). Conidioforii slab diferențiați, maro deschis, rar ramificați, care apar pe miceliul aerian, erect sau prostrat, cu pereți netezi, poartă

celule conidiogene laterale și terminale. Celulele conidiogene sunt izolate sau integrate și terminale, adesea câte una pe o ramură a conidioforului, conțin conidii produse enteroblastic și individual, succesiv la vârf. Conidiile sunt globulare, hialine, cu diametrul de 1,5-3,5 µm (Williams, Spooner 1991).



a **b**

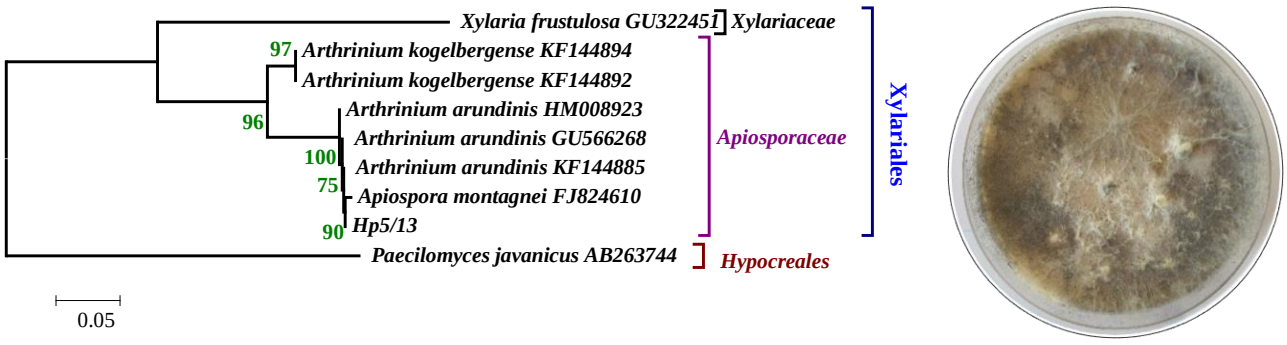
Fig. 3.20. Arborele filogenetic reconstruit (a) și aspectul morfologic (b) ale tulpinii Hp2/2 (*[Phialophora] cyclaminis*) (orig.)

Importanţa practică: tulpinile din specia *[Phialophora] cyclaminis* sunt asociate cu plantele decorative din genurile *Cyclamen*, *Cymbidium*, *Sida*, arborele de cacao *Theobroma spp*. Specia este răspândită în Africa, Australasia și Europa.

Ordinul Xylariales, Familia *Apiosporaceae,* Genul *Apiospora* Sacc., 1875

***A. montagnei* Sacc., 1875 (=Arthrinium arundinis (Corda) Dyko & B. Sutton, 1979)**

Tulpina Hp5/13 a fost identificată ca *Apiospora montagnei* prezentând 100% omologie în secvenţa nucleotidică a regiunii ITS (figura 3.21 a).



a **b**

Fig. 3.21. Arborele filogenetic reconstruit (a) și aspectul morfologic (b) ale tulpinii Hp5/13 (*Apiospora montagnei*) (orig.)

Particularităţi morfologice: Coloniile flocoase, hialine, devin maro - maro închis în cazul în care se produc conidii (figura 3.21 b). Miceliul scufundat și superficial. Conidiofori drepți sau sinuoși, neramificați, subhialini, pal măslinii sau maro, netezi, moderat septați. Celulele conidiogene discrete. Partea alungită a conidioforilor este de 0,5-1,0 µm și prezintă septuri. Conidiile sunt lenticulare, 5-5-8,0 × 3,0 – 4,5 µm, uneori neregulat alungite, maro deschis. Periteciile sunt sferice, de multe ori turtite la baza, 120-200 µm, cu perifize hialine, perete pseudoparenchimatic, 15-25 µm. Ascele sferice până la cilindrice, cu 8 spori, cu pereți subțiri, unimembranare. Ascosporii hialini, septați în apropierea bazei (Kirk 1991).

Importanţa practică: Specia *A. montagnei* a fost atestată în micobiota plantelor din genurile *Acer, Ammophila, Brassica, Capsicum, Carex, Chrysanthemum, Cicer, Cinnamomum, Cucumis, Cupressus, Fagus, Fragaria, Fraxinus, Gossypium, Hordeum, Lens, Lycopersicon, Malus, Nicotiana, Oryza, Pinus, Pisum , Prunus, Pseudotsuga, Pyrus, Ricinus, Solanum, Triticum, Urtica, Vigna, Vitis, Zea.* De asemenea specia a fost izolată din aer, microflora animalelor, alimente (pâine, mazăre uscată), melasă, sol și resturi vegetale.

Specia rar este întâlnită ca agent patogen primar al plantelor, dar este întâlnită frecvent ca un invadator secundar sau ca un saprofit (Kirk 1991). De asemenea tulpinile de *A. motagnei* sunt producători de metaboliți secundari cu activitate citotoxică împotriva celulelor canceroase (Wang et al. 2017).

Clasa Saccharomycetes

Ordinul Saccharomycetales, Familia *Dipodascaceae*

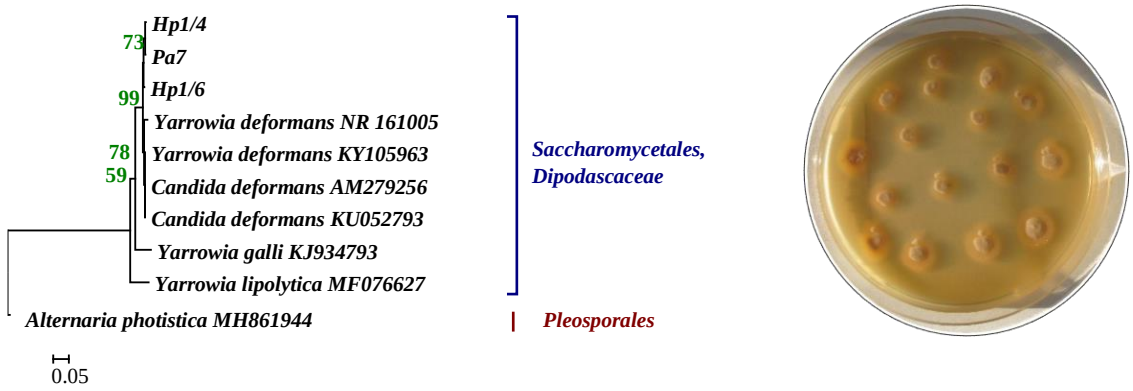
Genul *Yarrowia* Van der Walt & Arx, 1981

***Yarrowia deformans* (Zach) M. Groenew. & M.T. Sm., 2013**

(=*Candida deformans* (Zach) Langeron & Guerra, (1938))

În rezultatul reconstituirii arborelui filogenetic tulpinile Hp1/4 și Hp1/6 izolate din corpul insectei *H. postica* și tulpina fungică Pa7, izolată din corpul dăunătorului *P. apricans*, au fost identificate ca *Yarrowia deformans* cu o valoare bootstrap de 99 % (figura 3.22 a).

Particularități morfologice: Tulpinile de *Y. deformans* pot avea aspect divers, de la neted și mat până la catifelat și lucitor. Specia formează pseudomiceliu sau miceliu adevărat în funcție de stadiul haploid sau diploid (figura 3.22 b).



a **b**

Fig. 3.22. Arborele filogenetic reconstruit (a) și aspectul morfologic (b) ale tulpinilor Pa7, Hp1/4 și Hp1/6 (*Yarrowia deformans*) (orig.)

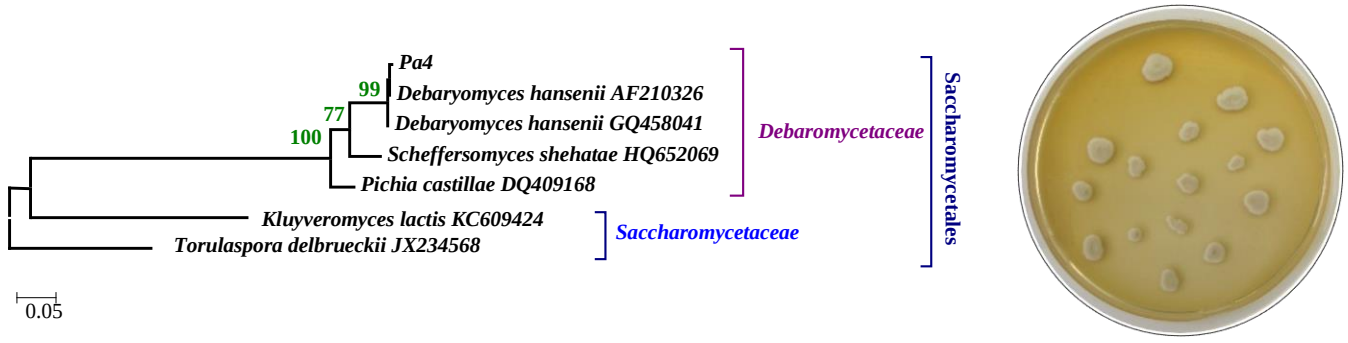
Importanța speciei: *Y. deformans* este una dintre cele mai larg studiate drojdii, este un organism aerob obligat, capabil de a produce metaboliți importanți și cu o activitate secretorie intensă, utilizat pe larg în industrie, în biologia moleculară și în studiile de genetică. Lipaza produsă de această specie este pe larg utilizată în industria detergenților, farmaceutică. De asemenea *Y. deformans* este capabilă de a produce enzime extracelulare și metaboliți secundari importante din punct de vedere industrial (Bigey et al. 2003, Michely et al. 2013).

Familia *Debaryomycetaceae*

Genul *Debaryomyces*, Lodder, Kreger-van Rij ex Kreger-van Rij, 1834

***D. hansenii* (Zopf) Lodder, Kreger, 1957**

În rezultatul analizei filogenetice tulpina Pa4, izolată din corpul insectei *Protapion apricans* a fost identificată ca *Debaryomyces hansenii* cu o similaritate de 99 % (figura 3.23 a).



a **b**

Fig. 3.23. Arborele filogenetic reconstruit (a) și aspectul morfologic (b) ale tulpinii Pa4 (*Debaryomyces hansenii*) (orig.)

Particularități morfologice: Specia *D. hansenii* formează colonii sferice sau ovoidale, pal sure sau gălbii, cu suprafața lucioasă, sau mată, netedă sau rugoasă. Pseudomiceliul este absent sau este foarte primitiv, de culoare pală, hialină. În cazuri rare este dezvoltat. Ascosporii sunt sferici (figura 3.23 b).

Importanța practică: *D. hansenii* este o drojdie osmo-, halo- și xero-tolerantă. Este cunoscută a fi un contaminant al diferitor alimente cu activitate scăzută a apei. Ea poate fi cultivată în medii cu până la 25% NaCl sau 18% glicerol și prezintă interes biotehnologic sporit datorită proprietăților sale fiziologice și biochimice (Breuer, Harms 2006, Gori et al. 2012). *D. hansenii* poate provoca, de asemenea boli, sau este asociată cu infecțiile (Desnos-Ollivier 2008). *D. hansenii* este capabilă să sintetizeze sau să tolereze mai multe toxine. Sinteza toxinelor poate fi un subiect interesant pentru cercetarea biotehnologică, orientată spre producerea de toxine, sau aplicarea *D. hansenii* în scopul de a împiedica creșterea microorganismelor patogene (Banjara et al. 2016, Al-Qaysi et al. 2017, Medina-Cordova et al. 2018).

Încrengătura BASIDIOMYCOTA,

Clasa Tremellomycetes, Ordinul Tremellales, Familia *(Incertae sedis),*

Genul *Papiliotrema* J.P. Samp., M. Weiss & R. Bauer, 2002

***P. laurentii* (Kuff.) Xin Zhan Liu, F.Y. Bai, M. Groenew. & Boekhout, 2015 (=*Cryptococcus laurentii* (Kuff.) C.E. Skinner, 1950)**

În rezultatul reconstituirii arborelui filogenetic al tulpinii L1/5 această tulpină a fost identificată ca *Papiliotrema laurentii* cu o valoare bootstrap de 100% (figura 3.24 a).

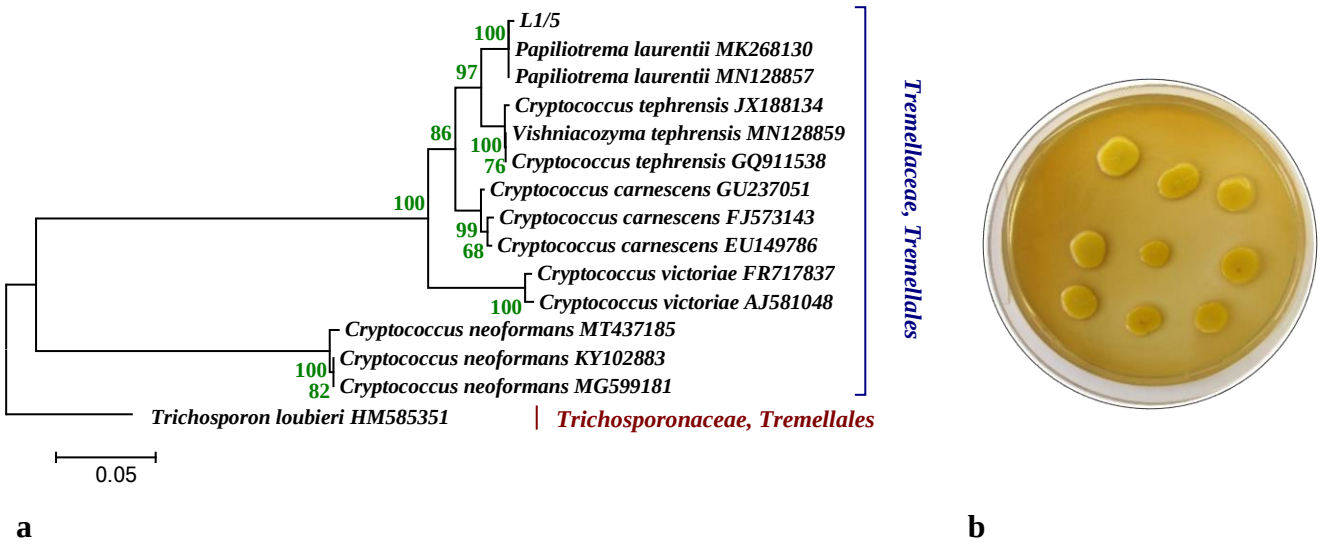


Fig. 3.24. Arborele filogenetic reconstruit (a) și aspectul morfologic (b) ale tulpinii L1/5 (*Papiliotrema laurentii*) (orig.)

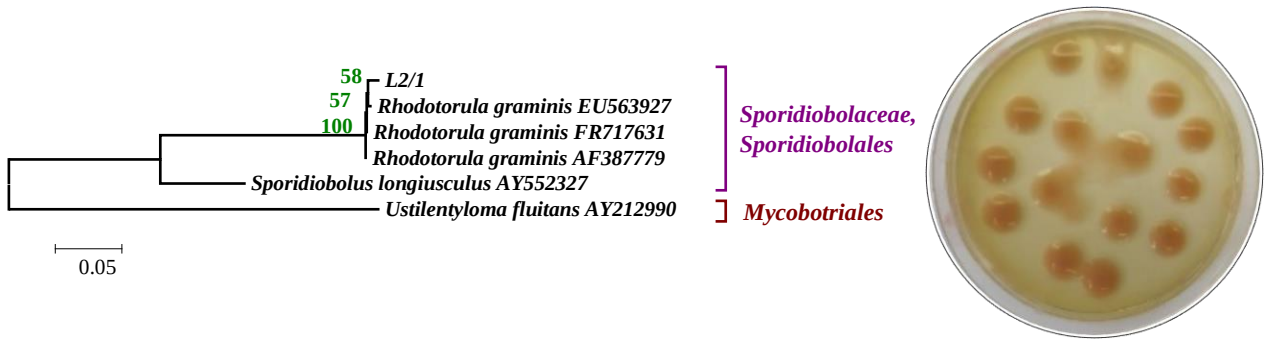
Particularităţi morfologice: coloniile sunt de culoare crem, devenind galbene spre oranj, cu textură netedă, uneori mucoidală, suprafață plată sau convexă (figura 3.24 b). Celulele sunt globulare, elipsoidale până la cilindrice, 2,0- 5,5 × 3,0-7,0 µm, cu înmugurire polară. Pseudohifele sunt absente. Unele tulpini de *P. laurentii* pot să formeze un pigment cafeniu pe mediul nutritiv Bird Seed Agar și pot colora mediul CGB (canavanine– glycine–bromothymol blue) Agar în albastru similar speciei *Cryptococcus gatii*, sau *C. neoformans* însă spre deosebire de acestea specia *P. laurentii* poate asimila lactoza și melibioza (Mussa, Randhawa, Khan 2000).

Importanţa practică: tulpinile *P. laurentii* pot fi izolate din diverse medii, precum apa marină, solul, materia vegetală în proces de putrefacție (Mussa, Randhawa, Khan 2000), filosferă (Limtong, Kaewwichian 2014). Tulpinile de *P. laurentii* pot fi utilizate în calitate de agenți de control biologic al microorganismelor care cauzează putrefacția fructelor (Zhang, Zheng, Yu 2007, Bautista-Rosales et al. 2014). Există date privind izolarea tulpinilor de *P. laurentii* în cazuri de afecțiuni pulmonare, infecții fungice ș.a (Sadhna, Hawaldar 2015, Londero et al. 2019).

Clasa Microbotryomycetes, Ordinul Sporidiobolales, Familia *Sporidiobolaceae*, Genul *Rhodotorula* F.C. Harrison, 1927

***R. graminis* Di Menna, 1958**

În rezultatul reconstituirii arborelui filogenetic, tulpina fungică L2/1, izolată din corpul insectei *S. lineatus* a fost identificată ca *Rhodotorula graminis* cu o valoare bootstrap de 100 % (figura 3.25 a).



a **b**

Fig. 3.25. Arborele filogenetic reconstruit (a) și aspectul morfologic (b) ale tulpinii L2/1 (*Rhodotorula graminis*) (orig.)

Particularităţi morfologice: *Rhodotorula graminis* este o drojdie unicelulară pigmentată, care poate fi distinsă ușor prin culoarea sa oranj. Culoarea coloniilor poate varia de la crem-roz, galben până la oranj (figura 3.25 b). Formează celule sferice sau alungite și blastoconidii. Dimensiuni 2,5-6,5×6,5-14,0 µm.

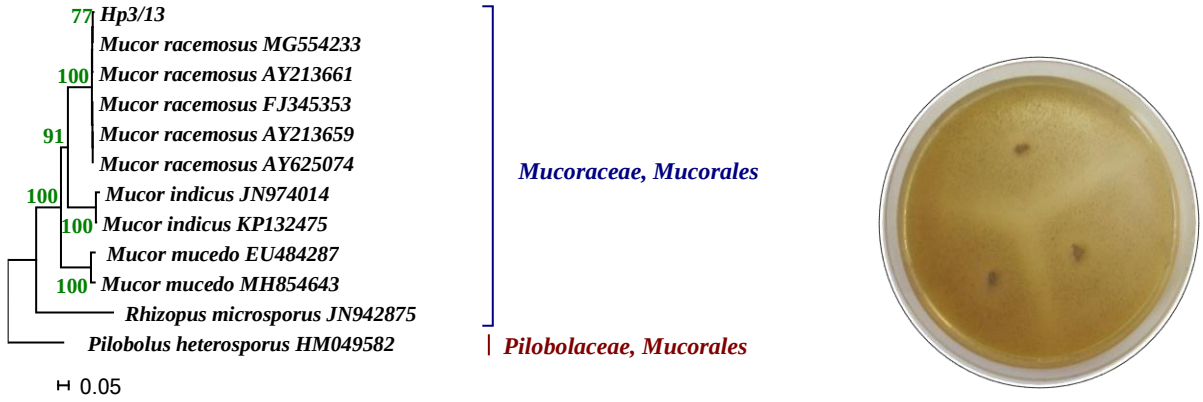
Importanța practică: este o specie ubicvistă care poate fi izolată din apă, aer, sol. Este un endofit al unui spectru larg de gazde și poate stimula creșterea și dezvoltarea plantelor (Knoth et al. 2014). Poate suporta niveluri înalte de deficit de azot până la 1 % din biomasa sa. *Rhodotorula graminis* are capacitatea de a utiliza o gamă largă de substanțe în calitate de surse de carbon pentru a produce lipide, fiind capabilă să reziste la o gamă largă de inhibitori eliberați la descompunerea materiei ligno-celulozice. Această particularitate a speciei este utilizată pentru obținerea biodieselului (Galafassi 2012, Martinez-Silveira et al. 2019).

Încrengătura MUCOROMYCOTA,

Ordinul Mucorales, Familia *Mucoraceae*,

Genul *Mucor* Fresen., 1850, *M. racemosus* Fresen., 1850

În rezultatul analizei filogenetice tulpina Hp3/13, izolată din corpul insectei *H. postica* a fost identificată ca *Mucor racemosus* cu o similaritate de 100 % (figura 3.26 a).



a **b**

Fig. 3.26. Arborele filogenetic reconstruit (a) și aspectul morfologic (b) ale tulpinii Hp3/13 (*Mucor racemosus*) (orig.)

Particularitățile morfologice: Coloniile sunt pal sure (figura 3.26 b). Sporangioforii hialini, până la 20 µm înălțime, ramificați simpodial și monopodial. Sporangiile maro, până la 80 (-90) µm diametru; columelele subsferice până la piriforme, cu baza trunchiată, cafeniu deschis, sporangiosporii au perete neted, sunt sferici până la elipsoidali, 8-10 µm în diametru. Clamidosporii sunt grupați în sporangiospori. Zigosporii sunt până la 110 µm diametru, suspensorii egali sau aproape egali.

Importanța practică: Specia *M. racemosus* are o distribuție mondială, fiind în preponderență o specie de sol. Totuși această micromicetă a fost identificată într-o diversitate mare de biotopuri, materia vegetală în descompunere, culturile agricole, legumicole și nuci. Poate fi întâlnită pe fructe, în sucuri sau cașcaval și în aerul încăperilor (Bekada 2008). Tulpinile de

M. racemosus au capacitatea de a degrada detergenții și pesticidele (Jakovljevic et al. 2014, Kataoka 2018). Studiile indică că există oameni alergici la specia *M. racemosus.*

Genul *Rhizopus* Ehrenb., 1833, *R. stolonifer* (Ehrenb.) Vuill., 1902

Tulpina L6/4 a fost identificată ca *Rhizopus stolonifer* prezentând valoarea bootstrap de 100% (figura 3.27 a).

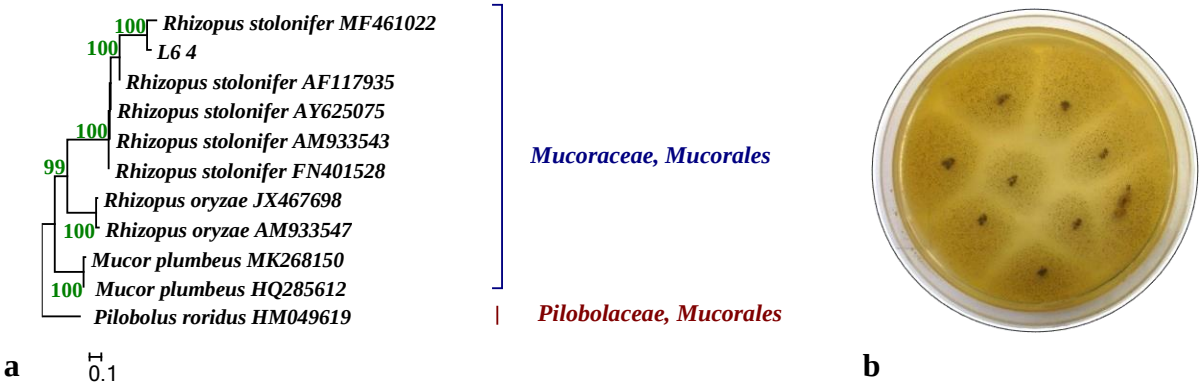


Fig. 3.27. Arborele filogenetic reconstruit (a) și aspectul morfologic (b) ale tulpinii L6/4 (*Rhizopus stolonifer*) (orig.)

Particularităţi morfologice: este o micromicetă larg răspândită, având un miceliu aerian dens, la început alb, apoi gri închis (roşu sau maro). Rizoizii sunt bine dezvoltaţi. Sporangioforii au aproximativ 2500 µm lungime şi 35 µm diametru; sporangii au până la 280 µ în diametru, lungimea columelei puțin mai mult de jumătate din înălțimea sporangială (figura 3.27 b). Columela sporangioforilor este ovoidă sau elipsoidală. Specia poate produce zigospori negri, destul de mari (Zheng et al. 2007).

Importanţa practică: *R. stolonifer* se dezvoltă pe fructe: papaya, prune, căpșuni, cartofi dulci, bumbac, arahide și este întâlnită în rizosfera diferitor plante, în sol și pe frunze putrezite. Provoacă putrezirea fructelor după cules fiind cauza unor pierderi economice importante. Specia *R. stolonifer* poate fi agent cauzal al intoxicațiilor și alergiilor la om (Ribes, Vanover-Sams, Baker 2000, Donthi et al. 2011). Cu toate acestea, rolul ciupercii ca organism patogen al animalelor homeoterme urmează a fi studiat, deoarece aceasta nu crește la temperatura de 37 °C (Zheng et al. 2007).

În rezultatul cercetărilor efectuate, în microbiota speciilor *Sitona lineatus, Hypera postica* și *Protapion apricans* au fost identificate 8 specii de micromicete fitopatogene: *Penicillium polonicum, Fusarium equiseti, F. oxysporum, F. tricinctum, Sarocladium strictum, Trichothecium roseum, Alternaria alternata* și *Rhizopus stolonifer*, care provoacă daune importante culturilor

agricole. De asemenea 2 specii fungice sunt potențiali patogeni umani (*Aspergillus flavipes* și *Penicillium polonicum*), 2 specii asociate cu patologiile animale (*Sarocladium strictum* și *Alternaria alternata*), iar specia *Fusarium tricinctum* produce substanțe toxice pentru om și animalele homeoterme. Dintre speciile identificate, conform datelor din literatura de specialitate, 9 posedă efect antagonist asupra microorganismelor fitopatogene, iar 15 sunt producătoare de substanțe biologic active. Astfel sunt necesare investigații suplimentare în scopul caracterizării și valorificării potențialului biotehnologic al tulpinilor fungice evidențiate.

În microbiota speciilor de insecte explorate au fost identificate 19 tulpini cu potențial de a fi utilizate în controlul biologic al dăunătorilor. Există date privind utilizarea speciei *Aspergillus flavipes* în controlul biologic al insectei *Pauropsylla depressa* Crawford (Homoptera, *Psyllidae*), dăunător al speciilor de ficus. Conform unor studii extractul din *Penicillium brevicompactum* poate bloca in-vivo hormonii juvenili la *Oncopeltus fasciatus* Dallas, (Hemiptera, Lygaeidae) fiind cauza unor dereglări metabolice (Castillo 1999). Astfel de tulpini ca L1/4 (*Aspergillus flavipes*) și C (*Penicillium brevicompactum*) necesită investigații suplimentare privind potențialul de a fi utilizate în controlul biologic al insectelor.

În microbiota indivizilor din speciile *Sitona lineatus* și *Hypera postica* au fost evidenţiate micromicetele *Beauveria bassiana* (tulpina L1/6, B, N), *Beauveria* sp. (Cg7, Cg10, Cg11, Cg12, Cg13, Hp1Cg, Hp2Cg, Hp3Cg, Hp4Cg, Hp6Cg, Hp8Cg, Hp11Cg), *Isaria fumosorosea* (L5/6) și *Isaria* sp. (Hp5Cg), cu potenţial în controlul biologic al diferitor specii de insecte dăunătoare. *Beauveria bassiana* este o micromicetă entomopatogenă cu un spectru larg de gazde. Studiile ulterioare trebuie să vizeze virulenţa tulpinilor izolate și acţiunea lor asupra speciilor *S. lineatus*, *H. postica*, *P. apricans* și asupra artropodelor nevizate. Necesită investigații ulterioare influenţa tulpinii asupra altor insecte din genul *Sitona*, ţinând cont de faptul că alături de *Sitona lineatus,* în Republica Moldova au fost identificaţi încă 18 reprezentanţi ai acestui gen (Poiras 2006). De asemenea, un interes deosebit prezintă tulpina L5/6 identificată ca *Isaria fumosorosea,* deoarece nu au fost raportate efecte negative ale acesteia asupra albinelor şi artropodelor nevizate.

3.4 Concluzii la capitolul 3

1. În rezultatul cercetărilor efectuate, utilizând metode clasice și molecular-genetice de identificare, în microflora speciilor *Sitona lineatus* L., *Hypera postica* (Gyll.) și *Protapion apricans* (Hbst.) au fost identificate 55 tulpini fungice ce aparţin la 23 specii şi 3 încrengături (Ascomycota, Basidiomycota şi Mucormycota).
2. Pentru prima dată, în Republica Moldova, în microflora dăunătorilor *Sitona lineatus* L. și *Hypera postica* (Gyll.) au fost identificate speciile *Beauveria bassiana* (L1/6, B, N)

Beauveria spp. (Cg7, Cg10, Cg11, Cg12, Cg13, Hp1Cg, Hp2Cg, Hp3Cg, Hp4Cg, Hp5Cg, Hp6Cg, Hp8Cg, Hp11Cg), *Isaria fumosorosea* (L5/6) și *Isaria* sp. (Hp5Cg) cu potenţial în controlul biologic al acestor specii de insecte. Tulpinile L1/4 (*Aspergillus flavipes*) și C (*Penicillium brevicompactum*) necesită investigaţii detaliate privind potenţialul insecticid.

3. În baza rezultatelor obţinute, speciile *Sitona lineatus* L., *Hypera postica* (Gyll.) și *Protapion apricans* (Hbst.) au fost atestate ca potenţiali vectori ai ciupercilor fitopatogene: *Penicillium polonicum, Fusarium equiseti, F. oxysporum, F. tricinctum, Trichothecium roseum, Sarocladium strictum, Alternaria alternata* și *Rhizopus stolonifer*.
4. Pentru prima dată au fost evidenţiate speciile fungice din microflora dăunătorului *Protapion apricans*.

4. ELABORAREA PROCEDEULUI DE PRODUCERE ȘI APLICARE A AGENȚILOR FUNGICI DE CONTROL BIOLOGIC AL COLEOPTERELOR CURCULIONOIDE

Elaborarea și implementarea unor strategii alternative de combatere a insectelor dăunătoare este una din problemele stringente ale agriculturii contemporane și una din sarcinile majore înaintate biotehnologiilor verzi. Insecticidele chimice sunt aplicate extensiv, fiind cauza unor probleme semnificative ce țin de sănătatea umană, poluarea mediului ambiant și reducerea biodiversității. Investigarea tulpinilor autohtone de micromicete entomopatogene în calitate de agenți de control biologic reprezintă o necesitate, în contextul dezvoltării sustenabile a agriculturii în Republica Moldova. Lista produselor de uz fitosanitar înregistrate in Republica Moldova include un singur preparat entomopatogen omologat în baza bacteriei *Bacillus thuringiensis*, Foray 48 B pentru controlul lepidopterelor dăunătoare și câteva produse autohtone de origine virală (VIRIN-KS, Virin-ABB-3, VIRIN-CP ș.a.) (Registrul de Stat al Produselor de Uz Fitosanitar și Fertilizanților). Chiar dacă se observă o tendință pozitivă, agenții microbieni de control biologic rămân o resursă insuficient utilizată pentru gestionarea dăunătorilor în Republica Moldova. Tulpinile autohtone de microorganisme, obținute din mediul natural, cu proprietăți fiziologice și biochimice avantajoase, pot reduce semnificativ costurile pentru obținerea bioinsecticidelor și asigura micșorarea gradului de poluare al mediului ambiant. De asemenea, utilizarea tulpinilor autohtone va contribui la reducerea riscurilor ecologice, asociate cu introducerea unor organisme străine în ecosisteme și dereglarea funcționării acestora. Din punct de vedere al costurilor, producția locală de biopesticide este semnificativ mai eficientă pentru fermieri, decât importul de preparate, deoarece prețurile de pe piața internațională depășesc capacitatea de cumpărare a acestora.

În scopul dezvoltării agenților de control în baza tulpinilor autohtone de microorganisme entomopatogene a fost elaborată și aplicată următoarea strategie experimentală (figura 4.1).

O etapă semnificativă care reprezintă baza oricărui program de control biologic al dăunătorilor pe bază de microorganisme este studiul aprofundat al agroecosistemului, biocenozei și biotopului, obținerea datelor cu privire fenologia dăunătorului, densitatea numerică maximă, pragul economic de dăunare, relațiilor trofice existente, potențialilor agenți naturali de control biologic, scopul fiind de a construi sinergii dintre biodiversitatea ecosistemului și tulpina de microorganisme aplicată în calitate de agent de control biologic (figura 4.1).

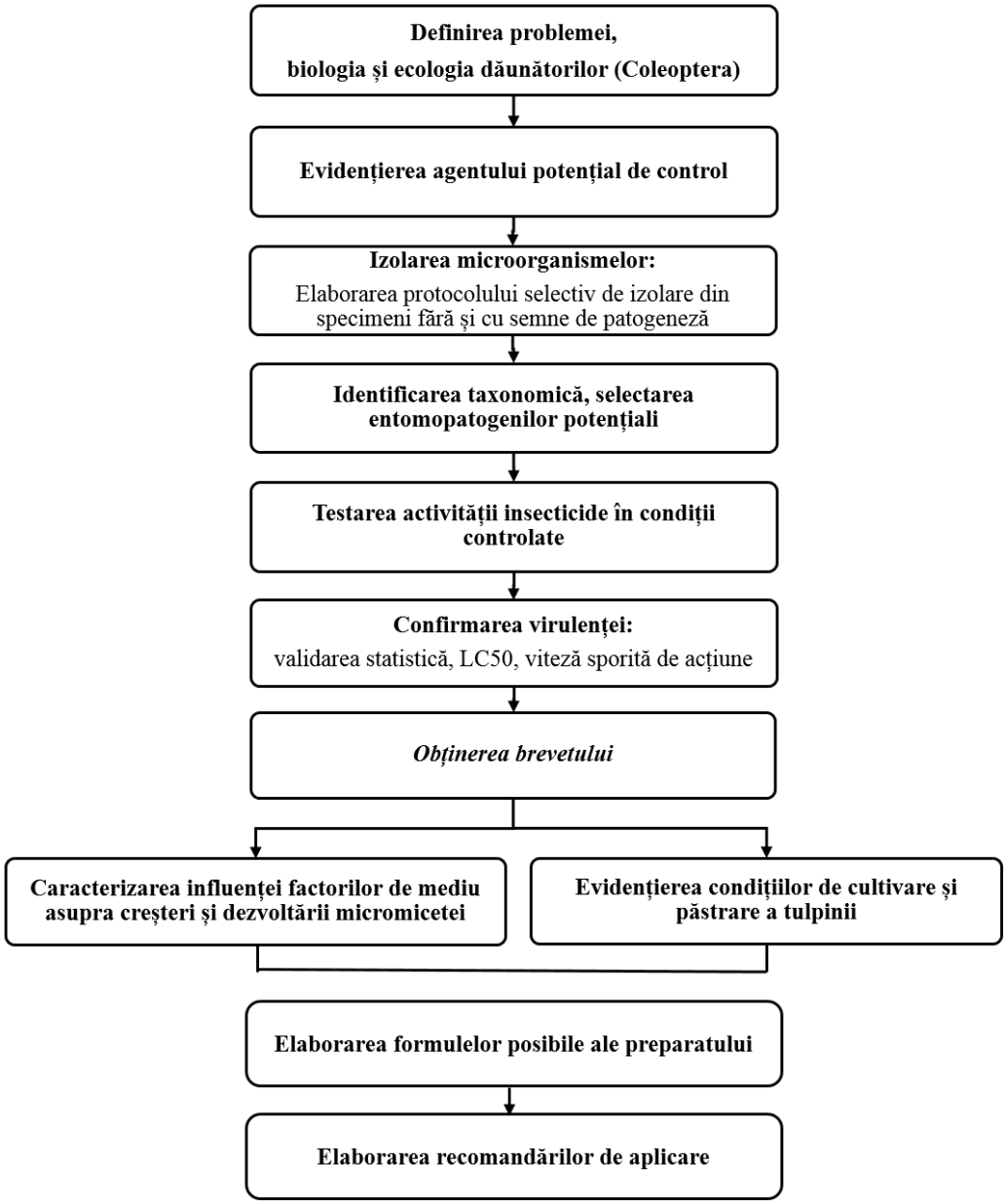


Fig. 4.1. Strategia experimentală

După definirea problemei, identificarea grupului de organisme care pot fi utilizate cu succes în controlul biologic al dăunătorului, urmează etapa de obținere a agentului de control. Metodele de izolare a tulpinilor fungice trebuie să vizeze nu doar izolarea selectivă a entomopatogenilor, cât și caracterizarea complexelor de ciuperci din microflora fungică. Rezultatele obținute în cadrul cercetărilor din prezenta lucrare au demonstrat că o tulpină cu virulență maximă poate fi izolată, în urma evidențierii spectrului deplin de fungi prezenți în microflora dăunătorului. Studiile recente au demonstrat că identificarea molecular-genetică este extrem de importantă pentru înțelegerea și valorificarea interacțiunilor gazdă-parazit. Multe specii de fungi prezintă caracteristici criptice, identificarea clasică nefiind capabilă de a face diferența

dintre acestea (Vega et al. 2012).

De la primele studii cu privire la izolarea și caracterizarea agenților fungici de control biologic până în prezent, în literatura de specialitate pot fi găsite date cu privire la izolarea tulpinilor de fungi entomopatogeni, identificarea acestora, informații cu privire la efectul insecticid, cerințele nutritive ale tulpinilor, persistența, eficacitatea în condiții de câmp. Însă puține dintre aceste tulpini au fost dezvoltate într-un preparat entomopatogen. Puține dintre studiile realizate la moment au o abordare holistică, multidisciplinară, orientată spre dezvoltarea unui agent de control biologic care poate fi aplicat cu succes. Scopul cercetărilor expuse în prezenta lucrare este de a depăși aceste impedimente, de a cerceta toate aspectele cheie în elaborarea unui preparat entomopatogen care și-ar păstra proprietățile insecticide în condiții de câmp.

Pentru elaborarea preparatelor este necesar de a selecta tulpinile de micromicete potențial entomopatogene, testarea preliminară a susceptibilității dăunătorilor țintă la infecția cu aceste tulpini și identificarea tulpinilor cu activitate insecticidă maximă. Tulpinile selectate sunt caracterizate morfo-cultural, genotipic, fiziologic și biochimic, este determinată virulența acestora. Evaluarea activității insecticide în condiții de laborator permite de a determina momentul de aplicare, numărul de aplicări și doza necesară de a fi aplicată în condiții de câmp pentru atingerea unui rezultat maxim. Astfel în rezultatul acestei etape tulpinile sunt descrise și este caracterizat spectrul potențial de gazde.

Una dintre problemele majore ale aplicării entomopatogenilor este atenuarea virulenței drept rezultat al cultivării succesive in vitro (Butt, Goettel 2000, Butt et al. 2006). Astfel o etapă importantă în obținerea preparatelor constă în elaborarea metodelor de cultivare, păstrare, multiplicare care să asigure menținerea proprietăților biotehnologice valoroase în timp.

De asemenea este important de a menține viabilitatea sporilor pe parcursul etapei de formulare, păstrare și aplicare a produsului final (Seaman 1990, Boyetchko et al. 1998, Lopez-Perez et al. 2015, Muñiz-Paredes et al. 2017, Lee et al. 2019). La etapele inițiale de dezvoltare a preparatelor entomopatogene atenție maximă în schema tehnologică se acorda etapelor de izolare, identificare și caracterizare a entomopatogenilor din perspectiva producerii în masă a sporilor capabili de infecție. În dependență de tipul de spori (blastospori sau conidii) care posedă infectivitate maximă se alege tipul de cultivare (la suprafață) sau în profunzime.

O dată ce tulpina este selectată și caracterizată, în baza ei este obținut un brevet de invenție (Kiewnick et al. 2007). Datorită avansării științei în înțelegerea mecanismelor implicate și responsabile de activitatea microorganismelor în calitate de agenți de control biologic, la momentul actual selectarea producentului se bazează nu doar pe virulență, dar și pe anume trăsături care asigură supraviețuirea și infectivitatea în condiții de câmp (Kiewnick et al. 2007, Lopez-Perez

et al. 2015, Muñiz-Paredes et al. 2017, Lee et al. 2019). Caracterizarea tulpinilor urmează a fi realizată din perspectiva mediului în care acestea vor fi introduse, fiind selectate acele tulpini care pot supraviețui factorilor abiotici de stres și pot iniția procesul de patogeneză în condițiile respective. Selectarea producentului cu luarea în calcul a acestor particularități sporește semnificativ succesul etapelor ulterioare și simplifică procedura de formulare, astfel scăzând din costul produsului. Această etapă permite de a identifica factorii care pot limita eficiența agentului de control biologic în condiții de câmp și de a selecta aditivii necesari de a fi adăugați la sporii fungici pentru a asigura stabilitatea produsului, protecția producentului, sporind eficacitatea produsului (Kiewnick et al. 2007, Lopez-Perez et al. 2015, Muñiz-Paredes et al. 2017, Lee et al. 2019). Astfel biotehnologia nu doar oferă oportunitatea de a aplica entomopatogenii în calitate de agenți de control biologic, dar de asemenea, oferă posibilități valoroase de a demonstra mecanismele de patogenitate, de a anticipa comportamentul agentului de control biologic în condiții de câmp deschis și de a oferi strategii de control a dăunătorilor eficiente și viabile.

Pentru a elabora tehnologia de producere și aplicare a preparatelor entomopatogene naturale pe bază de tulpini fungice autohtone, destinate controlului biologic al coleopterelor curculionoide, au fost parcurse următoarele etape:

- a fost estimată susceptibilitatea insectelor țintă la infecția cu tulpinile fungice selectate;
- a fost evaluată activitatea insecticidă a tulpinii de fungi care a demonstrat proprietăți insecticide superioare;
- tulpina de fungi cu activitate insecticidă maximă a fost depusă în Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene a Institutului de Microbiologie şi Biotehnologie în baza ei fiind obținut brevet de invenție (Anexele 1, 2 și 3);
- a fost evidențiată influența temperaturii asupra creșterii şi dezvoltării tulpinii de fungi inclusiv influența asupra creșterii vegetative, influența temperaturii asupra sporulării și viabilității conidiilor după păstrare îndelungată;
- a fost caracterizată influența radiațiilor UV, pH-ului mediului, salinității şi presiunii osmotice a mediului ambiant asupra creșterii și dezvoltării tulpinii de fungi selectate, inclusiv după păstrare îndelungată;
- a fost elaborată schema care sintetizează procedeul de producere și aplicare a agenților fungici de control biologic al coleopterelor curculionoide;
- au fost elaborate recomandări de aplicare a tulpinii de fungi în scopul controlului biologic al dăunătorilor.

4.1 Estimarea susceptibilității insectelor țintă la infecția cu tulpinile fungice potențial entomopatogene

În scopul evaluării preliminare a patogenității tulpinilor fungice izolate, identificate ca *Beauveria* spp. și *Isaria fumosorosea* au fost pregătite suspensii cu concentrația de ~10^9 spori/ml din cultura de 7 zile. A fost evaluată viabilitatea conidiilor și cantitatea de inocul aplicată a fost ajustată astfel încât cantitatea de conidii capabile de a infecta gazda să fie aceeași. Datele privind mortalitatea înregistrată la 7-a zi sunt prezentate în tabelul 4.1.

Tabelul 4.1. Evaluarea preliminară a activității insecticide a tulpinilor fungice

Nr. d/o	Tulpina fungică testată	Viabilitatea, %	Cantitatea de inocul aplicată, ml	Mortalitatea (Abbot, 1925) la a 7-a zi de la tratament, %		
				S. lineatus	***H. postica***	***P. apricans***
1.	*B. bassiana*, L1/6	94,0±4,50	1,064	100	70	40
2.	*B. bassiana*, B	90,0±3,97	1,111	70	30	0
3.	*B. bassiana*, N	86,0±1,50	1,163	60	10	10
4.	*Beauveria sp.*, Cg7	90,0±3,12	1,111	70	50	0
5.	*Beauveria sp.*, Cg10	87,0±2,00	1,149	80	30	0
6.	*Beauveria sp.*, Cg11	82,0±1,80	1,220	60	30	0
7.	*Beauveria sp.*, Cg12	87,0±3,12	1,149	90	50	20
8.	*Beauveria sp.*, Cg13	93,0±2,18	1,075	50	20	0
9.	*I. fumosorosea*, L5/6	91,5±4,82	1,093	40	0	0
10.	Martor, $H_2O_{dist.\ sterilă}$		1	0	0	0

Specia *Sitona lineatus* a fost susceptibilă la infecția cu toate tulpinile fungice testate, specia *Hypera postica* a fost susceptibilă la infecția doar cu tulpinile fungice din genul *Beauveria*. În cazul speciei *Protapion apricans* au fost înregistrate cele mai mici valori ale mortalității, fiind capabile de a cauza mortalitate doar 3 din cele 9 tulpini entomopatogene investigate. În rezultatul estimării susceptibilității insectelor țintă la infecția cu tulpinile fungice potențial entomopatogene pentru determinarea activității insecticide a fost selectată tulpina L1/6 care a prezentat valori sporite ale mortalității.

4.2 Evaluarea activității insecticide a tulpinii *Beauveria bassiana* L1/6 (CNMN-FE-01)

Cuantificarea inoculului a fost realizată folosind Camera Goreaev. Pentru tulpina L1/6 concentrația de spori recoltată a constituit 1,02 ×10^7 conidii/ml. Deviația standard a constituit 3,962 ceea ce reprezintă 9,72 % din valoarea medie a numărului de spori în 16 pătrate mici. Per cutie Petri au fost aplicate câte 1 ml suspensie spori. Au fost folosite cutii Petri cu diametrul de 90 mm, suprafața fiind respectiv:

$$S = \frac{\pi \times d^2}{4} = \frac{3{,}14 \times 90^2}{4} = 6361{,}7 \text{ mm}^2 = 63{,}617 \text{ cm}^2$$

Evaluarea viabilității conidiilor

Au fost numărate conidiile care au germinat per număr total de 200 de conidii. Experiența a fost efectuată în trei repetiții.

$$R = \frac{(183+192+195)}{200 \times 3} \times 100\% = 95\%$$

Deviația standard calculată a constituit 6,245 ceea ce reprezintă 3,287 % din valoarea medie a numărului de spori germinați. Viabilitatea sporilor a constituit 95% după păstrare în frigider timp de 2 ani la temperatura de 4°C. În cazul păstrării tulpinii în glicerol de 10% la temperatura de -80 °C viabilitatea conidiilor a constituit 96%.

Cantitatea de conidii viabile în inocul

$$C = 1{,}02 \times 10^7 \text{ spori/ml} \times 0{,}95 = 0{,}969 \times 10^7 \text{ spori/ml}$$

Concentrația de spori per unitate de suprafață la concentrația maximală testată este de:

$$C = \frac{C}{S} = \frac{0{,}969 \times 10^7}{63{,}617} = 1{,}523 \times 10^5 \text{spori/ cm}^2$$

Activitatea insecticidă a tulpinii *Beauveria bassiana* L1/6 a fost testată pe insectele adulte sănătoase provenite din populația naturală a speciilor *Sitona lineatus* și *Hypera postica*. Insectele au fost lăsate să se deplaseze pe suprafața hârtiei de filtru pentru a intra în contact cu sporii ciupercii (figura 4.2). După inoculare, insectele au fost incubate câte 10 în cuști cu lucernă proaspătă în condiții controlate, la temperatura camerei de 25±1 ºC și durata zilei de 14h (figura 4.3).

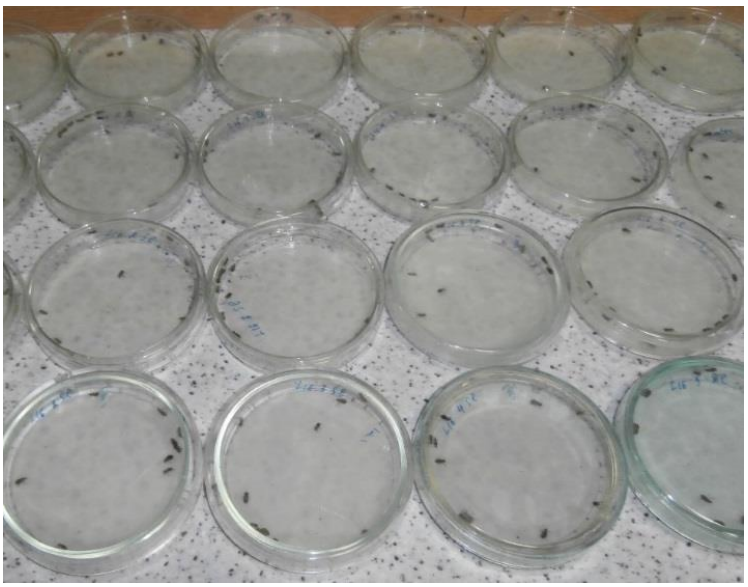


Fig. 4.2. Inocularea speciilor de dăunători cu suspensii conidiale din cultura tulpinii *B. bassiana* L1/6



Fig. 4.3. Transferarea insectelor în cuști cu lucernă proaspătă

Fiecare 24 de ore au fost înregistrate datele cu privire la numărul de exemplare moarte. Au fost observate schimbări în comportamentul trofic al insectelor acestea devenind pasive, începând cu ziua a doua de la inoculare, a scăzut numărul de crestături specifice pe frunzele de lucernă (figura 4.4).



a **b**

Fig. 4.4. Verificarea mortalității insectelor după inocularea cu tulpinile fungice
a – verificarea mortalității, **b –** înregistrarea datelor

Cadavrele insectelor au fost îndepărtate înainte ca micromiceta să sporuleze pentru a preveni transmiterea orizontală (figura 4.5). Ulterior cuștile au fost spălate, sterilizate, iar lucerna a fost schimbată.



a **b**

Fig. 4.5. Verificarea mortalității și transferarea indivizilor
a – exemplare moarte fixate la baza frunzelor, **b –** transferarea indivizilor în eprubete

Faptul că mortalitatea insectelor a fost cauzată de infecția fungică a fost confirmat prin apariția miceliului aerian caracteristic pe cadavrele plasate în condiții de umiditate sporită și lipsa dezvoltării acestuia în proba martor (figura 4.6).



a **b**

Fig. 4.6. Insecte cu miceliu aerian dezvoltat la exterior
a –specimenii cu sporulare externă**, b** – *Sitona lineatus*

Cea mai efectivă dintre concentrațiile testate ale tulpinii L1/6, pentru *Sitona lineatus* L., a fost $0{,}969\times10^6$ spori/ml cauzând o mortalitate de 100% la a 5-a zi de la tratament (figura 4.7)

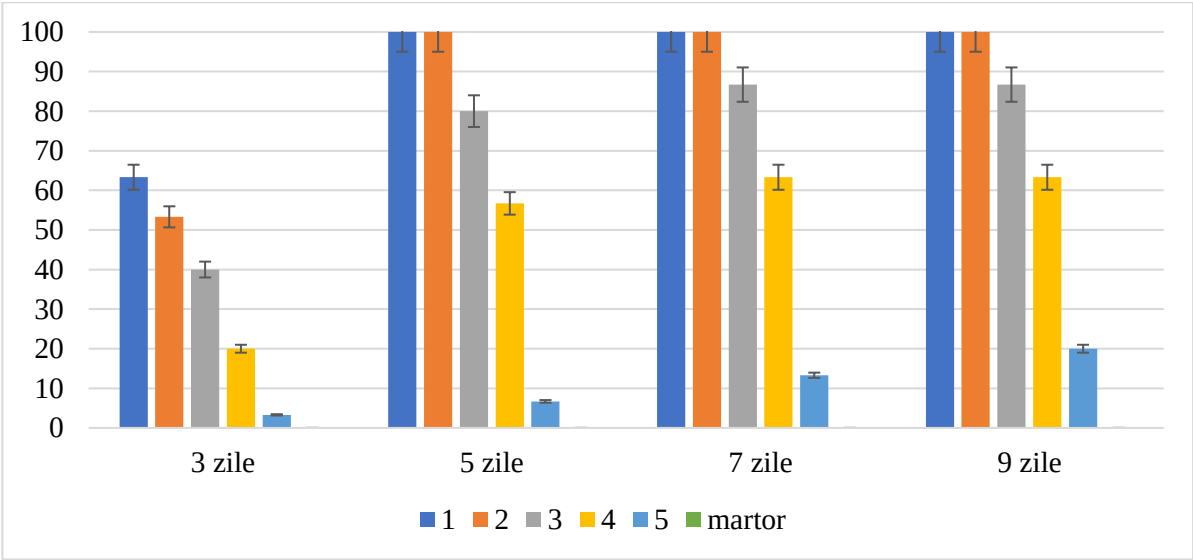


Fig. 4.7. Rata medie a mortalității indivizilor din specia *S. lineatus* după aplicarea suspensiei din conidii ale tulpinii L1/6

1 - $0{,}969\times10^7$ conidii/ml, **2** - $0{,}969\times10^6$ conidii/ml, **3** - $0{,}969\times10^5$ conidii/ml, **4** - $0{,}969\times10^4$ conidii/ml, **5** - $0{,}969\times10^4$ conidii/ml, **martor** – apă distilată sterilă

Activitatea biologică a tulpinii exprimată în valorile LC_{50}, calculată după formula lui Spearman-Karber, a constituit $1{,}127 \times 10^4$ spori/ml. Astfel, o reducere cu 50% a efectivului dăunătorului *Sitona lineatus* L., poate fi obținută la aplicarea culturii fungice *Beauveria bassiana* L1/6 în concentrație de $1{,}127 \times 10^4$ spori/ml, în apă distilată.

Datele denotă că tulpina de fungi propusă *Beauveria bassiana* L1/6 posedă o activitate insecticidă mai pronunțată asupra speciei *S. lineatus* comparativ cu datele din literatura de specialitate și poate fi utilizată în calitate de agent biologic în controlul efectivului lor numeric (tabelul 4.2).

Tabelul 4.2. Rata mortalității dăunătorului *Sitona lineatus* L. după aplicarea suspensiei de spori din cultura fungică a tulpinilor de *Beauveria bassiana*

Nr.	Tulpina	Cantitatea sporilor per individ	Mortalitatea, nr. exemplare moarte/nr. total	Mortalitatea, %
1.	*Beauveria bassiana* L1/6	$0{,}969\times10^5$	30/30	100
2.	*Beauveria bassiana* 238 (Riedel, 1998)	1×10^7	17/20	85

Tulpina este ecologic inofensivă, deoarece a fost extrasă din mediul natural, nu este patogenă pentru plante şi organismele homeoterme. În natură nu sunt introduse organisme noi, ceea ce exclude deteriorarea ecosistemelor, cum se observă în cazul utilizării altor patogeni şi preparate. Tulpina *Beauveria bassiana* L1/6 a fost depozitată în colecția Națională de Microorganisme Nepatogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie sub numărul CNMN-FE-01 și în baza ei a fost obținut brevetul de invenție nr. MD 4560 (Moldovan, Munteanu-Molotievskiy, Toderaş 2018, Anexele 1, 2 și 3).

Izolarea tulpinilor locale de *Beauveria bassiana* cu activitate insecticidă sporită, și o viteză sporită de acțiune reprezintă o etapă importantă în dezvoltarea programelor de control biologic bazate de preparate entomopatogene fungice în Republica Moldova.

Din punct de vedere al costurilor, producția locală de biopesticide este mai avantajoasă pentru fermieri. Ulterior se cere de a evalua virulența tulpinilor izolate asupra unei game mai largi de artropode, în special cele nevizate. Pentru a evita epuizarea resurselor naturale este necesar de a investiga aplicarea concomitentă a mai multor metode și agenți de control al dăunătorilor ceea ce va a oferi strategii de management integrat viabile și eficiente.

4.3 Proprietățile fiziologice ale tulpinii de fungi *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01

Majoritatea micromicetelor pot fi cultivate cu succes în condiții de laborator. Cercetările actuale ale savanților sunt orientate spre selectarea tulpinilor fungice capabile de a crește pe medii nutritive accesibile producând totodată o cantitate ridicată de spori. De asemenea sunt realizate investigații științifice care au drept scop caracterizarea metaboliților produși de tulpinile fungice pentru a identifica acele substanțe care joacă un rol important în procesul de patogeneză. Însă aceste date nu sunt cele mai importante pentru elaborarea preparatelor entomopatogene. Pentru a produce biopreparate eficiente în baza tulpinilor fungice sunt necesare date privind răspunsul tulpinilor fungice la acțiunea diferitor factori fizici și chimici. Formarea sporilor, germinarea, viabilitatea acestora, creșterea vegetativă a tulpinilor fungice în condiții de câmp sunt afectate de temperatură, umiditate, radiațiile cu diferite lungimi de undă, salinitate ș.a. (Jaronski 2010, Vega et al. 2012). Cercetările din ultimii ani au scos în evidență faptul că răspunsul tulpinilor fungice la acțiunea factorilor de mediu depinde de specie, ecotip, și au elucidat faptul că activitatea insecticidă depinde de anotimp. Este cunoscut faptul că factorii fizici au o influență semnificativă asupra creșterii și dezvoltării tulpinilor fungice în condițiile naturale, totuși puține dintre studiile realizate în ultimii ani au urmărit caracterizarea particularităților fiziologice ale agenților de control biologic din această perspectivă. Majoritatea studiilor s-au axat pe selectarea mediilor nutritive optime pentru maximizarea producției de spori în condiții de laborator (Piatkowski, Krzyzewska 2007). Studierea efectului diferitor factori fizici asupra creșterii și dezvoltării tulpinilor fungice cu potențial insecticid înalt sunt esențiale pentru prognozarea eficacității tulpinii selectate în condiții de câmp, elaborarea formulei biopreparatului, elaborarea recomandărilor de aplicare și ajustarea dozelor utilizate.

4.3.1 Influența temperaturii asupra creșterii și dezvoltării tulpinii de fungi Beauveria bassiana CNMN-FE-01

Un factor limitativ care acționează asupra creșterii și dezvoltării tulpinilor este temperatura, de asemenea acest factor influențează direct capacitatea de a infecta insecta gazdă (Mietkiewski et al. 1994, Mishra, Kumar , Malik 2015, Athanassiou et al. 2017). Temperatura înaltă afectează direct sporularea iar temperaturile extreme pot inhiba complet producerea de spori (Piatkowski, Krzyzewska 2007, Mwamburi, Laing, Miller 2015). De asemenea este cunoscut faptul că la temperaturi mai mari de 45°C se induce sinteza de proteine de șoc termic (Xavier, Khachatourians 2011). Toleranța termică este un element cheie pentru stabilitatea și eficiența preparatului pe bază de condii fungice în condiții de câmp (Tong, Feng 2020).

În rezultatul analizei datelor obținute în prezenta lucrare a fost stabilit faptul că creșterea radială a tulpinii *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01 urmează un model liniar (figura 4.8).

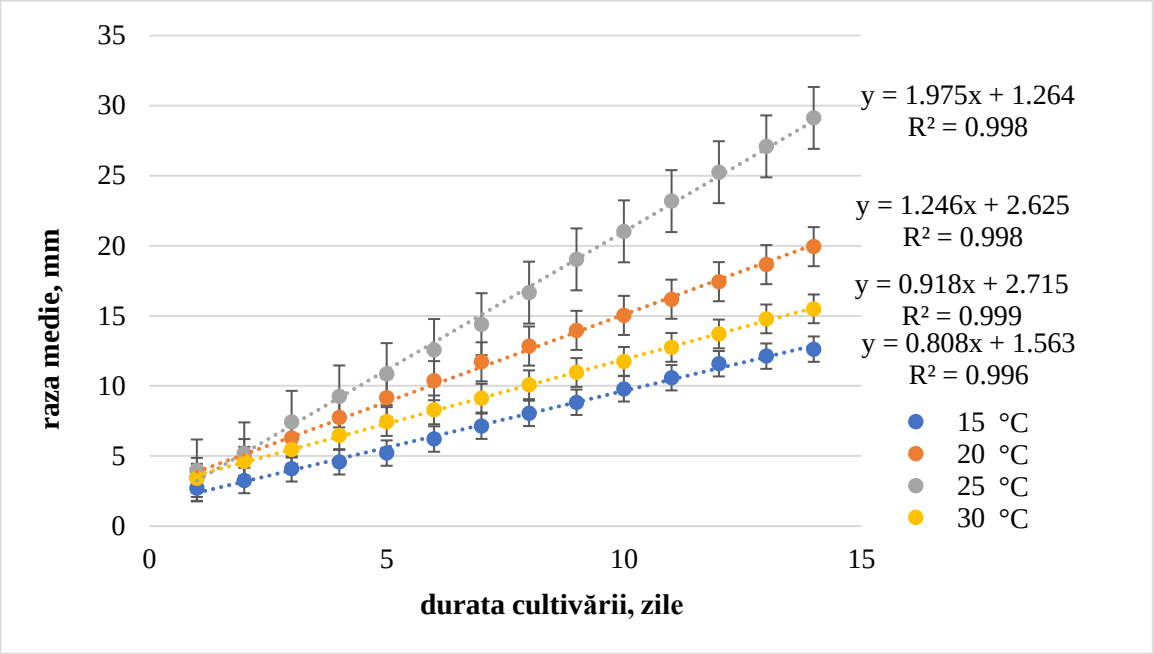


Fig. 4.8. Graficul care exprimă dependența dinamicii de creștere a coloniilor tulpinii *B. bassiana* CNMN-FE-01 (mm), de temperatură

Viteza de creștere radială a tulpinii de fungi diferă semnificativ din punct de vedere statistic la temperaturile testate ($F(3,52) = 6,073$, $p = 0,001$). Din ecuația dreptei a fost dedusă viteza medie de creștere radială care este egală cu panta dreptei. În rezultatul analizei datelor privind viteza medie de creșterea radială a fost determinat faptul că temperatura optimă de creștere este de 25 °C. Creșterea tulpinii se stopează la temperatura de 35°C (figura 4.9).

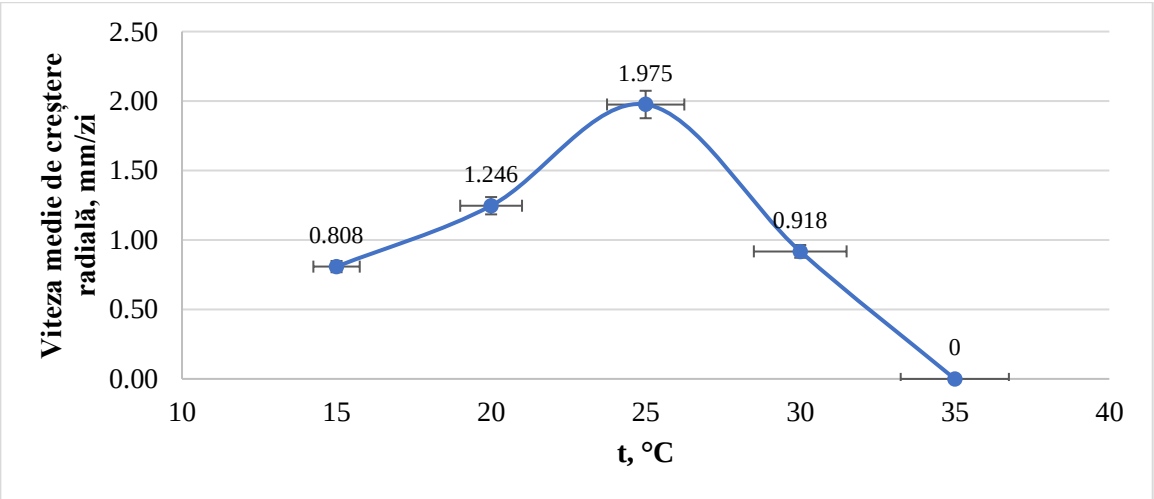


Fig. 4.9. Viteza medie de creștere radială a tulpinii de fungi *B. bassiana* CNMN-FE-01 pe mediul nutritiv PDA la diferite temperaturi, mm/zi

Studiile anterioare privind temperatura optimă pentru creșterea vegetativă a entomopatogenilor fungi, au constatat faptul că aceasta variază semnificativ între diferite specii și în cadrul speciilor. Conform datelor din literatura de specialitate pentru mai multe specii de fungi, inclusiv din genurile *Beauveria*, *Metarhizium* și *Paecilomyces* temperatura optimă pentru creștere și dezvoltare este situată în intervalul 24 și 27°C (Hallsworth, Naresh 1999). Fiind studiate 65 tulpini de *B. bassiana* a fost constatat că în majoritatea cazurilor temperatura optimă de creștere a variat în limitele 25- 28 °C. Unele tulpini au avut temperatura optimă 20°C și 30°C (Fargues et al. 1997). Ulterior fiind studiate mai multe tulpini de *B. bassiana* și *M. anisopliae* a fost evidențiată o viteză de creștere lineară la temperatura de 30 ºC. Din cele 98 tulpini cercetate doar 3 au fost capabile de a crește la 35 ºC (Rodriguez, Gerding, France 2009). Există date privind izolarea tulpinilor de *M. anisopliae* capabile de a crește bine la temperaturi egale și mai mari de 35°C (Teja, Rahman 2016).

În rezultatul analizei datelor obținute a fost stabilit că sporularea și rata de germinare sunt maxime în cazul cultivării la temperatura de 25 °C (figura 4.10, 4.11).

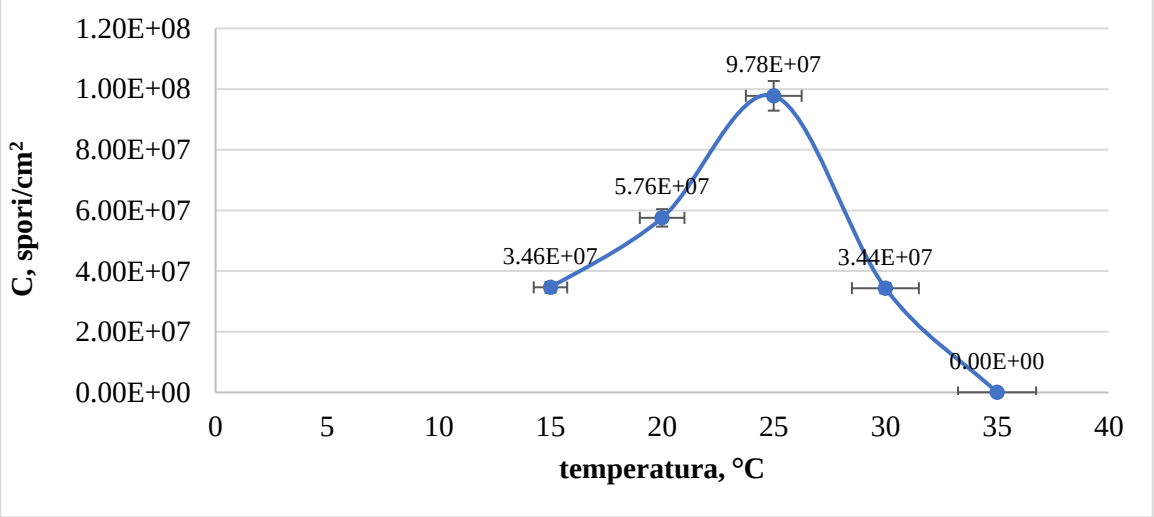


Fig. 4.10. Cantitatea de spori/cm² produse de tulpina *B. bassiana* CNMN-FE-01, funcție de temperatură

Lipsa creșterii și germinării la temperaturi apropiate de temperatura corpului uman prezintă un avantaj semnificativ pentru înregistrarea preparatelor entomopatogene fungice (Butt 2002). Totodată temperatura poate avea un efect negativ semnificativ asupra procesului de patogeneză în cazul creșterii semnificative a temperaturii la suprafața solului (Arthurs et al. 2001, Rangel et al. 2005, Vega et al. 2012).

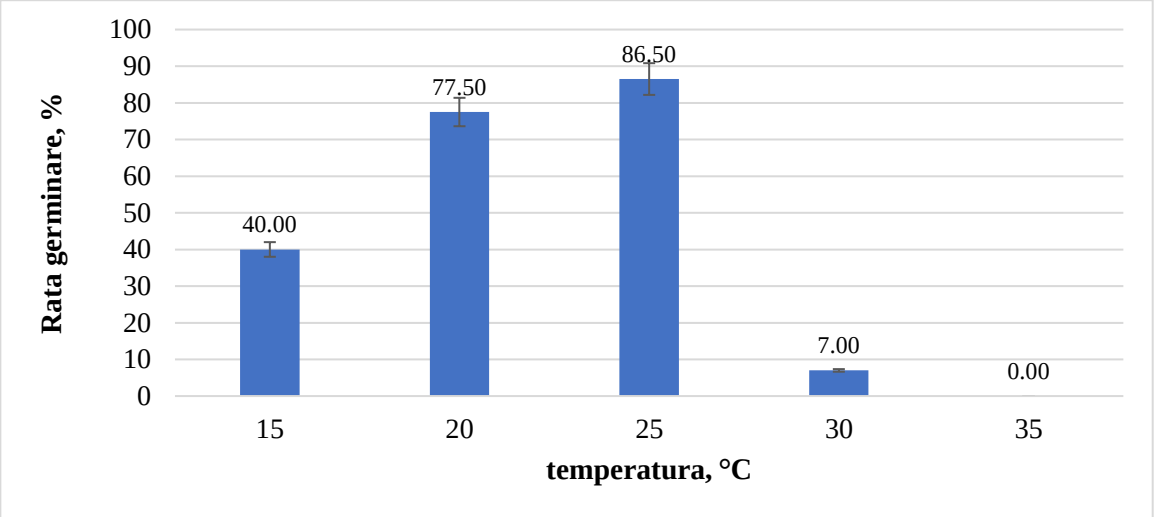


Fig. 4.11. Viabilitatea conidiilor tulpinii *B. bassiana* CNMN-FE-01 după menținerea îndelungată la diferite temperaturi

A fost stabilit că la temperatura 25 °C timp de 90 de zile, tulpina fungică își menține viabilitatea sporilor în proporție de 86 % (figura 4.11). Temperaturile mai mari de 25 °C reduc semnificativ viabilitatea sporilor. Inhibarea creșterii tulpinii *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01 la temperaturi mai mari 30°C și reducerii considerabile a viabilității sporilor după expunerea îndelungata la temperaturi mai mari de 30°C denotă necesitatea aplicării repetate ale tulpinii fungice *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01 în cazul utilizării în calitate de agent de control biologic al coleopterelor curculionoide.

4.3.2 Influența radiațiilor UV asupra creșterii și dezvoltării tulpinii de fungi Beauveria bassiana CNMN-FE-01

Este cunoscut faptul că radiațiile UV sunt un factor limitativ pentru creșterea și dezvoltarea tulpinilor fungice în condiții de câmp. Conidiile sunt extrem de sensibile la radiațiile UVB. Acestea cauzează deteriorări la nivelul acizilor nucleici, proteinelor, lipidelor și membranelor (Tevini 1993, Vega et al. 2012). Expunerea subletală la radiațiile UV poate determina alterări fiziologice sau genetice, contribuind la reducerea virulenței, prin faptul că întârzie sau inhibă germinarea (Vega et al. 2012). O expunere cu durata de 5 minute poate reduce rata de germinare a conidiilor de *B. bassiana* de la 94% la 52% (Wenzel Rodrigues et al. 2016). A fost cercetată microscopic germinarea conidiilor tulpinii *B. bassiana* CNMN-FE-01 după iradiere cu radiații UV, $\lambda = 312$ nm. (figura 4.12, 4.13).

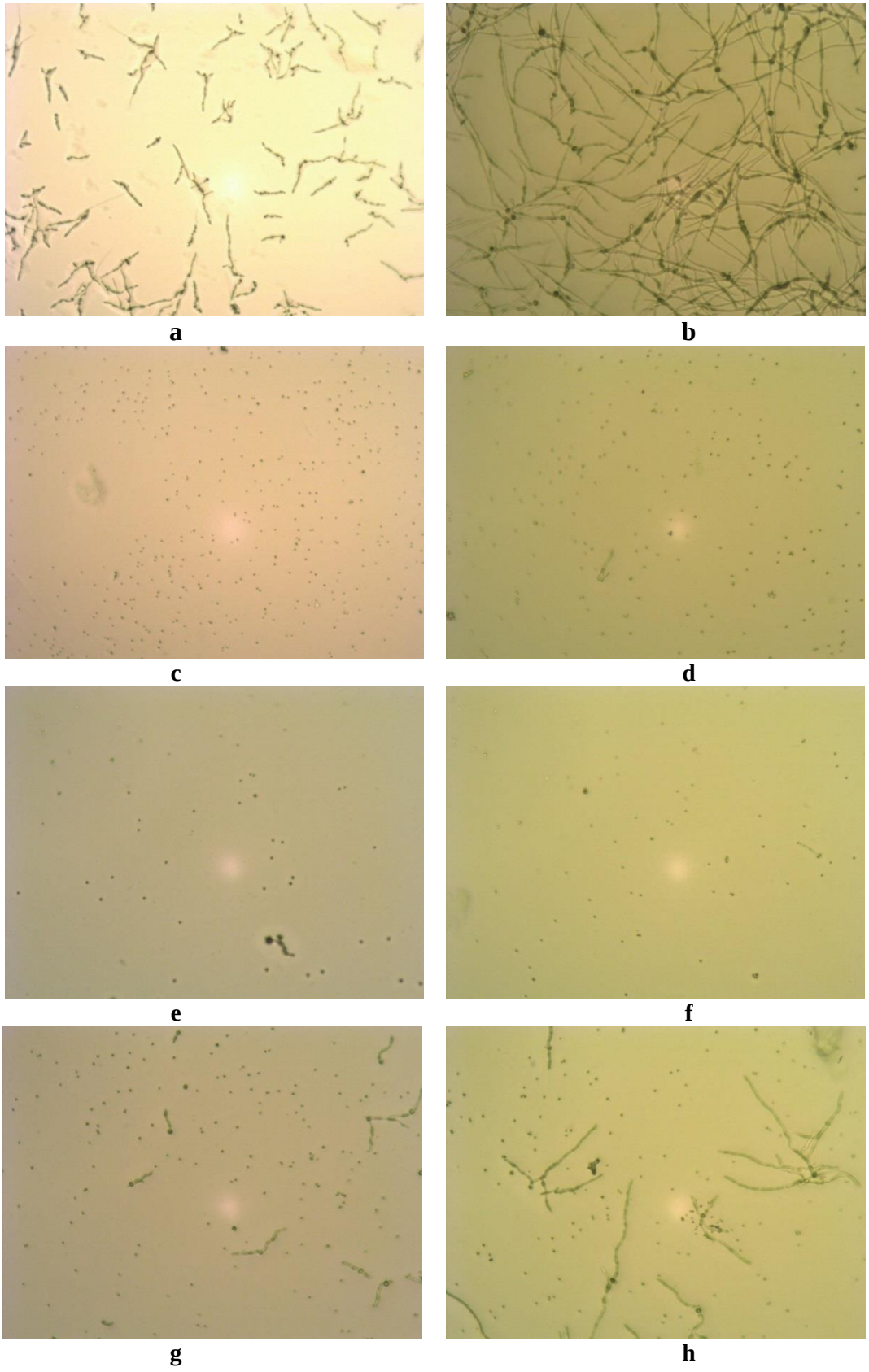
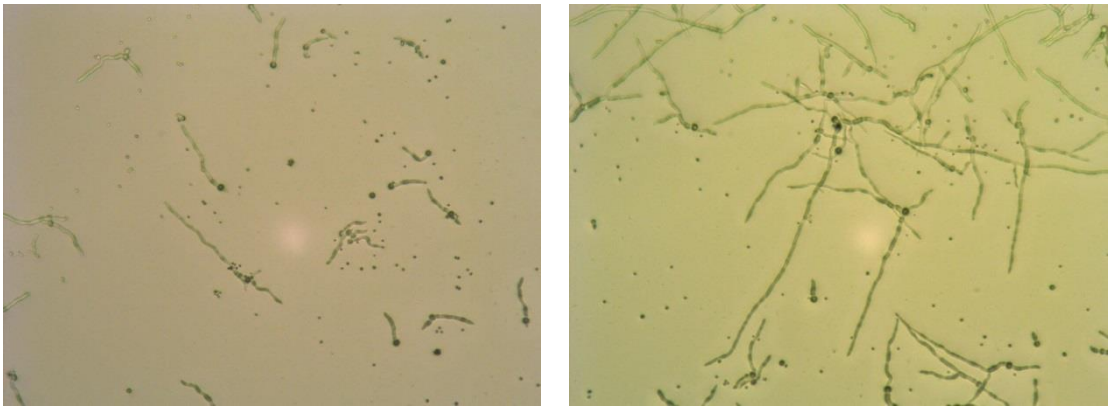


Fig. 4.12. Germinarea conidiilor după expunerea la raze UV, examinare microscopică
a. după 24 h, martor; **b.** după 30 h, martor, **c.** 24 h, 10 min expunere UV, **d**.30 h, 10 min UV, **e.** 24 h, 20 min UV, **f.** 30 h, 20 min UV, **g.** 24 h, 30 min UV, **h.** 30 h, 30 min UV



i **j**

Fig. 4.12. Germinarea conidiilor după expunerea la raze UV, examinare microscopică
i. 24 h, 40 min UV, **j.** după 30 h, 40 min UV

A fost stabilit faptul că expunerea de scurtă durată la razele UV cu λ=312 nm inhibă puternic germinarea sporilor (figura 4.13).

Prezintă interes faptul că rata de germinare crește în timp. Studiile ulterioare vor avea drept scop de a extinde durata de expunere a conidiilor la raze UV pentru a determina efectul expunerilor de durată mai lungă.

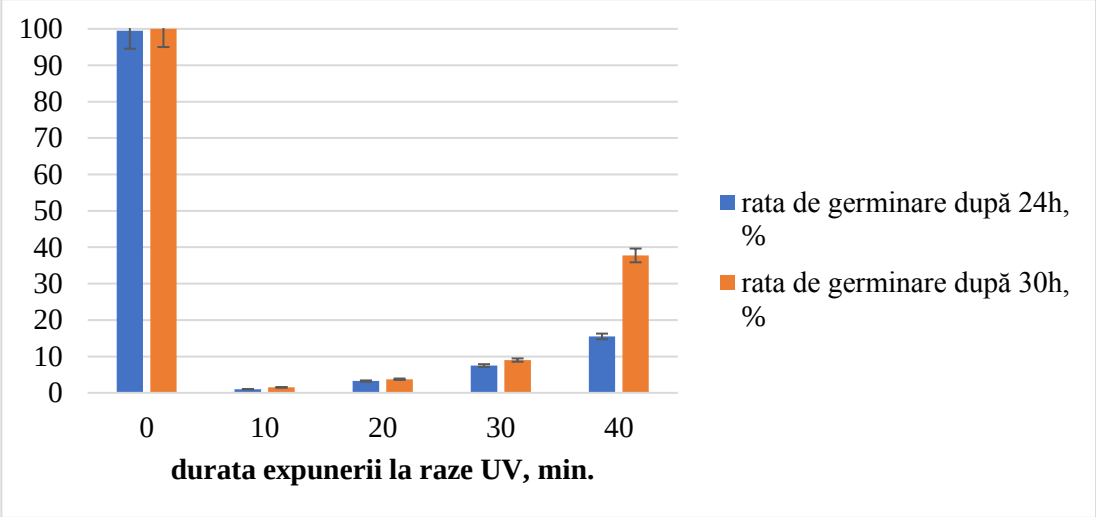


Fig. 4.13. Germinarea conidiilor tulpinii *B. bassiana* CNMN-FE-01 după iradierea cu raze UV timp de 10, 20, 30, 40 min.

Ulterior a fost cercetată viteza de creștere radială a tulpinii fungice după iradiere (figura 4.14, 4.15).

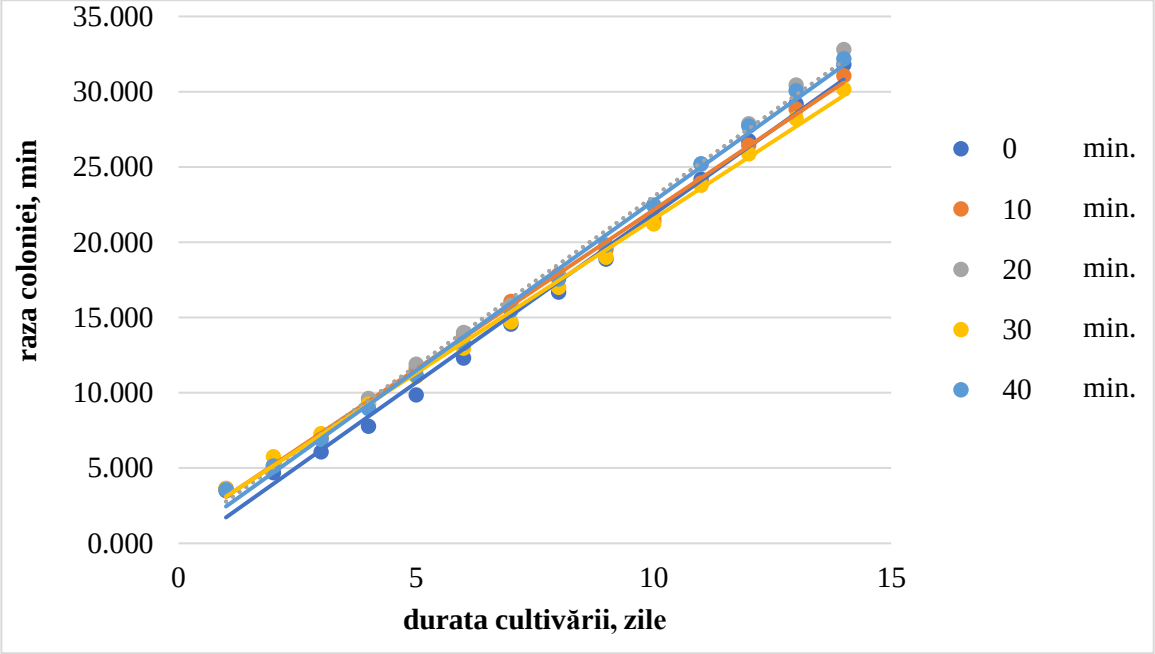


Fig. 4.14. Graficul care exprimă dependența dinamicii de creștere a coloniilor tulpinii *B. bassiana* CNMN-FE-01 (mm), de durata de expunere la UV

Viteza de creștere radială nu este afectată semnificativ de expunerea la raze UV (λ = 312 nm) ($F(4,65) = 0{,}037$, $p = 0{,}827$). Din ecuația dreptei a fost dedusă viteza medie de creștere radială care este egală cu panta dreptei (figura 4.15).

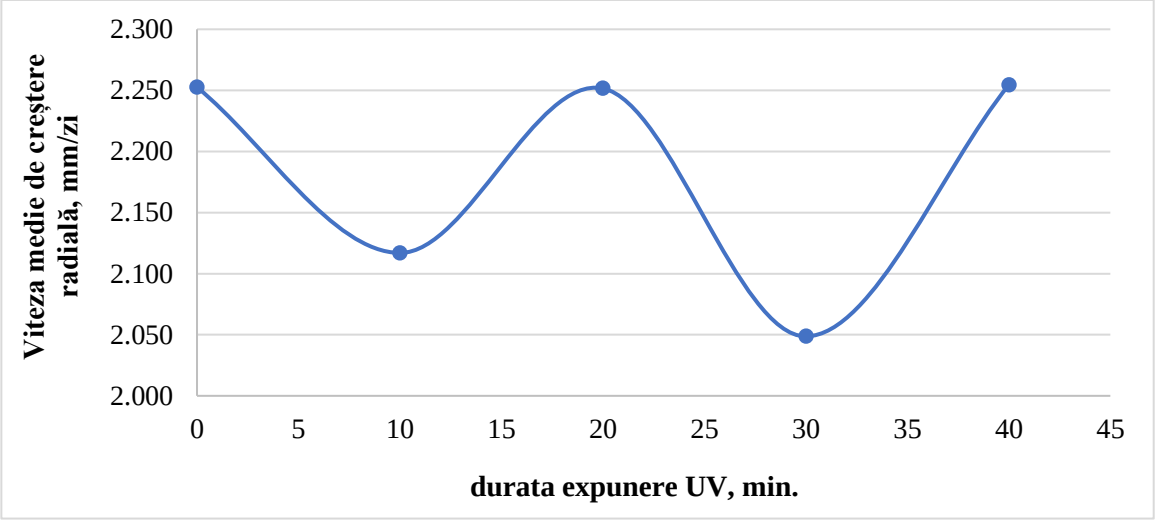


Fig. 4.15. Viteza medie de creștere radială a tulpinii de fungi *B. bassiana* CNMN-FE-01 pe mediu nutritiv PDA după expunere la UV, mm/zi

Pentru a evita efectele negative ale expunerii conidiilor la radiații UV sunt întreprinse studii ample care vizează utilizarea ecranelor de protecție (de exemplu Tinopal) sau absorbanți UVA/UVB (coloranți ca de exemplu Congo roșu). Există numeroase studii privind eficiența

ecranelor de protecție contra UV în formulele apoase sau pe bază de ulei a speciei *B. bassiana*, testate în laborator și în teren deschis (Vega et al. 2012, Posadas et al. 2012, Wenzel Rodrigues et al. 2016). Pigmenții naturali care se conțin în uleiurile vegetale de asemenea pot proteja conidiile de radiația UV (Braga et al. 2001). Stresul la nivel subletal (nutrițional, osmotic, etc.) poate stimula toleranța conidiilor față de radiațiile UV (Rangel, Anderson, Roberts 2008, Vega et al. 2012).

4.3.3 Influența pH-ului mediului ambiant asupra creșterii și dezvoltării tulpinii de fungi Beauveria bassiana CNMN-FE-01

Valoarea pH a solului este un factor abiotic important care poate influența persistența și virulența agenților de control fungici în condiții de câmp (Inglis et al. 2001). pH-ul solului poate influența germinarea conidiilor. În procesul de infecție, tulpinile entomopatogene produc proteaze și hidrolaze capabile de a degrada cuticula gazdei. Există date care confirmă faptul că acest proces poate fi afectat de valorile pH la suprafața cuticulei. Producția de toxine în cazul speciei *B. bassiana* este optimă la pH acid (Sharma, Agarwal, Rajak 1992, St. Leger, Joshi, Roberts 1998, Dias et al. 2008).

Rezultatele privind creșterea vegetativă a tulpinii fungice *B. bassiana* CNMN-FE-01 la 5 valori ale pH (5, 6, 7, 8, 9) sunt prezentate în figurile de mai jos (figura 4.16, 4.17).

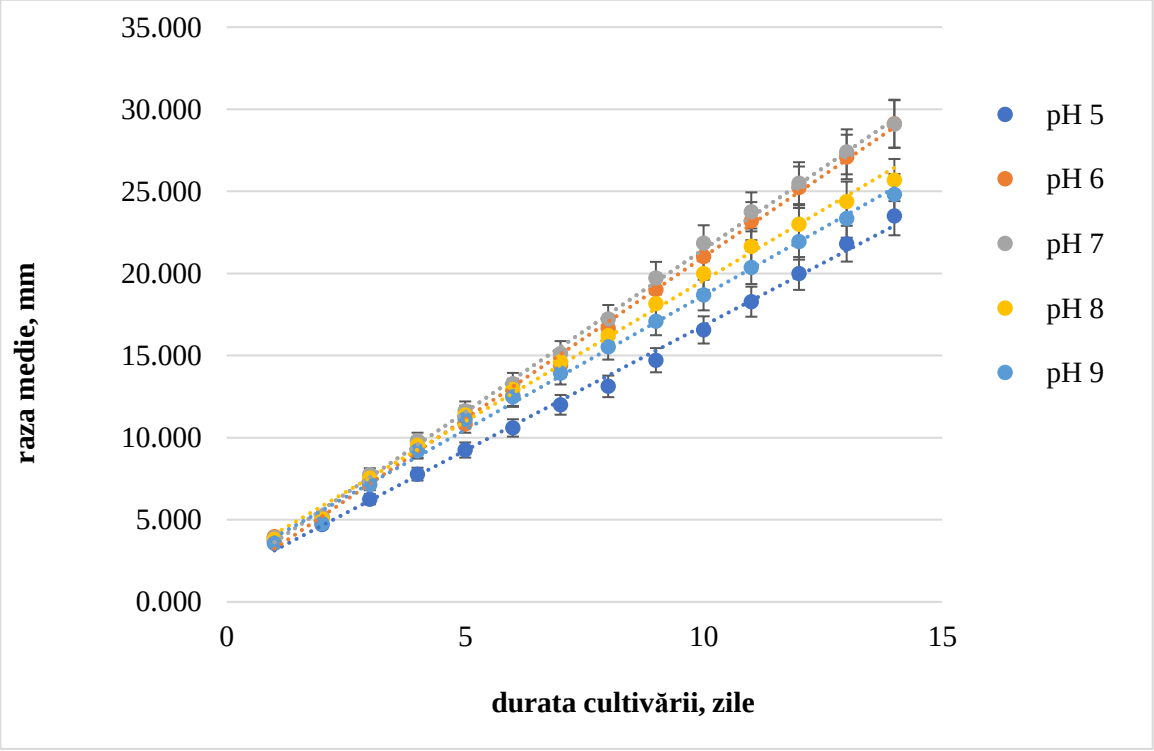


Fig. 4.16. Graficul care exprimă dependența dinamicii de creștere a coloniilor tulpinii *B. bassiana* CNMN-FE-01 (mm), de pH-ul mediului

Toleranța tulpinilor de *B. bassiana* față de diferite valori ale pH-ului a constituit obiectul investigațiilor științifice (Sharma et al. 1992, Padmavathi, Devi, Rao 2003, Karthikeyan, Shanthi, Nagasathya 2008). Fiind studiată toleranța și intervalele optime ale pH pentru 29 de tulpini de *B. bassiana* a fost stabilit faptul că un pH=3 a inhibat creșterea tuturor tulpinilor. Toate tulpinile au tolerat un pH de 5-13, unele tulpini prezentând un interval optim la larg, pe când altele mai restrâns (Padmavathi, Uma Devi, Uma Maheswara Rao 2003). În linii generale tulpinile de *Beuveria bassiana* pot crește vegetativ într-un interval larg de valori ale pH = 4-14, fiind constatate valori optime la pH = 6 - 7. Rezultate similare au fost constatate pentru tulpina *B. bassiana* CNMN-FE-01 (figura 4.17).

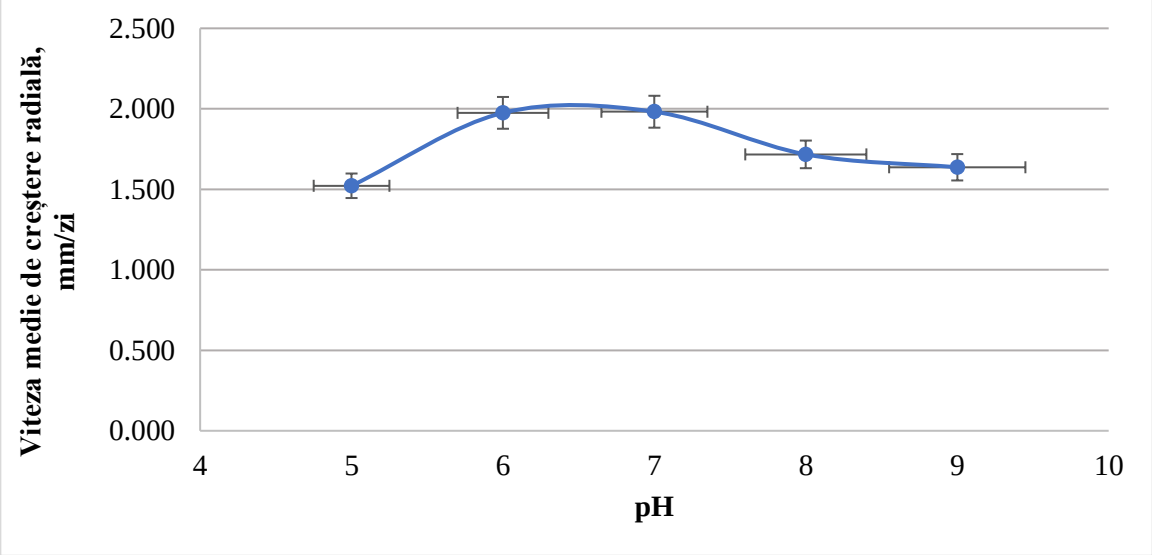


Fig. 4.17. Viteza medie de creștere radială a tulpinii de fungi *B. bassiana* CNMN-FE-01 pe mediu nutritiv PDA cu diferit pH, mm/zi

În rezultatul analizei datelor privind viteza de creștere radială a fost determinat faptul că nu există diferențe din punct de vedere statistic dintre vitezele de creștere radială a tulpinii *B. bassiana* CNMN-FE-01 la pH 6, 7 și 8 ($F(2,42) = 0,049$, $p = 0,951$). În intervalul de calori ale pH 5-9, tulpina prezintă diferențe semnificative din punct de vedere statistic ale vitezei de creștere radială ($F(4,65) = 4,33$, $p = 0,004$), tulpina prezentând valori minime ale vitezei de creștere la pH=5.

De asemenea a fost evaluată cantitatea de spori produsă per unitate de suprafață și rata de germinare a tulpinii fungice după cultivare pe mediul nutritiv PDA cu valori diferite ale pH, timp de 90 de zile, la temperatura de 25 °C (figura 4.18, 4.19). A fost constatat că la valori ale pH mai mari de 6 se reduce cantitatea de spori produsă și viabilitatea sporilor.

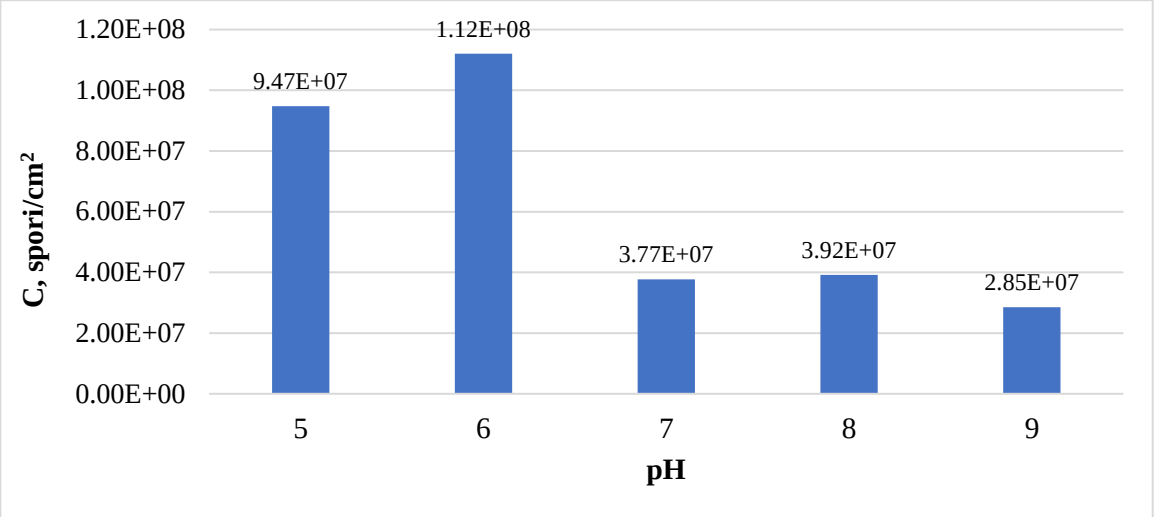


Fig. 4.18. Cantitatea a de spori produsă de tulpina de fungi *B. bassiana* CNMN-FE-01 pe mediu nutritiv PDA cu diferit pH după păstrare îndelungată, spori/cm²

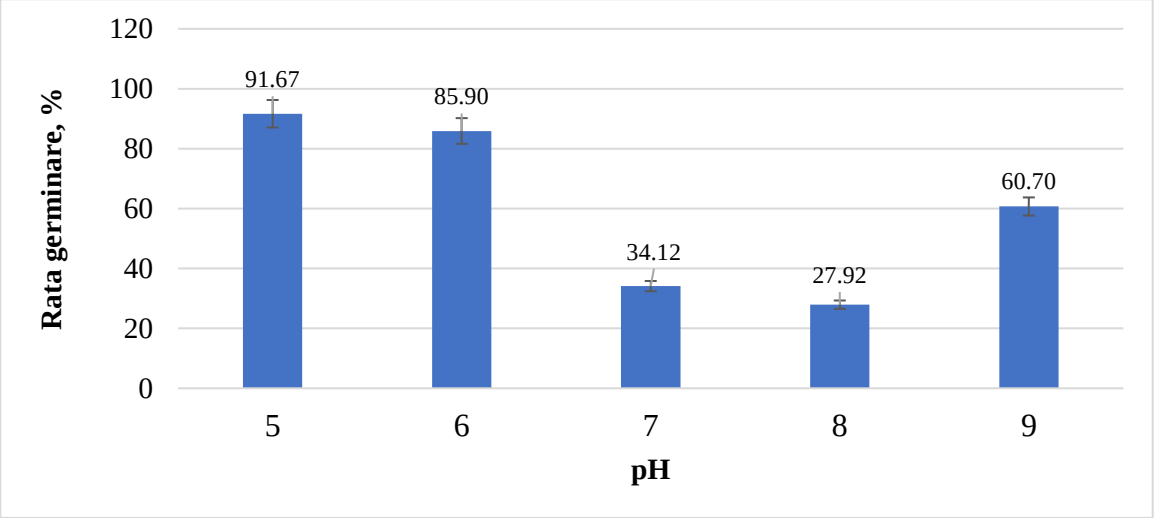


Fig. 4.19. Viabilitatea sporilor produși de tulpina de fungi *B. bassiana* CNMN-FE-01 după păstrare îndelungată pe mediu nutritiv PDA cu diferit pH, spori/cm²

Conform datelor obținute în prezenta lucrare, viabilitatea conidiilor tulpinii *B. bassiana* CNMN-FE-01 scade cu aproximativ 150 % la schimbarea valorii pH de la 6 la 7. Ulterior rata de germinare crește la pH=9 constituind 66% din rata de germinare la un pH=5. Dacă multiplicăm concentrația conidiilor produse cu viabilitatea acestora, vom obține mai multe conidii viabile produse la pH=6, chiar dacă viabilitatea totală este mai mică la valoarea pH=6 comparativ cu viabilitatea la pH=5. Astfel pentru obținerea unui număr maxim de conidii viabile este recomandabil de a ajusta pH-ul mediului la valoarea 6. Cele mai răspândite tipuri de sol în Republica Moldova până la adâncimea de 40 cm au valori ale pH mai mari de 6, ceea ce presupune

necesitatea ajustării dozelor de preparat aplicate de la caz la caz, în funcție de tipul de sol predominant.

De asemenea toleranța tulpinilor entomopatogene la diferite valori ale pH este importantă în cazul aplicării concomitente a preparatelor biologice cu preparatele chimice de control în scopul atingerii unui efect sinergic (Inglis et al. 2001). Hemocelul insectelor expuse la pesticide chimice devine alcalin, astfel încât tulpinile de microorganisme entomopatogene utilizate trebuie să fie tolerante la aceste valori ale pH (Ferron 1978).

4.3.4 Influența salinității mediului ambiant asupra creșterii și dezvoltării tulpinii de fungi Beauveria bassiana CNMN-FE-01

Salinitatea solului, poate avea efecte asupra eficacității agenților de control fungici influențând rata de germinare și implicit procesul de patogeneză (Mert, Dizbay 1997). Aspectul extern al coloniilor tulpinii fungice *B. bassiana* CNMN-FE-01, la a 5-a zi de la inoculare pe mediul nutritiv PDA, cu diferite concentrații de NaCl, este prezentat în imaginile de mai jos (figura 4.20).

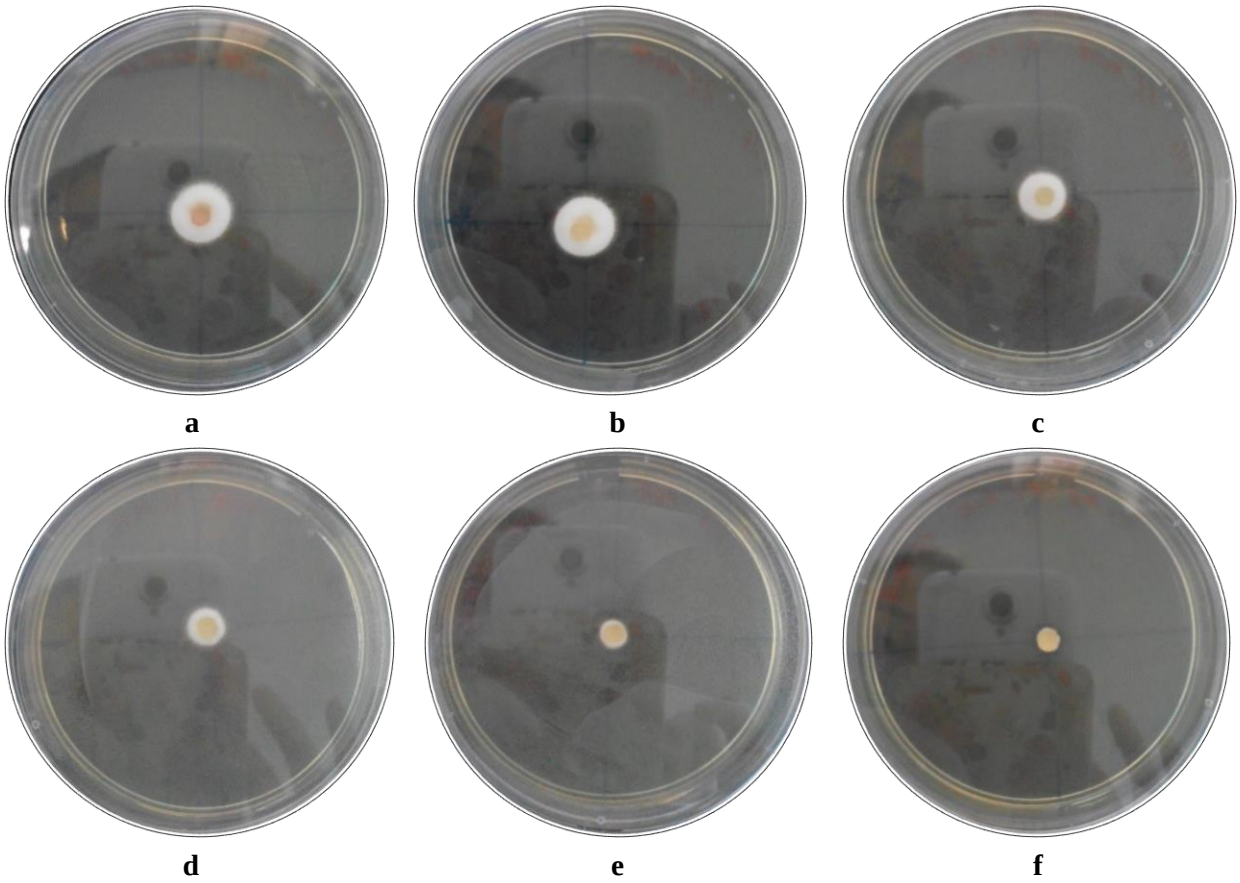


Fig. 4.20. Influența concentrației de NaCl asupra creșterii radiale a tulpinii fungice *B. bassiana* CNMN-FE-01, la a 5-a zi de la inoculare
a - 1% NaCl, **b -** 2% NaCl, **c -** 3% NaCl, **d -** 5% NaCl, **e -** 7% NaCl, **f -** 9% NaCl,

Din imaginile prezentate (figura 4.20) poate fi observat efectul inhibitor al concentrațiilor de NaCl ≥ 3%, asupra creșterii vegetative a tulpinii fungice *B. bassiana* CNMN-FE-01. Acest efect se manifestă prin reducerea razei coloniilor tulpinii de fungi odată cu creșterea concentrației de NaCl în mediul nutritiv. Analiza datelor a relevat faptul că creșterea radială a tulpinii fungice *B. bassiana* CNMN-FE-01 la diferite concentrații ale NaCl în mediul nutritiv urmează un model liniar. Nu există diferențe din punct de vedere statistic dintre valorile medii ale razei coloniei tulpinii CNMN-FE-01 la concentrațiile de 1-3 % NaCl comparativ cu martorul ($F(3,52) = 0{,}310$, $p = 0{,}818$) (figura 4.21).

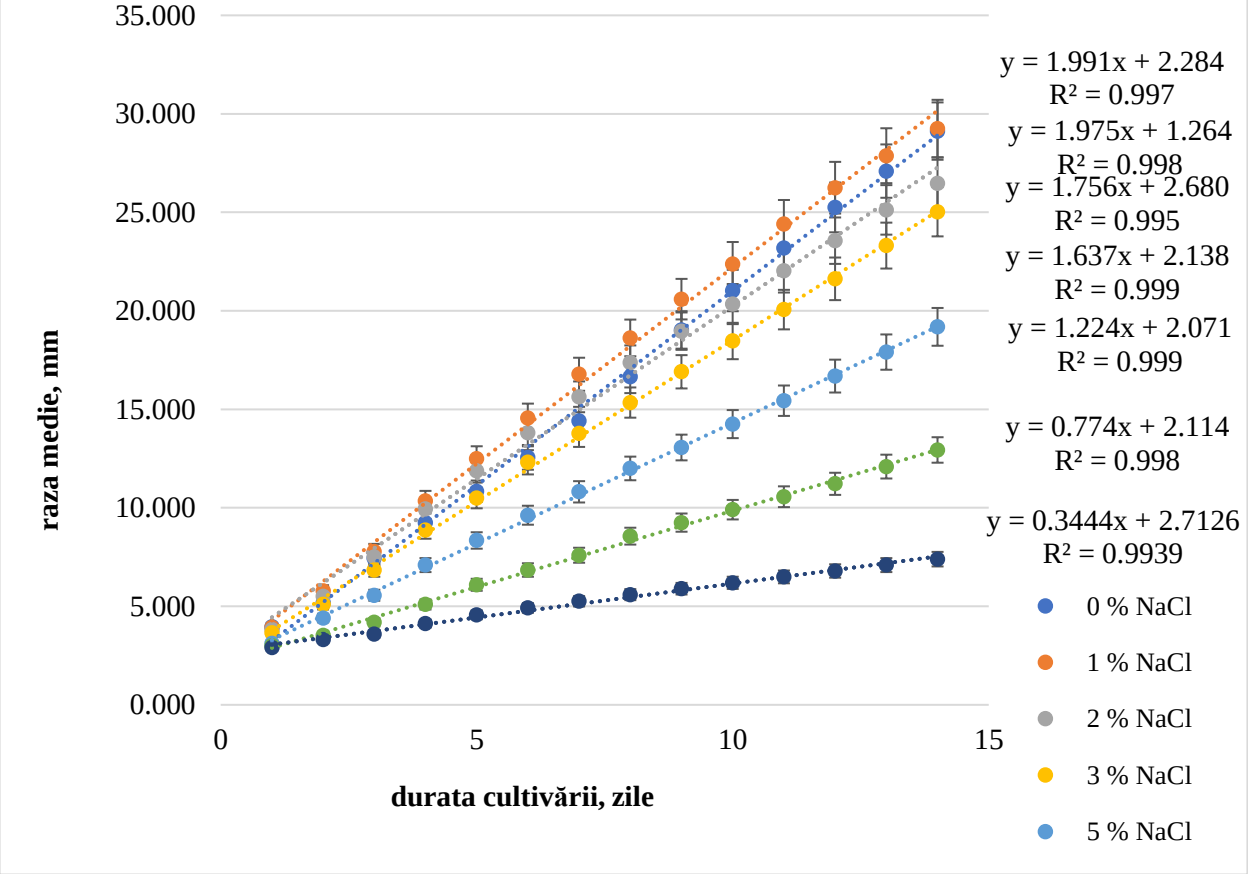


Fig. 4.21. Graficul care exprimă dependența dinamicii de creștere a coloniilor tulpinii *B. bassiana* CNMN-FE-01 (mm), de salinitatea mediului

Totodată există diferențe semnificative din punct de vedere statistic dintre valorile medii ale razei coloniei tulpinii investigate în intervalul 0-9% NaCl în mediul de cultură ($F(6,91) = 7{,}307$, $p = 2{,}16 \times 10^{-6}$). În rezultatul analizei datelor privind viteza medie de creștere radială a fost determinat faptul că odată cu creșterea salinității mediului viteza medie de creștere radială a tulpinii *B. bassiana* CNMN-FE-01 scade liniar (figura 4.22).

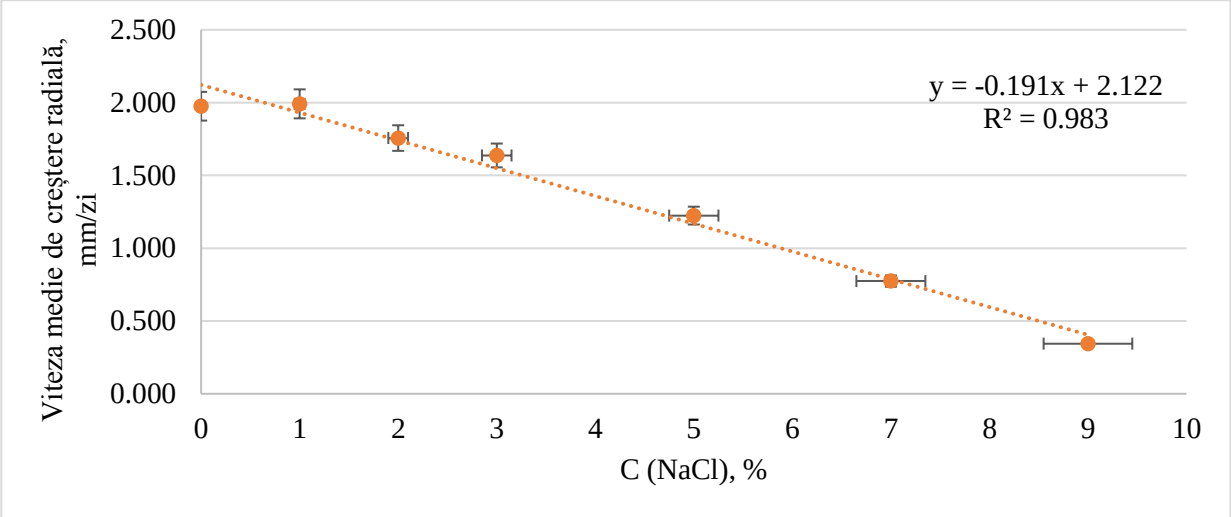


Fig. 4.22. Viteza medie de creștere radială a tulpinii de fungi *B. bassiana* CNMN-FE-01 pe mediu nutritiv PDA cu diferite concentrații de NaCl, mm/zi

Cultivarea timp de 90 de zile a tulpinii fungice pe medii nutritive cu concentrații 1-9% de NaCl a contribuit la reducerea cantității de conidii produse per unitate de suprafață comparativ cu martorul. Producția de spori este redusă de aproximativ și 6,6 mai mult ori la valori ale concentrației de NaCl mai mari de 3% (figura 4.23).

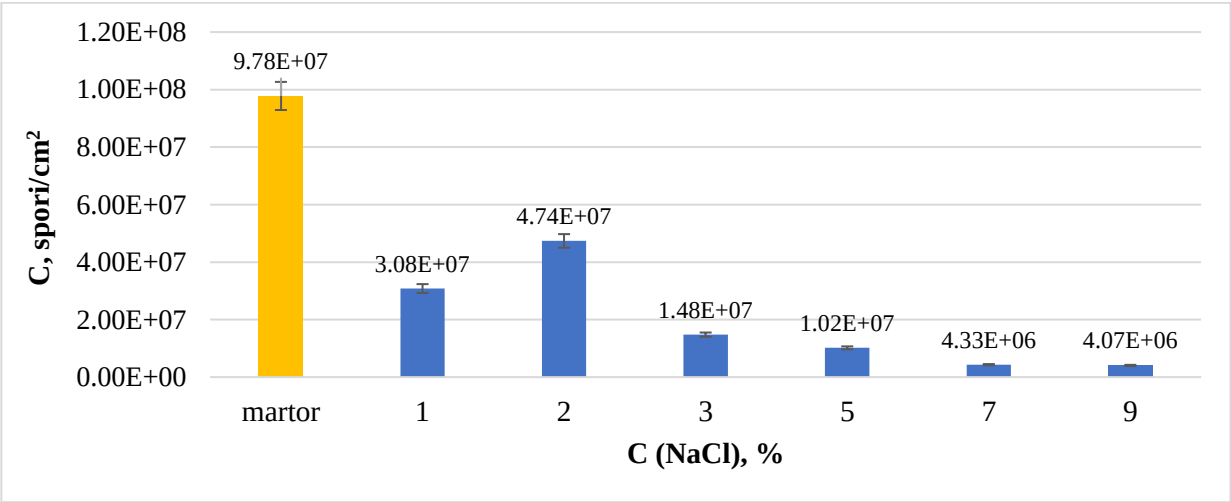


Fig. 4.23. Cantitatea de spori produsă de tulpina de fungi *B. bassiana* CNMN-FE-01 pe mediu nutritiv PDA cu diferite concentrații de NaCl după păstrare îndelungată, spori/cm^2

Concentrația de 2% NaCl contribuie la o creștere nesemnificativă față de martor a viabilității conidiilor (figura 4.24).

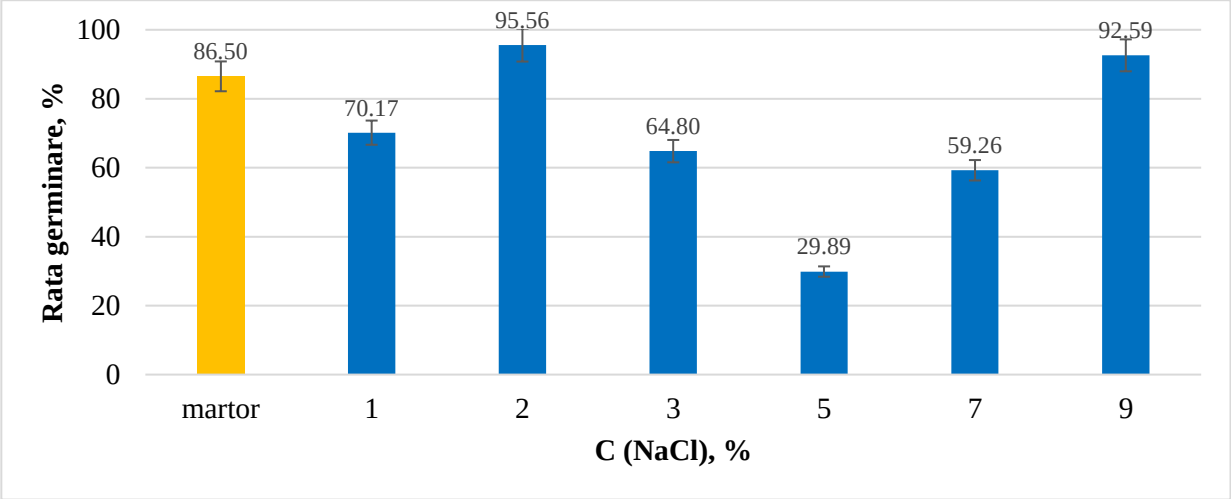


Fig. 4.24. Viabilitatea sporilor produși de tulpina de *fungi B. bassiana* CNMN-FE-01 după păstrare îndelungată pe mediu nutritiv PDA cu diferite concentrații de NaCl, %

4.3.5 *Influența presiunii osmotice a mediului asupra creșterii și dezvoltării tulpinii de fungi Beauveria bassiana CNMN-FE-01*

Presiunea osmotică a soluției solului sau a apei utilizate pentru irigare, poate avea efecte asupra eficacității agenților de control fungici deoarece poate reduce rata de germinare a acestora (Mert, Dizbay 1997, Chandler, Heale, Gillespie 1994). Rezultatele privind creșterea vegetativă a tulpinii fungice *B. bassiana* CNMN-FE-01 după menținerea timp de 24h în soluții apoase cu diferite concentrații de NaCl sunt prezentate în figurile de mai jos (figura 4.25, 4.26).

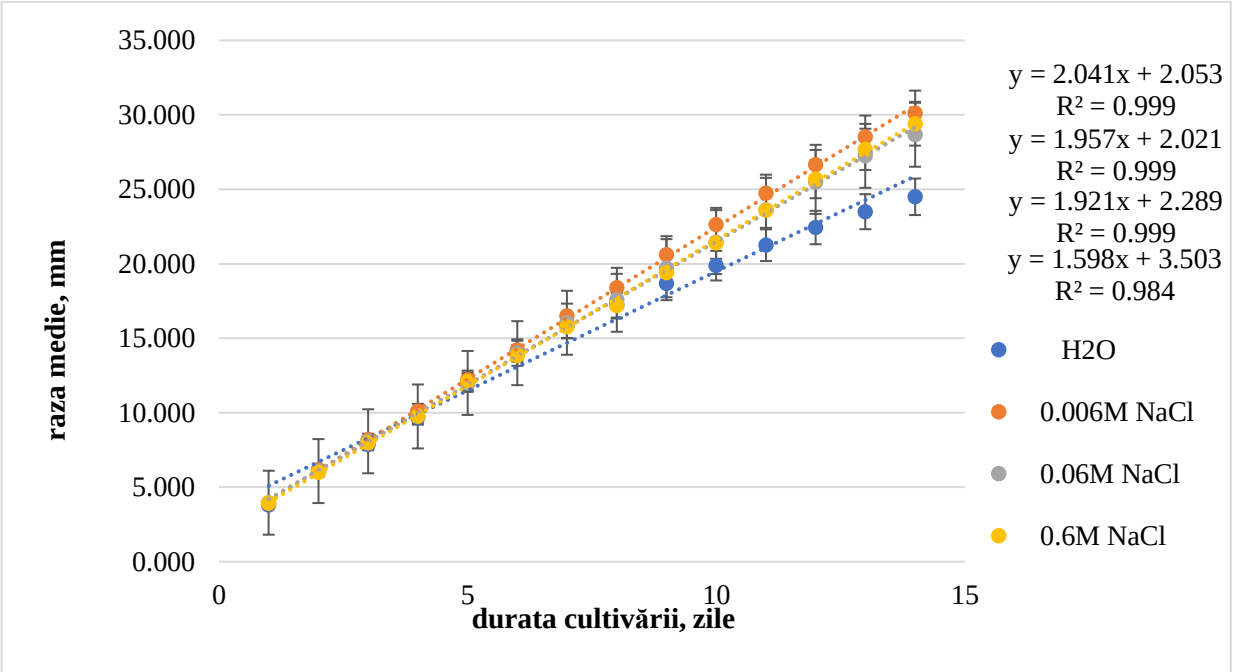


Fig. 4.25. Graficul care exprimă dependența dinamicii de creștere a coloniilor tulpinii *B. bassiana* CNMN-FE-01 (mm), de concentrația NaCl în soluție apoasă

În rezultatul analizei datelor a fost determinat faptul că în timp viteza medie de creștere radială a tulpinii *B. bassiana* CNMN-FE-01 este mai mare după menținerea în soluții de NaCl comparativ cu menținerea în apă distilată (figura 4.26). Datele obținute sunt semnificative din punct de vedere statistic ($F(3,52) = 4,547$, $p = 0,007$).

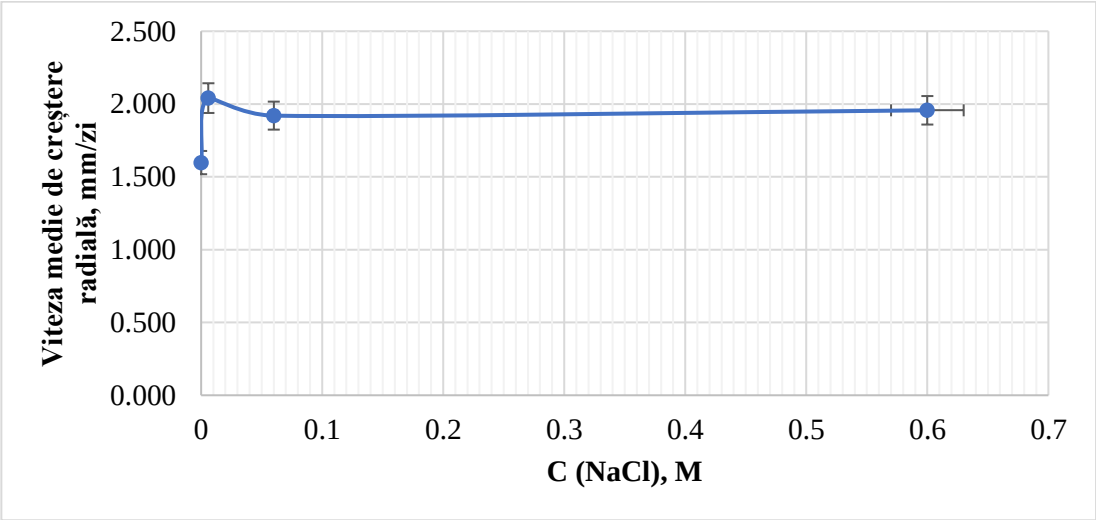


Fig. 4.26. Viteza medie de creștere radială a tulpinii de fungi *B. bassiana* CNMN-FE-01 pe mediu nutritiv după menținerea conidiilor timp de 24h în soluții cu diferită concentrație a NaCl înainte de inoculare, mm/zi

Cantitatea de spori produsă crește semnificativ după menținerea conidiilor în soluție de 0,006 M NaCl comparativ cu menținerea în apă distilată sterilă (figura 4.27).

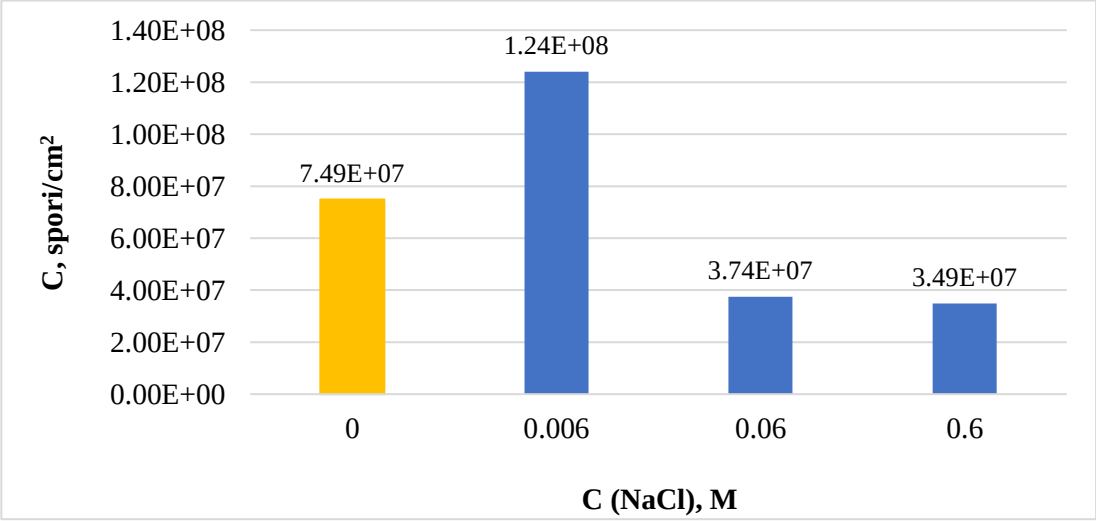


Fig. 4.27. Cantitatea de spori produsă de tulpina de fungi *B. bassiana* CNMN-FE-01 pe mediu nutritiv PDA după menținerea conidiilor timp de 24h în soluții cu diferită concentrație a NaCl, spori/cm²

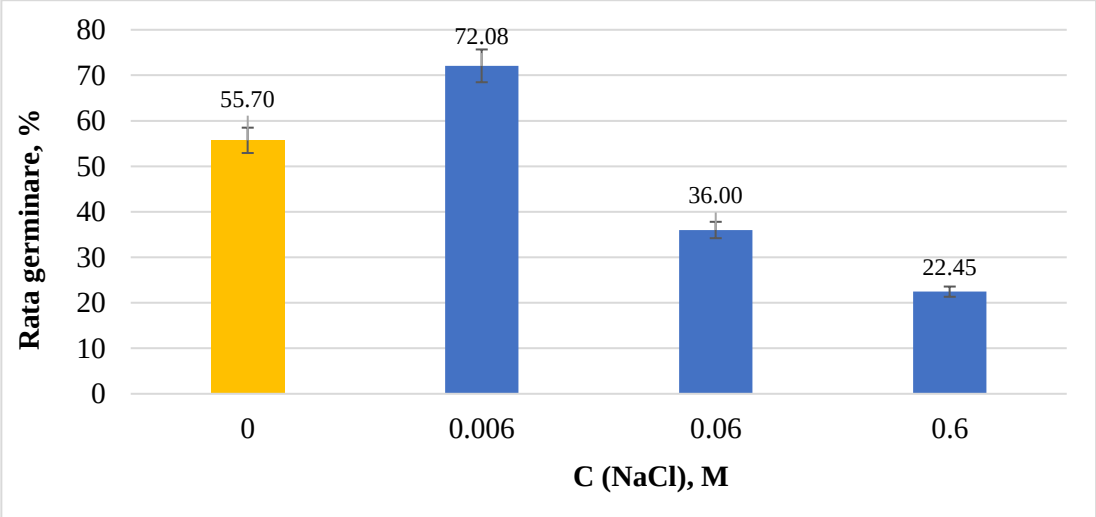


Fig. 4.28. Viabilitatea sporilor produși de tulpina de fungi *B. bassiana* CNMN-FE-01 după păstrare, %

Soluția de 0,006M sporește cu 66 % cantitatea de conidii produse și cu 29 % viabilitatea acestora față de martor. Soluțiile de NaCl cu concentrațiile de 0,06M și 0,6 M reduc cantitatea de conidii produse și viabilitatea acestora față de martor (figura 4.28). Însă viabilitatea sporilor este mai mică comparativ cu celelalte cercetări efectuate în care conidiile au fost inoculate fără a fi menținute preventiv în soluții apoase timp de 24h.

4.4 Elaborarea și aplicarea preparatelor bioinsecticide pe baza tulpinii de fungi *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01

Sunt cunoscute peste 750 de specii de micromicete entomopatogene, dar valorificate în scopuri industriale sunt de obicei câteva specii și de multe ori câteva tulpini. Marile companii producătoare de biopesticide preferă să recurgă la metodele de recombinare genetică pentru a crea tulpini cu spectru extins de acțiune și virulență sporită. La un pol este profitul companiilor, la celălalt pol este bunăstarea și siguranța financiară a fermierilor. În contextul celor menționate, selectarea tulpinilor autohtone virulente și producția locală de biopesticide este soluția orientată spre consumator care poate asigura o agricultură sustenabilă.

Rezultatele cercetărilor prezentate în această teză de doctorat pot fi integrate într-un flux complex de proiectare, elaborare și producere a agenților fungici de control biologic al coleopterelor curculionoide. Primul pas a constat în realizarea cercetărilor științifice care au permis de a trece tulpina de fungi *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01 din potențial producător în producător confirmat (figura 4.29) iar al doilea pas a contribuit la elaborarea tehnologiei de producere a preparatului insecticid pe baza tulpinii *B. bassiana* CNMN-FE-01 (figura 4.30).

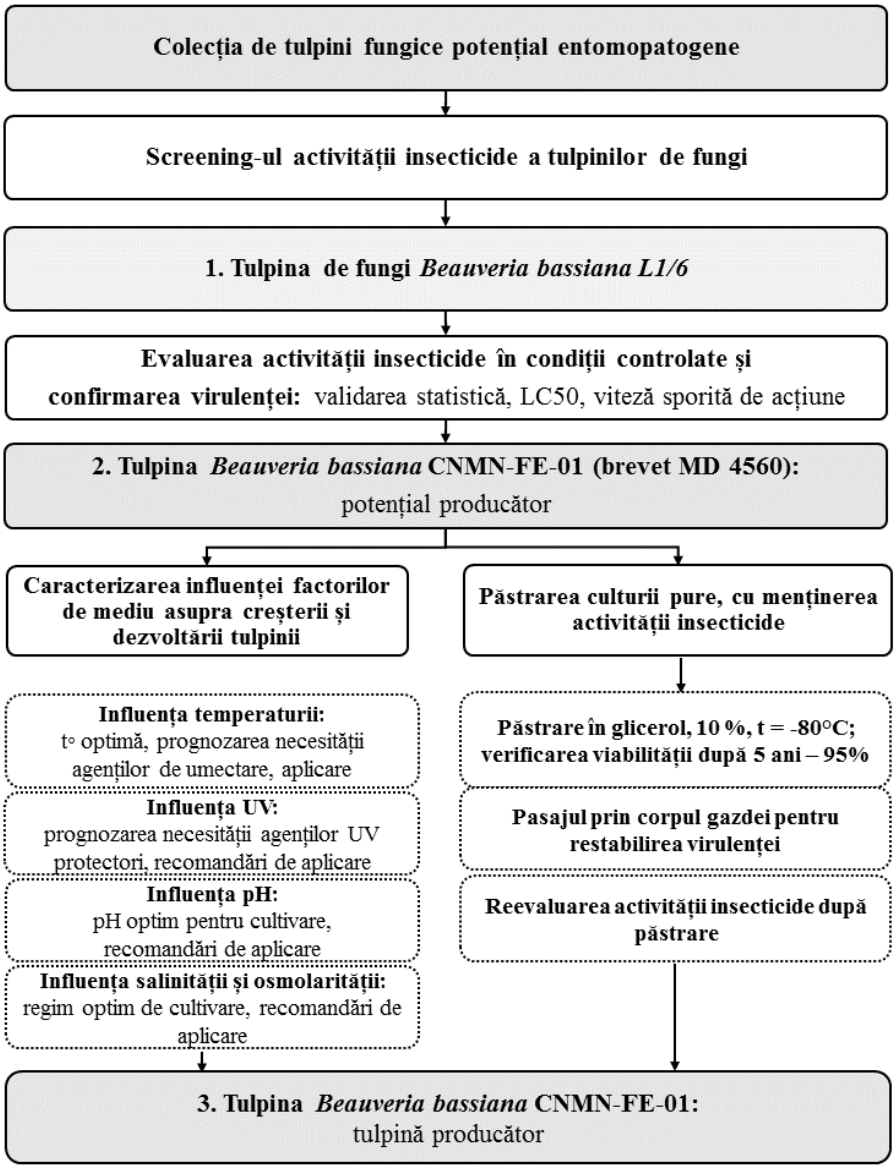


Fig. 4.29. Etapele procesului de selectare a tulpinii producător

Selectarea tulpinii producător din componența preparatului bioinsecticid a presupus:

- screening-ul colecției de microorganisme entomopatogene, privind activitatea insecticidă împotriva dăunătorilor *S. lineatus*, *H. postica* și *P. apricans*, în concentrație de 10^9 conidii/ml în intenția de a identifica tulpina potențial producătoare,

- confirmarea virulenței înalte în condiții controlate, valori ale parametrului LC_{50} mai mici comparativ cu alte tulpini (LC50 = 1,127 × 10^4 spori/ml), cantitatea de conidii/per individ mai redusă comparativ cu alte tulpini (0,969×10^5 conidii față de 1×10^7 conidii/per), viteza sporită de acțiune (atingerea valorii de 100% mortalitate la a 5-a zi, manifestarea simptomelor de patogeneză

prin afectarea comportamentului trofic, încetarea hrănirii începând cu a doua zi din momentul aplicării suspensiei conidiale).

- depunerea tulpinii de fungi în Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene a Institutului de Microbiologie şi Biotehnologie şi obținerea brevetului de invenție.

- elucidarea influenței temperaturii în scopul stabilirii necesității de utilizare în calitate de aditivi a agenților de umectare, absorbanților, stabilirea temperaturii optime de cultivare pentru maximizarea producției de conidii, elaborarea recomandărilor de aplicare în teren deschis,

- elucidarea influenței radiațiilor UV în scopul stabilirii necesității utilizării agenților UV protectori, elaborarea recomandărilor de aplicare în teren deschis,

- elucidarea influenței valorii pH a mediului ambiant pentru identificarea pH-ului optim de cultivare pentru maximizarea producției de conidii, elaborarea recomandărilor de aplicare în teren deschis pe diferite tipuri de sol, în combinație cu pesticidele chimice,

- elucidarea influența salinității și osmolarității în scopul stabilirii regimului optim de cultivare, recomandări de aplicare în condiții de salinitate sporită a mediului ambiant,

- elucidarea condițiilor optime de păstrare și menținerea virulenței.

Rezultatele obținute au permis de a confirma tulpina de fungi *B. bassiana* CNMN-FE-01 în calitate de tulpină producător.

Caracteristica producătorului: Tulpina de fungi *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill., 1912, CNMN-FE-01 prezintă colonii albe cu aspectul exterior lânos-flocos sau catifelat spre pulverulent. Coloniile cu vîrsta pot deveni de culoare gălbuie, uneori roșcate. Rareori produce exudat fără miros. Hifele submerse sunt hialine cu pereții netezi de aproximativ 1,5 - 3 µm lățime. Hifele miceliului aerian sunt, de asemenea, hialine cu pereții netezi de aproximativ 1 - 2 µm lățime, târâtoare sau ascendente. Hifele poartă grupuri laterale de celule umflate cel mai des de 3 - 6 x 3 - 5 µm, care ulterior formează ramificaţii şi dau naştere altor celule umflate mai mici sau 1 - 5 celule conidiogene. În cazul culturilor tinere conidiile sunt strâns grupate, la culturile mai bătrâne ramurile devin mai răzleţe, celulele conidiogene apar în grupuri mici sau solitar pe celulele laterale elipsoidale sau cilindrice (de aproximativ 15 x 6 µm) sau direct din hife. Celulele conidiogene sunt globulare uneori alungite bazal (3 - 6 x 2,5 - 3,5 µm), celulele terminale cel mai des sunt subţiri cu axul central bine dezvoltat, de până la 20 µm lungime, geniculat sau neregulat îndoit, zimțat. Conidiile hialine uneori de culoare gălbuie, netede, globulare spre elipsoide uneori cu o bază apicală (1,5 -) 2 - 3 (- 4) x (1,5 -) 2 - 2,5 (- 3) µm. Clamidospori nu au fost observaţi. Poate fi cultivată pe mediul cartof-glucoză-agar, coloniile timp de 8 zile ating diametrul de 3,05 ± 0,14 cm.

Caracteristica mediului nutritiv: Pentru cultivarea tulpinii este cu succes aplicat mediul PDA (cartof-glucoză-agar) care permite a produce o cantitate semnificativă de conidii.

Temperatura optimă de cultivare este 25°C, valoarea optimă pH = 6. Ajustarea pH-ului mediului nutritiv permite de a spori cu 14% cantitatea de conidii viabile recoltate (de la $0{,}846\times10^8$ la $0{,}962\times10^8$ conidii/cm^2). Deoarece conidiile (forma cu infectivitate maximă) se produc aerian, tulpina *B. bassiana* CNMN-FE-01 urmează a fi cultivată pe mediu solid.

Condiții de păstrare și menținere a virulenței: este obținută și menținută cultura pură fungică provenită dintr-un singur spor, astfel garantând existența unui singur genotip virulent și nu a unei comunități de tulpini din aceeași specie. Tulpina *B. bassiana* CNMN-FE-01 poate fi cu succes păstrată fără a-și pierde virulența și viabilititatea, în eprubete de 2-5 ml cu glicerol, 10%, timp de 5 ani, la t° = -80°C. Cultura starter poate fi menținută în frigider la t° = 4°C, evitând reinocularea repetată timp de 2 ani, cu menținerea virulenței și viabilității. Pentru a menține virulența, o dată la 2-3 reinoculări este efectuat pasajul prin corpul gazdei și recuperarea tulpinii.

Fluxul tehnologic de producere a preparatelor insecticide naturale pe baza tulpinilor autohtone de fungi poate fi rezumat la 5 etape (figura 4.30):

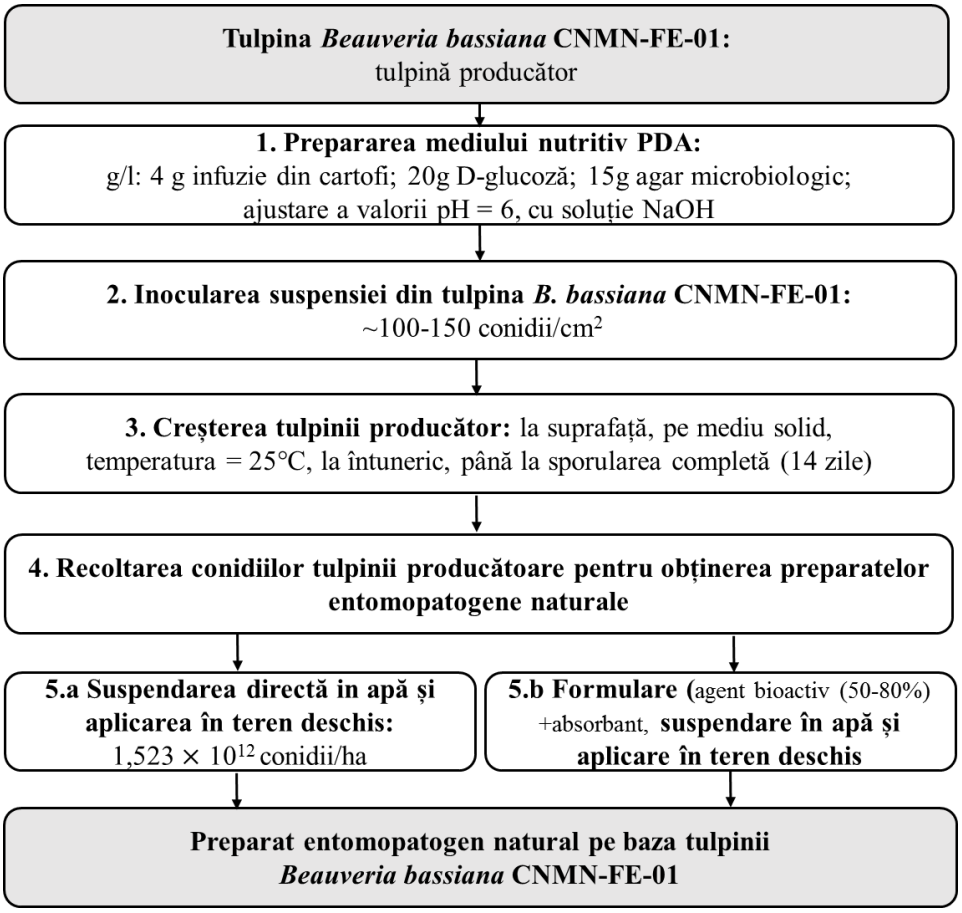


Fig. 4.30. Tehnologia de producere a preparatului insecticid pe baza tulpinii *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01

Costurile minime asociate producerii conidiilor fungice pentru a fi aplicate pe o suprafață de 1 ha:

1. Costul mediului nutritiv:

Concentrația maximală testată în studiul de față a fost de $1{,}523\times10^5$ conidii/cm^2. Concentrația minimă care a cauzat o mortalitate de 100% a fost $1{,}523\times10^4$ conidii/cm^2. Pentru a trata un ha (10^8 cm^2) cu conidii din tulpina fungică *B. bassiana* CNMN-FE-01 va fi nevoie de o cantitate de inocul egală cu $1{,}523\times10^{12}$ conidii. Tulpina produce ~$0{,}962\times10^8$ conidii viabile/cm^2. Pentru a produce suficiente conidii pentru un ha, va fi nevoie de a cultiva tulpina pe substrat solid cu suprafața de ~ 15850 cm^2, dacă grosimea stratului va fi de ~0,8 cm, atunci va fi nevoie de 12680 cm^3 sau aprox 12,7 l de mediu PDA. Pentru a pregăti 1 l de mediu se consumă 39 g de mediu PDA, respectiv pentru 12,7 l se vor consuma ~0,5 kg de mediu nutritiv. 1 kg de mediu costă aproximativ 100 USD, cumpărat în volum de 0,5 kg per ambalaj, în caz că sunt procurate cantități mult mai mari, prețul scade la aproximativ 10 USD/kg pentru ambalaj de 100 kg și 1 USD/kg pentru ambalaj de 1 tonă. Astfel 0,5 kg vor costa în jur de 0,5- 50 USD, sau aproximativ 8,8-880 lei.

2. Costul energiei electrice pentru cultivarea timp de 14 zile.

Un incubator cu puterea maximă 700W, volumul de 111 l, timp de 14 zile va consuma 235,2 kWh, la preț de 336,40 lei.

Pentru a reduce în continuare costurile urmează a fi evaluată producerea de conidii pe mediul nutritiv cartof-glucoză-agar preparat din ingredientele inițiale de sinestătător sau substraturi solide precum, orz, orez, mazăre, grâu ș.a. Tulpina se inoculează direct pe substrat, în saci sterili, și se lasă în condiții controlate de temperatură și umiditate pentru a sporula. După sporularea completă are loc deshidratarea mediului și recoltarea conidiilor. Pentru speciile din genul *Beauveria* cultivarea pe substrat durează în mediu 10 zile, se recoltează cu o spatulă și se separă de miceliu prin cernere (Rodrigues et al. 2016, Jaronski, Mascarin 2017). Micromicetele entomopatogene cel mai des se produc sub formă de praf umectabil (WP), care conține 50–80% agent bioactiv, 15–45% agent de umplere, 1–10% agent dispersie și 3–5% surfactant (Burges 1998). Acest tip de formulă se amestecă cu apa și poate fi aplicat cu ajutorul unor pulverizatoare standard sau pompe hidraulice. De asemenea, preparatul poate fi aplicat direct pe sol (Burges 1998). Ținând cont de influența temperaturii și umidității asupra viabilității conidiilor în formula preparatului urmează a fi introdus un absorbant (e.g. clorură de calciu, silicagel, sulfat de magneziu, cărbune alb, sulfat de sodiu). Conform datelor din literatura de specialitate dintre toate materialele testate eficiență maximă posedă cărbunele alb, care asigură menținerea viabilității conidiilor la temperatura camerei timp de 60 zile (Skinner, Parker, Kim 2014). Astfel cea mai simplă formulă a preparatului entomopatogen pe baza tulpinii locale de *B. bassiana* CNMN-FE-

01 ar putea presupune utilizarea silicagelului sau cărbunelui alb în calitate de aditiv. Pentru a spori eficacitatea formulei poate fi cercetată în continuare posibilitatea adăugării uleiului vegetal, care va prelungi termenul de păstrare, va spori eficacitatea prin favorizarea aderării conidiilor la cuticula insectei și stimularea germinării (Bateman et al. 1993). Acest lucru poate fi obținut prin simpla adăugare a uleiurilor vegetale, uleiului de parafină sau uleiului mineral la praful umectabil (Moore et al. 1995, Morley-Davis, Moore, Prior 1995, Skinner, Parker, Kim 2014, de Oliveira et al. 2018). Spre exemplu biopesticidele Naturalis-L ® (*B. bassiana*) și Green Muscle ® (*M. anisopliae*), utilizează uleiul de soia în acest sens (McClatchie et al. 1994). Uscarea conidiilor de *B. bassiana* prin adăugarea silicagelului la formula în ulei sporește toleranța față de temperaturile înalte și termenul de valabilitate a produselor pe bază de ulei (Shimizu, Mitani 2000 Lopes, Faria 2019). A fost de asemenea studiată utilizarea metil-oleatului în calitate de agent de umectare și emulsifiere și a uleiurilor de porumb, bumbac, și parafină în calitate de aditivi (Kim et al. 2011b, Skinner, Parker, Kim 2014).

Recomandări de aplicare a preparatului entomopatogen pe baza tulpinii de fungi *B. bassiana* CNMN-FE-01

Metoda de aplicare utilizată influențează eficiența tratamentului. Trebuie luați în considerare mai mulți factori, inclusiv distribuția sporilor și acoperirea pentru a se asigura că dăunătorul vine în contact cu ciuperca și condițiile de mediu favorizează supraviețuirea și germinarea micromicetei înainte, în timpul și după aplicare. Principalele metode de aplicare sunt pulverizarea foliară, tratarea solului și scufundarea plantei sau rădăcinilor. Pulverizarea este metoda mai des utilizată pentru aplicarea bioinsecticidelor microbiene, deoarece presupune utilizarea echipamentului standard și este familiară pentru fermieri. În cazul aplicării preparatului în teren deschis se va recomanda de a efectua pulverizarea dimineața devreme, beneficiind de umiditatea sporită, pentru a favoriza infecția, proteja tulpina de razele UV și temperatura excesivă, și de a asigura faptul că insectele în procesul deplasării vor intra în contact cu conidiile. Studiile ulterioare vor urmări testarea diferitor formule ale preparatului entomopatogen în condiții de teren deschis, argumentarea detaliată a sine costului care va include cheltuielile legate de menținerea culturii, multiplicarea ei și costurile asociate aditivilor din formula preparatului. De asemenea vor fi elaborate recomandări detaliate privind aplicarea în diverse culturi agricole afectate de speciile de curculionoide incluse în studiu.

4.5 Concluzii la capitolul 4

1. Dăunătorii *Sitona lineatus, Hypera postica* și *Protapion apricans* au fost susceptibili la infecția cu tulpinile fungice investigate, tulpina L1/6 prezentând cele mai mari valori ale mortalității, egale cu 100%, 70% și 40% respectiv.
2. Tulpina nou izolată *Beauveria bassiana* L1/6 (CNMN-FE-01) posedă o activitate insecticidă sporită asupra speciei *Sitona lineatus* L., concentrația de $0,969\times10^6$ conidii/ml cauzează mortalitate de 100% la a 5-a zi de la tratament.
3. La aplicarea culturii fungice *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01 în concentrație de $1,127 \times 10^4$ conidii/ml apă distilată, efectivul numeric al dăunătorului *Sitona lineatus* L. este redus cu 50%.
4. Tulpina de fungi propusă *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01 posedă o activitate insecticidă pronunțată asupra coleopterelor curculionoide și poate fi utilizată în calitate de agent bioactiv al preparatelor insecticide. Tulpina a fost extrasă din mediul natural, nu este patogenă pentru plante şi organismele homeoterme. În natură nu sunt introduse organisme străine, excluzând dereglarea funcționării ecosistemelor. Totodată, la mortalitatea de 100%, cantitatea de conidii aplicată este de 100 de ori mai mică, iar viteza de acțiune mai mare, comparativ cu cea mai apropiată soluție.
5. Au fost puse fundamentele unei colecții de tulpini fungice autohtone cu potențial de a fi utilizate în calitate de agenți de control biologic. Activitatea acestor tulpini urmează a fi explorată folosind un spectru mai larg de gazde potențiale.
6. Tulpina de fungi *B. bassiana* CNMN-FE-01 poate fi cu succes păstrată în glicerol de 10% și temperatura de -80°C timp de 5 ani, și în frigider, pe mediu nutritiv, la temperatura +4°C timp de 2 ani cu păstrarea virulenței și viabilității.
7. A fost determinată temperatura optimă, egală cu 25 °C, pentru creșterea și dezvoltarea tulpinii *B. bassiana* CNMN-FE-01. A fost stabilit faptul că la temperatura de 35°C tulpina își inhibă complet creșterea și dezvoltarea. După păstrarea tulpinii timp de 90 zile la 25°C cantitatea de conidii produse și viabilitatea lor este maximă, iar temperaturile mai mari de 30°C reduc semnificativ viabilitatea conidiilor.
8. A fost determinat faptul că viteza de creștere radială nu este afectată semnificativ de expunerea la radiații UV cu λ=312 nm. Totodată, expunerea de scurtă durată la radiații UV (10 min.) inhibă mai puternic germinarea conidiilor decât o expunere mai îndelungată (40 min.). Se presupune că acțiunea mai îndelungată a factorului de stres activează mecanisme de protecție, care stimulează germinarea conidiilor.

9. S-a constatat faptul că viteza de creștere radială nu este afectată semnificativ de pH-ul mediului la valori situate în intervalul 6-8. Viabilitatea conidiilor crește la cultivarea tulpinii pe mediul nutritiv cu pH = 5, însă cantitatea de spori produsă scade, iar la valorile pH > 6 se reduce atât cantitatea de conidii produse cât și viabilitatea acestora. Astfel valoarea optimă a pH pentru creștea și dezvoltarea tulpinii este pH=6.
10. Viteza medie de creștere radială a tulpinii fungice scade liniar odată cu creșterea salinității mediului. Cultivarea timp de 90 de zile a tulpinii fungice pe medii nutritive cu concentrații 1-9% de NaCl a contribuit la reducerea considerabilă a cantității de conidii produse per unitate de suprafață comparativ cu martorul. Producția de spori scade de ~ 6,6 și mai mult ori, la valori ale concentrației de NaCl mai mari de 3%.
11. Concentrația optimă pentru germinarea conidiilor este 0,006 M NaCl, iar concentrațiile de 0,06 și 0,6 M NaCl sunt hipertonice, reducând cantitatea de conidii și viabilitatea acestora.
12. Datele obținute privind influența temperaturii, radiațiilor UV, pH-ului, salinității și osmolarității mediului ambiant asupra creșterii și dezvoltării tulpinii fungice au permis de a propune procedeul de obținere a preparatului insecticid și de a elabora recomandări de aplicare și integrare a preparatului în sistemele de producție agricolă.

CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI

Rezultatele obținute în cadrul tezei de doctorat ***"Controlul biologic al Coelopterelor curculionoide dăunători ai culturilor agricole"*** corelate cu ipotezele, scopul și obiectivele de cercetare propuse, au condus la formularea următoarelor concluzii generale:

1. Microflora fungică a dăunătorilor *Sitona lineatus*, *Hypera postica* și *Protapion apricans*, a constat din 55 tulpini fungice, ce aparţin la 23 specii şi 3 filumuri (Ascomycota, Basidiomycota şi Mucormycota), dintre care 8 tulpini sunt fitopatogeni (*Penicillium polonicum, Rhizopus stolonifer, Fusarium equiseti, F. oxysporum, F. tricinctum, Trichothecium roseum, Cladosporium cladosporoides, Acremonium strictum* şi *Alternaria alternata*) accentuând importanța elaborării metodelor eficiente și inofensive de control al acestor dăunători; și 19 tulpini sunt agenți potențiali de control biologic (*Beauveria bassiana*, *Beauveria* spp., *Isaria fumosorosea*, *Isaria* sp., *Aspergillus flavipes* și *Penicillium brevicompactum*), fiind necesare investigații suplimentare privind potențialul de aplicare în scopul gestionării populațiilor de dăunători agricoli (Moldovan 2019, Moldovan, Munteanu-Molotievskiy 2017, Moldovan et al. 2017, Moldovan 2014, Moldovan 2012) (Cap. 3, p. 3.1 pag. 86-88, p. 3.2 pag. 89-90, p. 3.3 pag. 91-115, p. 3.4 pag. 115-116).
2. Dăunătorii *Sitona lineatus*, *Hypera postica* și *Protapion apricans* au fost susceptibili la infecția cu tulpinile fungice investigate, tulpina *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01 (L1/6) prezentând cele mai mari valori ale mortalității, egale cu 100%, 70% și 40% respectiv. Ca rezultat au fost puse fundamentele unei colecții de tulpini fungice entomopatogene autohtone cu potențial de a fi utilizate în calitate de agenți de control biologic al dăunătorilor (Moldovan, Munteanu-Molotievskiy 2017, Moldovan et al. 2017, Moldovan 2014, Moldovan 2012) (Cap. 4, p. 4.1 pag. 121, p. 4.5 pag. 147).
3. Tulpina nouă de fungi *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01 posedă activitate insecticidă sporită asupra speciei *Sitona lineatus*, mortalitatea de 100% este atestată la a 5-a zi de la aplicarea suspensiei de conidii cu concentrația de $0{,}969\times10^6$ conidii/ml. Tulpina posedă virulență sporită, la mortalitatea de 100%, cantitatea de conidii aplicată este de 100 de ori mai mică, iar viteza de acțiune mai mare, comparativ cu cea mai apropiată soluție, ceea ce ar permite reducerea prețului preparatului entomopatogen și minimizarea inputurilor în agroecosistem (Moldovan 2019, Moldovan, Munteanu-Molotievskiy 2019, Moldovan

2018, Moldovan, Toderas, Munteanu-Molotievskiy, 2018, Moldovan, Munteanu-Molotievskiy, Toderaş 2018, Anexa 1) (Cap. 4, p. 4.2 pag. 124-125, p. 4.5 pag. 147).

4. Tulpina de fungi *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01 este adaptată la condiții variabile ale mediului ambiant (Moldovan, Munteanu-Molotievskiy 2019), și anume: crește vegetativ și produce conidii în intervalul de temperaturi 15-30°C; viteza de creștere radială a tulpinii nu este afectată semnificativ de expunerea la radiații UV cu λ de 312 nm și la valori ale pH ale mediului situate în intervalul 6-8 (Cap. 4, p. 4.3 pag. 127-129, 131-136, p. 4.5 pag. 147-148).
5. Tulpina de fungi *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01 posedă proprietăți avantajoase pentru utilizarea acesteia în calitate de agent bioactiv pentru producerea preparatelor insecticide autohtone (Moldovan, Munteanu-Molotievskiy 2019), și anume: inhibarea completă a creșterii și germinării la temperatura de 35°C; producerea a $0{,}962\times10^8$ conidii/cm^2 la valori optime ale temperaturii (25°C) și pH (6); menținerea virulenței la păstrarea în eprubete de 2-5 ml cu glicerol 10%, la t° = -80°C, timp de 5 ani, și posibilitatea de menținere în frigider a culturii starter, la t° = 4°C, evitând reinocularea repetată, timp de 1 an, cu păstrarea virulenței și viabilității (Cap. 4 p. 4.3 pag. 127, 135, p. 4.4 pag.144, 145, p. 4.5 pag. 147-148).

Rezultatele principale obținute care au contribuit la soluționarea problemei științifice importante, pusă în fața acestei lucrări (*necesitatea obținerii tulpinilor autohtone de fungi cu activitate insecticidă sporită pentru utilizarea acestora în controlul biologic al dăunătorilor și cu proprietăți favorabile pentru integrarea în calitate de biopesticide în sistemele de producție agricolă*) sunt următoarele:

1. au fost izolate, identificate și caracterizate 20 tulpini autohtone de fungi cu potențial insecticid (*Beauveria bassiana* - 3 tulpini, *Beauveria* spp. - 13, *Isaria fumosorosea* - 1, *Isaria* sp. - 1, *Aspergillus flavipes* - 1 și *Penicillium brevicompactum* - 1), constituind fundamentul colecției autohtone de tulpini fungice - agenți de control biologic al dăunătorilor;
2. tulpina nouă de fungi *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01 posedă activitate insecticidă și virulență sporită asupra dăunătorului *Sitona lineatus*, la mortalitatea de 100%, cantitatea de conidii aplicată este de 100 de ori mai mică, iar viteza de acțiune mai mare, comparativ cu cea mai apropiată soluție, ceea ce ar permite reducerea prețului preparatului entomopatogen și minimizarea inputurilor în agroecosistem.

3. tulpina *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01 posedă proprietăți tehnologice avantajoase precum: păstrarea virulenței în timp, păstrarea viabilității în timp în diverse condiții ale mediului ambiant, servind drept bază pentru elaborarea procedeului de obținere și recomandărilor de aplicare a preparatului insecticid destinat controlului biologic al coleopterelor curculionoide.

Aportul personal. În materialele care reflectă conținutul brevetelor de invenție autoarei îi revine cota parte în corespundere cu lista autorilor. Toate celelalte rezultatele obținute, analiza lor, generalizările și concluziile aparțin autoarei.

În aspect teoretic, în premieră au fost obținute date privind comunitățile fungice ce constituie microflora dăunătorilor culturilor agricole *Sitona lineatus* și *Hypera postica* în Republica Moldova și a speciei *Protapion apricans* în plan internațional; speciile de dăunători au fost atestați ca potențiali vectori ai micromicetelor fitopatogene, accentuând importanța elaborării metodelor eficiente și inofensive de control al acestor dăunători; a fost argumentat științific potențialul de aplicare a tulpinilor autohtone de *Beauveria bassiana* în calitate de agent bioactiv pentru producerea locală a preparatelor insecticide; a fost propus procedeul de obținere a preparatului insecticid destinat controlului biologic al coleopterelor curculionoide. Proprietățile insecticide sporite ale tulpinii *Beauveria bassiana* L1/6 (CNMN-FE-01) sunt confirmate prin brevetul de invenție MD 4560 (Anexa 1).

În aspect aplicativ se propune un procedeu de obținere a unui preparat insecticid natural pe baza tulpinii autohtone noi de *Beauveria bassiana* L1/6 (CNMN-FE-01), depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene, pentru controlul biologic al speciei *Sitona lineatus*. Tulpina posedă proprietăți fiziologice și biochimice promițătoare care vor permite de a elabora biopreparate aplicate pe scară largă pentru protecția culturilor de *Fabaceae*.

Rezultatele științifice prezentate în lucrare au fost aprobate la următoarele foruri științifice naționale și internaționale: International Congress on Invertebrate Pathology and Microbial Control & 52nd Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology and 17th Meeting of the IOBC-WPRS Working Group „Microbial and Nematode Control of Invertebrate Pests”, 28 iulie - 1 august 2019, Valencia, Spania; International Conference on Microbial Biotechnology (4th edition), 11-12 octombrie 2018, Chișinău, Republica Moldova; The 16th Meeting of the IOBC-WPRS Working Group „Microbial and Nematode Control of Invertebrate Pests”, 11-15 iunie 2017, Tblisi, Georgia; Simpozionul Internațional „Actual Problems of Zoology and Parasitology: Achievements and Prospects”, 13 octombrie 2017, Chisinău, Republica

Moldova); Rezumate ale comunicărilor. Științe ale naturii și exacte. Științe economice. Conferința științifică națională cu participare internațională „Integrare prin Cercetare și Inovare", 9-10 noiembrie 2017, Chișinău, Republica Moldova; Conferința științifico-practică „Rezultatele cercetărilor la cultura plantelor de câmp în Republica Moldova", 19 iunie 2015, Bălți, Republica Moldova; Sesiunea națională de comunicări științifice studențești, 13-14 mai 2014, Chișinău, Republica Moldova; International Conference of Young Researchers, IXth edition, 2011, Chisinau, Republic of Moldova.

La tema tezei au fost publicate: 1 capitol în monografie colectivă (monoautorat), 12 articole (1 articol în reviste cu factor de impact 0,1-0,9; 2 articole în alte reviste editate în străinătate; 2 articole în reviste naționale categoria B, 8 articole în culegeri naționale și internaționale; dintre care 4 monoautorat), 5 rezumate ale comunicărilor științifice, 3 brevete de invenție de scurtă durată.

Rezultatele științifice obținute în prezenta lucrare au fost distinse cu diplome, medalii și premii speciale, inclusiv: 1 medalie de aur (Innovation and Creative Education International Fair – second edition, „Ștefan cel Mare University from Suceava", România, 2018), 1 medalie de argint (Ediţia a IV-a a Salonului Internaţional al Inovării şi Cercetării Ştiinţifice Studenţeşti „Cadet INOVA'19", Sibiu, România, 2019), diploma și medalia de excelență (Ediția a 23-a a Expoziției Internaționale de Inventică "INVENTICA 2019" Iași, România, 2019), diploma și medalia EUROINVENT (2018), Chris Lomer Award of Society for Invertebrate Pathology (2019); IOBC-WPRS Working Group „Microbial and Nematode Control of Invertebrate Pests" Travel Award (2017) (Anexa 5).

Implementarea rezultatelor științifice. Rezultatele sunt utilizate în calitate de material didactic pentru instruirea studenților la specialitățile Biologie, Biologie moleculară (licență), Științe biologice aplicate (master), în cadrul cursurilor de instruire a formatorilor și a fermierilor în domeniul agriculturii ecologice și metodelor biologice de combatere a dăunătorilor (Anexa 4).

Recomandări practice:

1. Tulpina autohtonă, izolată din mediul natural, *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01 (Brevet de invenție MD 4560) se recomandă a fi aplicată în calitate de agent de control biologic al coleopterelor curculionoide.
2. Se recomandă ajustarea dozei preparatului insecticid pe baza tulpinii *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01, la aplicarea pe soluri sărăturate, pe soluri cu valori ale pH > 6, la adâncimea 0 - 40 cm, sau în cazul irigării cu apă provenită din pânza freatică.

3. Pentru a evita impactul negativ al temperaturilor ≥ 30°C și a radiațiilor UV asupra germinării conidiilor tulpinii de fungi *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01 se recomandă aplicarea preparatului insecticid seara sau dimineața devreme.
4. Pentru a spori eficiența tulpinii *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01 la temperaturi ≥ de 30°C se recomandă utilizarea în formula preparatului a unui agent de umectare.

Sugestii privind cercetări de perspectivă:

1. Tulpinile de fungi *Aspergillus flavipes* (L1/4) și *Penicillium brevicompactum* (C) necesită investigații interdisciplinare detaliate privind mecanismul de acțiune.
2. Urmează a fi elucidat în continuare spectrul de gazde și virulența tulpinilor de micromicete izolate.
3. Sunt necesare cercetări suplimentare privind efectele expunerii tulpinii fungice *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01 la radiațiile UV pe o durată mai mare de 40 de min.
4. Prezintă interes studierea utilizării în formula preparatului aditivilor cu rol de protecție sau aplicarea preparatului insecticid sub formă de tratament al semințelor.

BIBLIOGRAFIE

1. **MOLDOVAN, A.** 2012. Studii preliminare privind microflora fungică a speciei *Sitona lineatus* L. (Coleoptera, Curculionidae) pe teritoriul Republicii Moldova. In: *Culegerea Analele Ştiinţifice ale Universităţii de Stat din Moldova, Ştiinţe ale naturii şi exacte*, pp.15-18. ISSN 1857-3665. ISBN 978-9975-71-284-2.
2. **MOLDOVAN, A.** 2014. Studii preliminare privind microflora fungică a speciei *Hypera postica* (Gyll.) (Coleoptera, Curculionidae) pe teritoriul Republicii Moldova. In: *Rezumatele comunicărilor. Ştiinţe ale naturii şi exacte. Sesiunea naţională de comunicări ştiinţifice studenţeşti, 13-14 mai 2014, Chişinău, Republica Moldova.* pp. 13-15. ISBN 978-9975-71-509-6.
3. **MOLDOVAN, A**. 2018. Managementul dăunătorilor, bolilor şi buruienilor. In: CIUBOTARU, V. et al. *Manualul de instruire pentru formatori și fermieri: Sistemul de Agricultură Ecologică.* Chișinău: pp. 56-66. ISBN 978-9975-89-095-3.
4. **MOLDOVAN, A.** 2019. Controlul biologic al Coleopterelor Curculionoide (Coleoptera, Curculionoidea): probleme, realizări şi perspective. In: *Buletinul Academiei de Ştiinţe a Moldovei. Ştiinţele vieţii*, vol. 337, nr. 1, pp.131-142. ISSN 1857-064X.
5. **MOLDOVAN, A.,** MUNTEANU-MOLOTIEVSKIY, N. 2017. Evidențierea microflorei fungice a coleopterelor curculionide dăunători ai lucernei în Republica Moldova. In: Rezumate ale comunicărilor. *Științe ale naturii și exacte. Științe economice. Conferința științifică națională cu participare internațională "Integrare prin Cercetare și Inovare", 9-10 noiembrie, 2017, Universitatea de Stat din Moldova, Chișinău, Republica Moldova*. pp. 74-77. ISBN 978-9975-71-929-2.
6. **MOLDOVAN, A.,** MUNTEANU-MOLOTIEVSKIY, N. 2019. New *Beauveria bassiana* strain (Bals.-Criv.) Vuill., pathogenicity against weevil pests and physiological characterization. In: *Book of abstracts. International Congress on Invertebrate Pathology and Microbial Control & 52nd Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology & 17th Meeting of the IOBC-WPRS Working Group „Microbial and Nematode Control of Invertebrate Pests", 28th July - 1st August, 2019, Valencia, Spain*, p. 100.
7. **MOLDOVAN, A.**, MUNTEANU-MOLOTIEVSKIY, N., TODERAŞ, I. 2018. *Tulpină de fungi Beauveria bassiana – bioinsecticid pentru combaterea coleopterelor curculionide.* Brevet de invenție MD 4560 (13) B1, Int. Cl.: A01N 63/00 (2006.01); A01N 63/04 (2006.01); C12N 1/14 (2006.01); C12R 1/645 (2006.01); A01P 7/04 (2006.01). Institutul de Zoologie al Academiei de Ştiinţe a Moldovei. Nr. depozit a 2017 0057. Data depozit 23.05.2017. Publicat 30.04.2018. In: *BOPI*, vol. 4, pp. 51-52.
8. **MOLDOVAN, A.,** TODERAS, I., MUNTEANU-MOLOTIEVSKIY, N. 2018. Virulence of *Beauveria bassiana* against pe leaf weevil *Sitona lineatus* L. (Coleoptera Curculionoidae) a new strain from the Republic of Moldova. In: *Book of abstracts. International Conference on Microbial Biotechnology (4th edition), October 11-12, 2018, Chisinau, Republic of Moldova*. p. 106. ISBN 978-9975-3178-8-7.
9. **MOLDOVAN, A.,** TODERAS, I., LECLERQUE, A., MUNTEANU-MOLOTIEVSKIY, N. 2017. Isolation and identification of fungal community of alfalfa pest weevils (Coleoptera: Curculionidae) in the Republic of Moldova. In: *IOBC WPRS Bulletin*, vol. 129, pp. 70-73. ISSN 1027-3115.
10. MUNTEANU MOLOTIEVSKIY, N., BACAL, S., **MOLDOVAN, A**. 2015. Occurrence of *Sitona* weevils (Coleoptera, Curculionidae) in alfalfa crops in the Republic of Moldova. In: *Materialele Conferinței științifico-practice „Rezultatele cercetărilor la cultura plantelor de câmp în Republica Moldova", 19 iunie 2015, Bălți, Republica Moldova*. pp. 240-245.
11. MUNTEANU, N., MALEVANCIUC, N., TODERAS, I., **MOLDOVAN, A**., BACAL, S. 2012. Raspredelenie i biologicheskie osobennosti razvitiya vida *Sitona lineatus* (Coleoptera: Curculionidae) v Respublike Moldova. In: *Buletinul Academiei de Ştiinte. Ştiinţele vieţii*, vol. 3(318), pp. 131-138. ISSN 1857-064X. [in Russian].
12. MUNTEANU, N., TODERAŞ, I., **MOLDOVAN A.,** MALEVANCIUC, N., TODERAŞ, L., RAILEAN, N. 2013. *Tulpina Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki – insecticid biologic pentru combaterea coleopterelor curculionide.* Brevet de invenție 4196 (13) C1. Int. Cl.: A01N 63/00 (2006.01); C12N 1/20 (2006.01); C12R 1/07 (2006.01); A01P 7/04 (2006.01). Institutul de Zoologie

al Academiei de Ştiinţe a Moldovei. Nr. depozit a 2012 0040. Data depozit 2012.04.27. Publicat 2013.02.28. In: *BOPI*, 2013, vol. 2., p. 19.
13. MUNTEANU, N., BACAL, S., **MOLDOVAN, A.,** MALEVANCIUC, N., TODERAS, I. 2014 a. Beetle communities of alfalfa (*Medicago sativa* L.) in the Republic of Moldova. In: *APCBEE Procedia*, vol. 8, pp. 21-26. ISSN 2212-6708.
14. MUNTEANU, N.V., DANISMAZOGLU, M., **MOLDOVAN, A.I.,** TODERAS, I.K., NALCACIOGLU, R., DEMIRBAG, Z. 2014 b. The first study on bacterial flora of pest beetles *Sciaphobus squalidus*, *Tatianaerhynchites aequatus* and *Byctiscus betulae* in the Republic of Moldova. In: *Biologia*, vol. 69, nr. 5, pp. 681-690. e-ISSN 1336-9563, ISSN 0006-3088.
15. ABBOTT, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. In: *Journal of Economic Entomology*, vol. 18, nr. 2, pp. 265-267. e-ISSN 1938-291X.
16. ABE, A., ODA, Y., ASANO, K., SONE, T. 2006. The molecular phylogeny of the genus *Rhizopus* based on rDNA sequences. In: *Journal of Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, vol. 70, nr. 10, pp. 2387-2393. e-ISSN 1347-6947.
17. ABROL, D. P., SHANKAR, U. 2012. Chapter 1. History overview and principles of ecologically based pest management. In: ABROL D. P., SHANKAR U., eds. *Integrated Pest Management: Principles and Practice*, pp. 1-26. ISBN 978-1-84593-808-6.
18. AESCHLIMANN, J.P. 1980. The *Sitona* [Col.: Curculionidae] species occurring on *Medicago* and their natural enemies in the Mediterranean region. In: *Entomophaga*, vol. 25, pp. 139-153. ISSN 0013-8959.
19. AFANDHI, A., WIDJAYANTI, T., EMI, A.A.L., TARNO, H., AFIYANTI, M., HANDOKO, R. S. N. 2019. Endophytic fungi *Beauveria bassiana* Balsamo accelerates growth of common bean (*Phaeseolus vulgaris* L.). In: *Journal of Chemical and Biological Technologies in Agriculture* [online], vol. 6, nr. article 11 [citat 05.04.2020]. e-ISSN 2196-5641. Disponibil: https://doi.org/10.1186/s40538-019-0148-1
20. AHMED, S.A., van de SANDE, W.W.J., STEVENS, D.A., FAHAL, A., van DIEPENINGEN, A.D., MENKEN, S.B.J, de HOOG, G.S. 2014. Revision of agents of black-grain eumycetoma in the order Pleosporales. In: *Persoonia*, vol. 33, pp. 141-154. e-ISSN 1878-9080, ISSN 0031-5850.
21. AINSWORTH, G. C. 1976. *Introduction to the history of mycology*. Cambridge University Press, 359 p. ISBN 978-0521-21-013-3.
22. ALI, S., HUANG, Z., REN, S. 2010. Production of cuticle degrading enzymes by *Isaria fumosorosea* and their evaluation as a biocontrol agent against diamondback moth. In: *Journal of Pest Science*, vol. 83, pp. 361-370. e-ISSN 1612-4766, ISSN 1612-4758.
23. ALIMDZHANOV, R.A. 1951. *Klubenkovye dolgonosiki Uzbekistana*. Tashkent: Izd. AN UzSSR, 183 p.
24. ALMATAR, M., MAKKY, E.A. 2016. *Cladosporium cladosporioides* from the perspectives of medical and biotechnological approaches. In: 3 *Biotech* [online], vol. 6(1), nr. article 4 [citat 07.10.2019]. e-ISSN 2190-5738. Disponibil: https://doi.org/10.1007/s13205-015-0323-4
25. AL-QAYSI, S.A.S., AL-HAIDERI, H., THABIT, Z.A., ABD AL-RAZZAQ AL-KUBAISY, W.H., ABD AL-RAHMAN IBRAHIM, J. 2017. Production, characterization, and antimicrobial activity of mycocin produced by *Debaryomyces hansenii* DSMZ70238. In: *International Journal of Microbiology* [online], 9p [citat 07.06.2020]. e-ISSN 1687-9198, ISSN 1687-918X. Disponibil: https://doi.org/10.1155/2017/2605382
26. ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W., LIPMAN, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. In: *Journal of Molecular Biology*, vol. 215, nr. 3, pp.403-410. ISSN 0022-2836.
27. ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHAFFER, A.A., ZHANG, Z., MILLER, W., LIPMAN, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. In: *Nucleic Acids Research*, vol. 25, pp. 3389-3402. e-ISSN 1362-4962, ISSN 0305-1048.
28. *Anexa III, Convenţia de la Rotterdam privind procedura de consimţământ prealabil în cunoştinţă de cauză aplicabilă anumitor produşi chimici periculoşi şi pesticide care fac obiectul comerţului internaţional* [online]. Secretariat of the Rotterdam Convention – FAO [citat 04.04.2020]. Disponibil: http://www.pic.int/TheConvention/Chemicals/AnnexIIIChemicals/tabid/1132/language/en-US/Default.aspx

29. ANTONELLI, A., RETAN, A., O'KEEFFE, L.E., JOHANSEN, C. 1985. Pea leaf weevil: its biology and control. In: *Extension Bulletin 0903E* [online]. Washington State University, 3 p. [citat 07.06.2017].
Disponibil: https://research.wsulibs.wsu.edu/xmlui/bitstream/handle/2376/5245/eb0903e.pdf?sequence=1
30. *Anuarul statistic al Republicii Moldova* [online]. Chișinău: Biroul Național de Statistică al Republicii Moldova (Tipogr. "MS Logo"), col. red. VALCOV V. (președinte) et al. 2019, 472p. [citat 07.06.2020]. ISBN 978-9975-53-928-9. Disponibil: https://statistica.gov.md/public/files/publicatii_electronice/Anuar_Statistic/2019/Anuarul_statistic_2019.pdf
31. *Anuarul statistic al României* [online]. București: Institutul Național de Statistică al României, col. red.: TUDOREL A. (președinte) et al. 2019, 704 p. [citat 08.06.2020] ISSN 1220-3246. Disponibil: https://insse.ro/cms/sites/default/files/field/publicatii/anuarul_statistic_al_romaniei_carte_ro_1.pdf
32. ARMBRUST, E. J., WHITE, C. E., DEWITT, J. B. 1969. Lethal limits of low temperatures for the alfalfa weevil in Illinois. In: *Journal of Economic Entomology*, vol. 69, pp. 464-467. E-ISSN 1938-291X.
33. ARNOLDI, L.V., ZASLAVSKIY, V.A., TER-MINASYAN, M.E. 1965. Semeystvo Curculionidae – Dolgonosiki. In: BEJ-BIJENKO, V.G. ed., *Opredelitel nasekomykh Evropeiskoi chasti SSSR. Vol 2. Zhestkokrylye i veerokrylye*. Moskva, Leningrad: Nauka, pp. 485-621. [in Russian].
34. ARTEAU, M., LABRIE, S., ROY, D. 2010. Terminal-restriction fragment length polymorphism and automated ribosomal intergenic spacer analysis profiling of fungal communities in Camembert cheese. In: *International Dairy Journal*, vol. 20, nr.8, pp. 545-554. ISSN 0958-6946.
35. ARTHURS, S.P., THOMAS, M.B., LAWTON, J.L. 2001. Seasonal patterns of persistence and infectivity of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* in grasshopper cadavers in the Sahel. In: *Entomologia Experimentalis et Applicata*, vol. 100, nr.1, pp. 69-76. e-ISSN 1570-7458.
36. ASKARY, T.H. 2010. Nematodes as Biocontrol Agents. In: LICHTFOUSE E., eds. *Sociology, Organic Farming, Climate Change and Soil Science.* Netherlands: Springer, Dordrecht, pp. 347-368. EISBN 978-90-481-3333-8, ISBN 978-90-481-3332-1.
37. ATHANASSIOU, C.G., KAVALLIERATOS, N.G., RUMBOS, C.I., KONTODIMAS, D.C. 2017. Influence of temperature and relative humidity on the insecticidal efficacy of *Metarhizium anisopliae* against larvae of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) on wheat. In: *Journal of Insect Science* [online], vol. 17, nr. 1, nr. article 22, 7 p. [citat 08.09.2019]. e-ISSN 1536-2442. Disponibil: https://doi.org/10.1093/jisesa/iew107
38. BACAL, S., COCÎRȚĂ, P., MUNTEANU, N. 2014. *Metode și echipament de colectare a artropodelor. Ghid științifico-practic.* Chișinău: Tipografia AȘM, 52 p. ISBN 978-9975-62-380-3
39. BALANDINA, E.V. 2007. *Vidovoy sostav vrediteley kozlyatnika vostochnogo i priemy bor'by s nimi v Predural`e*: avtoreferat doktorskoy dissertatsii. Moskva, Spetsial'nost': Zashchita rasteniy, VAK 06.01.11. [in Russian].
40. BANJARA, N., NICKERSON, K., SUHR, M.J., HALLEN-ADAMS, H.E. 2016. Killer toxin from several food-derived *Debaryomyces hansenii* strains effective against pathogenic *Candida* yeasts. In: *International Journal of Food Microbiology*, vol. 222, pp. 23–29. ISSN 0168-1605.
41. BARATA, A., MALFEITO-FERREIRA, M., LOUREIRO, V. 2012. The Microbial ecology of wine grape berries. In: *International Journal of Food Microbiology*, vol. 153, pp. 243–259. ISSN 0168-1605.
42. BARDNER, R., FLETCHER, K.E. 1979. Larvae of the pea and bean weevil, *Sitona lineatus*, and the yield of field beans. In: *The Journal of Agricultural Science*, vol. 92, pp. 109-112. e-ISSN 1469-5146, ISSN 0021-8596.
43. BARDNER, R., FLETCHER, K.E., GRIFFITHS, D.C. 1983. Chemical control of the pea and bean weevil, *Sitona lineatus* L., and subsequent effects on the yield of field beans, *Vicia faba* L. In: *The Journal of Agricultural Science*, vol. 101, pp. 71-80. e-ISSN 1469-5146, ISSN 0021-8596.
44. BASIGALUP, D., GILETTA, M., ODORIZZI, A., AROLFO, V., SANCHEZ, F., URRETS ZAVALIA, G. 2018. An overview of alfalfa (*Medicago sativa* L.) situation in Argentina. In: *Proceedings of Second World Alfalfa Congress* [online]. 11-14 November, 2018, Cordoba, Argentina, pp. 25-29 [citat 05.03.2020]. Disponibil: http://www.worldalfalfacongress.org/resumenes.pdf

45. BATEMAN, R.P., CAREY, M., MOORE, D., PRIOR, C. 1993. The enhanced infectivity of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations to desert locusts at low humidities. In: *Annals of Applied Biology*, vol. 12, pp. 145-152. e-ISSN 1744-7348.
46. BAUTISTA-ROSALES, U.P., CALDERON-SANTOYO, M., SERVIN-VILLEGAS, R., OCHOA-ALVAREZ, N.A., VAZQUEZ-JUAREZ, R., RAGAZZO-SANCHEZ, J.A. 2014. Biocontrol action mechanisms of *Cryptococcus laurentii* on *Colletotrichum gloeosporioides* of mango. In: *Crop Protection*, vol. 65, pp. 194-201. ISSN 0261-2194.
47. BEDDING, R.A., MOLYNEUX, S. 1982. Penetration of insect cuticle by infective juveniles of *Heterorhabditis* spp. (Heterorhabditidae: Nematoda). In: *Nematologica*, vol. 28, pp. 354-359. e-ISSN 1875-2926, ISSN 0028-2596.
48. BEENA, K.R., ANANDA K., SRIDHAR, K.R. 2000. Fungal endophytes of three sand dune plant species of west coast of India. In: *Sydowia* [online], vol. 52, nr. 1, pp. 1-9 [citat 07.09.2018]. Disponibil: https://www.zobodat.at/pdf/Sydowia_52_0001-0009.pdf
49. BEGUIER, V., GUILLEMOT, E., JULIER, B. 2018. Alfalfa forage quality breeding in France: 30 years of common efforts from seed industry, dehydratation industry and public research. In: *Proceedings of Second World Alfalfa Congress* [online]. 11-14 November, 2018, Cordoba, Argentina, pp. 111-115 [citat 05.03.2020]. Disponibil: http://www.worldalfalfacongress.org/resumenes.pdf
50. BEKADA, A., BENAKRICHE, B., HAMADI, K., BENSOLTANE, A. 2008. Modelling of effects of water activity, pH and temperature on the growth rate of *Mucor racemosus* isolated from soft Camembert cheese. In: *World Journal of Agricultural Sciences*, vol. 4, nr. 6, pp. 790-794. e-ISSN 1817-5082, ISSN 1817-3047.
51. BELLEMAIN, E., CARLSEN, T., BROCHMANN, C., COISSAC, E., TABERLET, P., KAUSERUD, H. 2010. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. In: *BMC Microbiology* [online], vol. 10, nr. article 189, 9p., [citat 07.09.2018]. e-ISSN 1471-2180. Disponibil: https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-189
52. BELYAEV, I.M. 1934. Gorokhovye sloniki. In: *Byull. Mosk. s.-kh. oblastnoy opytn. st. Polevodstva*, n. 2, s. 122-126. [in Russian]
53. BEN SAAD, A.A., BISHOP, G.W. 1969. Egg-laying by the alfalfa weevil in weeds. In: *Journal of Economic Entomology*, vol. 62, pp. 1226-1227. e-ISSN 1938-291X.
54. BENNETT, B.C. 2011. Twenty-five economically important plant families [online]. *Encyclopedia of Life Support Systems(EOLSS)*. [citat 08.09.2018]. Disponibil: http://www.eolss.net/sample-chapters/c09/e6-118-03.pdf
55. BENSCH, K., BRAUN, U., GROENEWALD, J.Z., CROUS, P. W. 2012. The genus *Cladosporium*. In: *Studies in Mycology*, vol. 72, nr. 1, pp. 1-401. ISSN 0166-0616.
56. BENSCH, K., GROENEWALD, J.Z., DIJKSTERHUIS, J., STARINK-WILLEMSE, M., ANDERSEN, B., SUMMERELL, B.A., SHIN, H.D., DUGAN, F.M., SCHROERS, H.J., BRAUN, U., CROUS, P.W. 2010. Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (*Davidiellaceae*, Capnodiales). In: *Studies in Mycology*, vol. 67, pp. 1-94. ISSN 0166-0616
57. BERNY, P. 2007. Pesticides and the intoxication of wild animals. In: *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* [online], vol. 30, pp. 93-100 [citat 09.10.2018]. e-ISSN 1365-2885. Disponibil: https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2007.00836.x
58. BEZDICEK, D.F., QUINN, M.A., FORSE, L., HERON, D., KAHN. M.L. 1994. Insecticidal activity and competitiveness of *Rhizobium* spp. containing the *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* δ-endotoxin gene (cryIII) in legume nodules. In: *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 26, pp. 1637-1646. ISSN 0038-0717.
59. BEZVAL, V. 1912. *O vrednykh nasekomykh i merakh bor'by s nimi*. Kishinev: Tip. gubern. Pravleniya, 9 s. [in Russian].
60. BILGRAMI, A.L., GAUGLER, R. 2007. Effects of various stress factors on heat tolerance by *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae*. In: *Nematology*, vol. 9, pp. 161-167. e-ISSN 1568-5411, ISSN 1388-5545.
61. BOSCH van den, R., MESSENGER, P.S., GUTIERREZ, A.P. 1982. *An introduction to biological control*. New York and London: Plenum Press, 247 p. ISBN 978-1-4757-9162-4.

62. BOTHA, J., HARDIE, D., CASELLA, F. 2004. The pea leaf weevil, *Sitona lineatus*: Exotic threat to Western Australia [online]. *Plant Health Australia.* [citat 10.11.2017]. Disponibil: https://www.planthealthaustralia.com.au/wp-content/uploads/2013/03/Pea-leaf-weevil-CP-2005.pdf
63. BOUCIAS, D.G., LATGE, J.P. 1988. Nonspecific induction of germination of *Conidiobolus obscurus* and *Nomuraea rileyi* with host and nonhost cuticle extracts. In: *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 51, nr.2, pp. 168-171. ISSN 0022-2011.
64. BOUCIAS, D.G., PENDLAND, J.C. 1984. Nutritional requirements for conidial germination of several host range pathotypes of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. In: *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 43, nr. 2, pp. 288-292. ISSN 0022-2011.
65. BOUCIAS, D.G., PENDLAND, J.C., LATGE, J.P. 1988. Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic Deuteromycetes to host insect cuticle. In: *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 54, pp. 1795-1805. e-ISSN 1098-5336, ISSN 0099-2240.
66. BOURRET, T.B., GROVE, G.G., VANDEMARK, G.J., HENICK-KLING, T., GLAWE, D.A. 2013. Diversity and molecular determination of wild yeasts in a central Washington State vineyard. In: *North American Fungi*, vol. 8, nr. 15, pp. 1-32. ISSN 1937-786X.
67. BOYETCHKO, S., PEDERSEN, E., PUNJA, Z., REDDY, M. 1999. Formulation of Biopesticides. In: HALL, F.R., Menn, J.J. eds., *Biopesticides: Use and Delivery Methods in Biotechnology*. Totowa, New Jersey, USA: Humana Press, pp.487-508. e-ISBN 978-1-59259-483-2, ISBN 978-0-89603-515-7.
68. BOZHÜYÜK, A.U., KORDALI, S., KESDEK, M., ŞIMŞEK, D., ALTINOK, M.A., ALTINOK, H.H., AMAN KOMAKI, 2018. M. Mortality effects of six different entomopathogenic fungi strains on rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). In: *Fresenius Environmental Bulletin*, vol. 27, nr. 6, pp. 4373-4380. ISSN 1018-4619.
69. BOZOUDI, D., TSALTAS, D. 2018. The multiple and versatile roles of *Aureobasidium pullulans* in the vitivinicultural sector. In: *Fermentation* [online], vol. 4, nr. 4, nr. article 85, 15p [citat 06.02.2020]. Disponibil: https://doi.org/10.3390/fermentation4040085
70. BRAGA, G.U.L., FLINT, S.D., MESSIAS, C.L., ANDERSON, A.J., ROBERTS, D.W. 2001. Effects of UV-B irradiance on conidia and germinants of the entomopathogenic Hyphomycete *Metarhizium anisopliae*: a study of reciprocity and recovery. In: *Photochemistry and Photobiology*, vol. 73, pp. 140-146. e-ISSN 1751-1097.
71. BRANDA, E., TURCHETTI, B., DIOLAIUTI, G., PECCI, M., SMIRAGLIA. C., BUZZINI, P. 2010. Yeast and yeast-like diversity in the southernmost glacier of Europe (Calderone Glacier, Apennines, Italy). In: *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 72, nr. 3, pp. 354-369. e-ISSN 1574-6941, ISSN 0168-6496.
72. BREUER, U., HARMS, H. 2006. *Debaryomyces hansenii*-an extremophilic yeast with biotechnological potential. In: *Yeast* [online], vol. 23, nr. 6, pp. 415-437 [citat 06.09.2017]. Disponibil: https://doi.org/10.1002/yea.1374
73. BROWN, A.H.S., SMITH, G. 1957. The genus *Paecilomyces* Bainier and its perfect stage *Byssochlamys* Westling. In: *Transactions of the British Mycological Society*, vol. 40, 1, pp. 17-89. ISSN 0007-1536.
74. BUCUREAN, E. 2008. Structure of the pest entomofauna of red clover seed and control of the clover weevils. In: *An. Univ. din Oradea, Fascicula: Protecţia Mediului*, vol. 13, pp. 31-37. ISSN 1584-9864.
75. BUDZISZEWSKA, J., PIATKOWSKA, J., WRZOSEK, M. 2010. Taxonomic position of *Mucor hiemalis* f. *luteus*. In: *Mycotaxon*, vol. 111, pp. 75-85. e-ISSN 2154-8889, ISSN 0093-4666.
76. BUKOVSKA, P., JELINKOVA, M., HRSELOVA, H., SYKOROVA, Z., GRYNDLER, M. 2010. Terminal restriction fragment length measurement errors are affected mainly by fragment length, G+C nucleotide content and secondary structure melting point. In: *Journal of Microbiological Methods*., vol. 82, nr. 3, pp. 223-228. ISSN 0167-7012.
77. BURGES, H.D. 1998. Formulation of mycoinsecticides. In: BURGES, H.D. ed., *Formulation of Microbial Biopesticides: Beneficial Microorganisms, Nematodes and Seed Treatments*. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishing, pp. 131–186. ISBN 978-94-011-4926-6.
78. BUSTAMANTE de, O. M., LEIVA, S., MENDOZA, J.E., BOBADILLA, L., ANGULO, G., CALDERON, M.S. 2019. Phylogeny and species delimitations in the entomopathogenic genus

Beauveria (Hypocreales, Ascomycota), including the description of *B. peruviensis* sp. nov. In: *MycoKeys*, vol. 58, pp. 47-68. e-ISSN 1314-4049, ISSN 1314-4057.
79. BUTT, T.M. 2002. Use of entomogenous fungi for the control of insect pests. In: KEMPKEN F. ed., *The Mycota XI, Agricultural Applications*. Berlin: Springer, pp. 111-134. ISBN 978-3-662-03059-2
80. BUTT, T.M., GOETTEL, M.S. 2000. Bioassays of Entomogenous Fungi. In: NAVON, A., ASCHER K. R. S. eds., *Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes*. Wallingford, United Kingdom: CABI Publishing, pp. 141-195. ISBN 978-0-851-99422-2.
81. BUTT, T.M., WANG, C., SHAH, F. A., HALL, R. 2006. Degeneration of entomogenous fungi. In: EILENBERG J., HOKKANEN H. M. T. eds., *An Ecological and Societal Approach to Biological Control*. Dordrecht, Netherlands: Springer, pp. 213-226. ISBN 978-1-4020-4401-4.
82. BUZINA, W., BRAUN, H., FREUDENSCHUSS, K., LACKNER, A., HABERMANN, W., STAMMBERGER, H. 2003. Fungal biodiversity-as found in nasal mucus. In: *Medical Mycology*, vol. 41, nr. 2, pp. 149-161. e-ISSN 1460-2709, ISSN 1369-3786.
83. CAI, J., ROBERTS, I.N., COLLINS, M.D. 1996. Phylogenetic relationships among members of the ascomycetous yeast genera *Brettanomyces, Debaryomyces, Dekkera*, and *Kluyveromyces* deduced by small-subunit rRNA gene sequences. In: *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol. 46, nr. 2, pp. 542-549. ISSN 0020-7713.
84. CAMPBELL, W.V., BUSBICE, T.H., FALTER, J.M., GLOVER, J.W. 1975. Alfalfa weevil and its management in North Carolina. North Carolina Agric. Exp. St. Tech. Bull. No. 234.
85. CANTOT, P. 1989. Action larvaire de *Sitona lineatus* L. sure quelques facteurs de production du pois proteagineux (*Pisum sativum* L.). In: *Agronomie*, vol.9, pp. 765-770. ISSN 0249-5627.
86. CARCAMO, H.A, HERLE, C.E., LUPWAYI, N.Z. 2015. *Sitona lineatus* (Coleoptera: Curculionidae) larval feeding on *Pisum sativum* L. affects soil and plant nitrogen. In: *Journal of Insect Science* [online], vol. 15, nr. 1, article nr. 74, 5p [citat 05.09.2019]. e-ISSN 1536-2442. Disponibil: https://doi.org/10.1093/jisesa/iev055
87. CARCAMO, H., VANKOSKY, M. Managing the pea leaf weevil in field peas. In: *Prairie Soils Crops* [online]. 2011, vol. 4, pp. 77–85 [citat 07.08.2015]. Disponibil: https://prairiesoilsandcrops.ca/articles/volume-4-9-screen.pdf
88. CARCAMO, H.A., VANKOSKY, M.A., WIJERATHNA, A., OLFERT, O.O., MEERS, S.B., EVENDEN, M.L. 2018. Progress toward integrated pest management of pea leaf weevil: a review. In: *Annals of the Entomological Society of America*, vol. 111, nr. 4, pp. 144–153. e-ISSN 1938-2901, ISSN 0013-8746.
89. CASSAGRANDE, R.A., STEHR, F.W. 1973. Evaluating the effects of harvesting alfalfa on alfalfa weevil (Coleoptera: Curculionidae) and parasite populations in Michigan. In: *Canadian Entomologist*, vol. 105, pp. 1119-1128. e-ISSN 1918-3240, ISSN 0008-347X.
90. CASTANARES, E.S., STENGLEIN, A., DINOLFO, M.I., MORENO, M.V. 2011. *Fusarium tricinctum* associated with head blight on wheat in Argentina. In: *Plant Disease*, vol. 95, nr. 4, p. 496. e-ISSN 1943-7692, ISSN 0191-2917.
91. CASTELLANOS-MOGUEL, J., MIER, T., REYES-MONTES, M., NAVARRO BARRANCO, H., ZEPEDA RODRÍGUEZ, A., PÉREZ-TORRES, A., TORIELLO, C. 2013. Fungal growth development index and ultrastructural study of whiteflies infected by three *Isaria fumosorosea* isolates of different pathogenicity. In: *Revista Mexicana de Micologia*, vol. 38, pp. 23-33. ISSN 0187-3180.
92. CASTILLO, M.A. 1999. Insecticidal, anti-juvenile hormone, and fungicidal activities of organic extracts from different *Penicillium* species and their isolated active components. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 47, nr. 5, pp. 2120-2124. e- ISSN 1520-5118, ISSN 0021-8561.
93. CHANDLER, D., HEALE, J.B., GILLESPIE, A.T. 1994. Effect of osmotic potential on the germination of conidia and colony growth of *Verticillium lecanii*. In: *Mycological Research*, vol. 98, nr. 4, pp. 384-388, ISSN 0953-7562.
94. CHANDRA TEJA, K.N.P., RAHMAN, D.S.J. 2016. Characterisation and evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin strains for their temperature tolerance. In: *Mycology*, vol. 7, nr. 4, pp. 171-179. e-ISSN 2150-1211, ISSN 2150-1203.

95. CHANDRA, A. 2009. Screening global *Medicago* germplasm for weevil (*Hypera postica* (Gyll.) tolerance and estimation of genetic variability using molecular markers. In: *Euphytica*, vol. 169, nr. 3, pp. 363-374. e-ISSN 1573-5060, ISSN 0014-2336.
96. CHEN, W.H., MAN, L., HUANG, Z.X., YANG, G.M., HAN, Y.F., LIANG, J.D., LIANG, Z.Q. 2018. *Beauveria majiangensis*, a new entomopathogenic fungus from Guizhou, China. In: *Phytotaxa*, vol. 333, pp. 243-250. e-ISSN 1179-3163, ISSN 1179-3155.
97. CHI, Z., WANG, F., CHI, Z., YUE, L., LIU, G., ZHANG, T. 2009. Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast. In: *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 82, pp. 793-804. e-ISSN 1432-0614, ISSN 0175-7598.
98. CHOI, J.S., WESTERMAN, J.M., MORRISON, C.J. 1998. Rapid differentiation of filamentous fungi using species-specific DNA probes. In: *Abstracts of the 98th General Meeting of the American Society for Microbiology*. Washington, D.C., United States of America, p. 179.
99. CHRISTAKOPOULOS, P., KEKOS, D., MACRIS, B.J., CLAEYSSEN, M. 1995. Purification and mode of action of a low molecular mass endo-1,4-B-D-glucanase from *Fusarium oxysporum*. In: *Journal of Biotechnology*, vol. 39, pp. 85-93. ISSN 0168-1656.
100. CHRISTAKOPOULOS, P., NERINCKX, W., KEKOS, D., MACRIS, B., CLAEYSSENS, M. 1996. Purification and characterization of two low molecular mass alkaline xylanases from *Fusarium oxysporum* F3. In: *Journal of Biotechnology*, vol. 51, pp. 181-180. ISSN 0168-1656.
101. CHRISTIAS, C.H., HATZIPAPAS, P., DARA, A., KALIAFAS, A., CHRYSANTHIS, G. 2001. *Alternaria alternata*, a new pathotype pathogenic to aphids. In: *BioControl*, vol. 46, nr. 1, pp. 105-124. e-ISSN 1573-8248, ISSN 1386-6141.
102. COLES, L.W., DAY, W. H. 1977. The fecundity of *Hypera postica* from three locations in the eastern United States. In: *Environmental Entomology*, vol. 6, pp. 211-212. e-ISSN 1938-2936, ISSN 0046-225X.
103. COPPING, L.G. 2004. *The Manual of Biocontrol Agents (3rd ed.)*. Alton, UK: British Crop Protection, 702 p. ISBN 1901396355.
104. CORRE-HELLOU, G., CROZAT, Y. 2005. N_2 fixation and N supply in organic pea (*Pisum sativum* L.) cropping systems as affected by weeds and pea weevil (*Sitona lineatus* L.). In: *European Journal of Agronomy*, vol. 22, pp. 449-458. ISSN 1161-0301.
105. CRICKMORE, N., BAUM, J., BRAVO, A., LERECLUS, D., NARVA, K., SAMPSON, K., SCHNEPF, E., SUN, M., ZEIGLER, D.R. 2018. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature [online]. [citat 05.03.2020]. Disponibil: http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/intro.html
106. CRISTEA, S. 2002. *Fitopatologie generală pentru studenţii Facultăţii de Agricultură: lucrări practice*. 120 p.
107. CROUS, P.W., GROENEWALD, J.Z. 2011. Why everlastings don't last. In: *Persoonia*, vol. 26, pp. 70-84. e-ISSN 1878-9080, ISSN 0031-5850.
108. CROUS, P.W., GROENEWALD, J.Z. 2013. A phylogenetic re-evaluation of *Arthrinium*. In: *IMA Fungus*, vol. 4, nr. 1, pp. 133-154. ISSN 2210-6359.
109. CURTIS de, F., de FELICE, D.V., IANIRI, G., de CICCO, V., CASTORIA, R. 2012. Environmental factors affect the activity of biocontrol agents against ochratoxigenic *Aspergillus carbonarius* on wine grape. In: *International Journal of Food Microbiology*, vol. 159, pp. 17–24. ISSN 0168-1605.
110. DAL BELLO, G. 2008. First report of *Trichothecium roseum* causing postharvest fruit rot of tomato in Argentina. In: *Australasian Plant Disease Notes* [online], vol. 3, pp. 103–104 [citat 08/07.2017]. e-ISSN 1833-928X. Disponibil: https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/BF03211257.pdf
111. DAMALAS, C.A., ELEFTHEROHORINOS, I.G. 2011. Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. In: *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol. 8, nr. 5, pp. 1402-1419. ISSN 1661-7827.
112. DAMM, U., VERKLEY, G.J., CROUS, P.W., FOURIE, P.H., HAEGI, A., RICCIONI, L. 2008. Novel *Paraconiothyrium* species on stone fruit trees and other woody hosts. In: *Persoonia*, vol. 20, pp. 9-17. e-ISSN 1878-9080, ISSN 0031-5850.
113. DAVIDSON, G., PHELPS, K., SUNDERLAND, K., PELL, J., BALL, B., SHAW, K., CHANDLER, D. 2003. Study of temperature–growth interactions of entomopathogenic fungi with potential for control of *Varroa destructor* (Acari: Mesostigmata) using a nonlinear model of poikilotherm development. In: *Journal of Applied Microbiology* [online], vol. 94, pp. 816-825 [citat 15.10.2018]. e-ISSN 1365-2672.

Disponibil: https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-2672.2003.01871.x
114. DAYNES, C.N., ZHANG, N., SALEEBA, J.A., MCGEE, P.A. 2012. Soil aggregates formed in vitro by saprotrophic *Trichocomaceae* have transient water-stability. In: *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 48, pp. 151-161. ISSN 0038-0717.
115. DeBACH, P. 1974. *Biological control by natural enemies*. London, UK: Cambridge University Press, 323 p. ISBN 978-0521098359.
116. DESNOS-OLLIVIER, M. 2008. *Debaryomyces hansenii* (*Candida famata*), a rare human fungal pathogen often misidentified as *Pichia guilliermondii* (*Candida guilliermondii*). In: *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 46, nr. 10, pp. 3237–3242. e-ISSN 1098-660X, ISSN 0095-1137
117. DHALIWAL, G.S., JINDAL, V., MOHINDRU, B. 2015. Crop losses due to insect pests: Global and Indian scenario. In: *Indian Journal of Entomology*, vol. 77, nr. 2, pp. 165-168. e-ISSN 0974-8172, ISSN 0367-8288.
118. DHIMAN, S.C., POOJA, A. 2005. Biocontrol agents of *Pauropsylla depressa* Crawford (Homoptera: Psyllidae). In: *Journal of Applied Zoological Researches*, vol. 16, nr. 1, pp. 36-38. ISSN 0970-9304.
119. DIAS, B.A., NEVES, P.M., FURLANETO-MAIA, L., FURLANETO, M.C. 2008. Cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the presence of coffee berry borer cuticle. In: *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 39, nr. 2, pp. 301-306. ISSN 1517-8382.
120. DIECKMANN, L. 1982. Acales - Studien (Coleoptera, Curculionidae). In: *Entomol. Nachr. and Ber.*, vol. 26, nr.5., pp. 195-209.
121. DING, B., YIN, Y., ZHANG, F., LI, Z. 2011. Recovery and phylogenetic diversity of culturable fungi associated with marine sponges *Clathrina luteoculcitella* and *Holoxea* sp. in the South China Sea. In: *Marine Biotechnology*, vol. 13, nr. 4, pp. 713-721. e-ISSN 1436-2236, ISSN 1436-2228.
122. Directiva 2009/127/CE privind echipamentele tehnice de aplicare a pesticidelor [online, citat 22.10.2018]. Disponibil: https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:310:0029:0033:RO:PDF
123. Directiva 2009/128/CE privind utilizarea durabilă a pesticidelor [online, citat 22.10.2018]. Disponibil: https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:309:0071:0086:RO:PDF
124. DOMSCH, K.H., GAMS, W., ANDERSON, T.-H. 2007. *Compendium of soil fungi*. London, UK: Academic Press (London) Ltd., 672p. ISBN 0122204026.
125. DONTHI, S., SIVASAI, K. S. R., LAKSHMI, V. V., LATHA, G. S., MURTHY, K. J. R. 2011. Prevalence of inhalant allergens in nasobronchial allergy in Hyderabad region: India. In: *International Journal of Science and Research.*, vol. 3, pp. 192-199. ISSN 2319-7064.
126. DORE, T., MEYNARD, J.M. 1995. On-farm analysis of attacks by the pea weevil (*Sitona lineatus* L.; Col., Curculionidae) and the resulting damage to pea (*Pisum sativum* L.) crops. In: *Journal of Applied Entomology* [online], vol. 119, pp. 49-54 [citat 25.11.2018]. e-ISSN 1439-0418. Disponibil: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1439-0418.1995.tb01242.x
127. DOUTT, R.L. 1964. The historical development of biological control. p. 21-42. In: DEBACH, P., ed. *Biological Control of Insect Pests and Weeds*. London, UK: Chapman and Hall Ltd, 844 pp.
128. DOWNES, W. 1938. The occurrence of *Sitona lineatus* in British Columbia. In: *Canadian Entomologist*, vol. 70, p. 22. e-ISSN 1918-3240, ISSN 0008-347X.
129. DRIESCHE van, R.G., BELLOWS, JR., T.S. 1996. *Biological control*. New York: Chapman and Hall, pp. 3-20, 539 p. ISBN 978-1461284901.
130. *Ecologically based pest management: new solutions for a new century*. Washington, D.C., USA: National Academy Press, 1996, 160p. ISBN: 978-0-309-05330-3.
131. ELDAROV, M.A., MARDANOV, A.V., BELETSKY, A.V., DZHAVAKHIYA, V.V., RAVIN, N.V., SKRYABIN, K.G. 2012. Complete mitochondrial genome of compactin-producing fungus *Penicillium solitum* and comparative analysis of *Trichocomaceae* mitochondrial genomes. In: *FEMS Microbiology Letters*, vol. 329, nr. 1, pp. 9-17. e-ISSN 1574-6968, ISSN 0378-1097.
132. EL-SAYED, A.S.A., ALI, G.S. 2020. *Aspergillus flavipes* is a novel efficient biocontrol agent of *Phytophthora parasitica*. In: *Biological Control* [online], vol. 140, article nr. 104072 [citat 07.06.2020]. ISSN 1049-9644.
Disponibil: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1049964419302464

133. EL-SAYED, A.S.A., YASSIN, M.A., ALI, G.S. 2015. Transcriptional and proteomic profiling of *Aspergillus flavipes* in response to sulfur starvation. In: *PLoS ONE* [online], vol. 10, nr. 12, pp.144-304 [citat 12.11.2018]. e-ISSN 1932-6203. Disponibil: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144304
134. ESTER, A., JEURING, G. 1992. Efficacy of some insecticides used in coating faba beans to control pea and bean weevil (*Sitona lineatus*) and the relation between yield and attack. In: *FABIS Newsletter*, vol. 30, pp. 32-41. ISSN 0255-6448.
135. *FAO, FAOSTAT* [online]. 2019. Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistical Database [citat 07.09.2019]. Disponibil: http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC
136. FARGUES, J., GOETTEL, M., SMITS, N., OUEDRAOGO, A., ROUGIER, M. 1997. Effect of temperature on vegetative growth of *Beauveria bassiana* isolates from different origins. In: *Mycologia*, vol. 89, nr. 3, pp. 383-392. e-ISSN 1557-2536, ISSN 0027-5514.
137. FARGUES, J., REMAUDIERE, G. 1977. Considerations on the specificity of entomopathogenic fungi. In: *Mycopathologia*, vol. 62, pp. 31-40. e-ISSN 1573-0832, ISSN 0301-486X.
138. *Fauna Europaea*, *Protapion apricans* (Herbst, 1797) [citat 17.06.2019]. Disponibil: https://fauna-eu.org/cdm_dataportal/taxon/f7105a9b-a29d-4b5f-af4c-5bdc46f2cc18
139. *Fauna Europaea*, *Sitona lineatus* (Linnaeus, 1758) [citat 17.06.2019]. Disponibil: https://fauna-eu.org/cdm_dataportal/taxon/71df01c1-672d-444d-a0c6-c8f0e61ef49c
140. FEDERICI, B.A. 1993. Viral pathobiology in relation to insect control. In: BECKAGE N.E., THOMPSON S.N., FEDERICI B.A. eds. *Parasites and pathogens of insects. Vol. 2.* San Diego, CA: Academic Press, pp. 81-101.
141. FERGUSON, A.W. 1994. Pests and plant injury on lupins in the south of England. In: *Crop Protection*, vol. 13, pp. 201-210. ISSN 0261-2194.
142. FERRARI, B.C., ZHANG, C., van DORST, J. 2011. Recovering greater fungal diversity from pristine and diesel fuel contaminated sub-Antarctic soil through cultivation using both a high and a low nutrient media approach. In: *Frontiers in Microbiology* [online], vol. 2, nr. article 217, 14p., [citat 07.09.2018]. e-ISSN 1664-302X.
Disponibil: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2011.00217/full
143. FERRON, P. 1978. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. In: *Annual Review of Entomology*, vol. 23, pp. 409-442. e-ISSN 1545-4487.
144. FICK, G.W. 1976. Alfalfa weevil effects on regrowth of alfalfa. In: *Agronomy Journal*, vol. 68, pp. 809-812. e-ISSN 1435-0645.
145. FICK, G.W., LIU, B.W.Y. 1976. Alfalfa weevil effects on root reserves, development rate, and canopy structure of alfalfa. In: *Agronomy Journal*, vol. 68, pp. 595-599. e-ISSN 1435-0645.
146. FISHER, J.R., O'KEEFFE, L.E. 1979a. Seasonal migration and flight of the pea leaf weevil, *Sitona lineatus* (Coleoptera: Curculionidae) in northern Idaho and eastern Washington. In: *Entomologia Experimentalis et Applicata*, vol. 26, pp. 189-196. e-ISSN 1570-7458.
147. FISHER, J.R., O'KEEFFE, L.E. 1979b. Host potential of some cultivated legumes for the pea leaf weevil, *Sitona lineatus* (Linnaeus) (Coleoptera: Curculionidae). In: *Pan Pacific Entomologist*, vol. 55, pp. 199-201. ISSN 0031-0603.
148. FISHER, J.R., O'KEEFFE, L.E. 1979c. Food plants of the pea leaf weevil *Sitona lineatus* (Linnaeus) (Coleoptera: Curculionidae) in northern Idaho and eastern Washington. In: *Pan Pacific Entomologist*, vol. 55, pp. 202-207. ISSN 0031-0603.
149. FREDERIC, B., TUERY, K., BOUGARD, D., NICAUD, J.-M., MOULIN, G. 2003. Yeast sequencing report identification of a triacylglycerol lipase gene family in *Candida deformans*: molecular cloning and functional expression. In: *Yeast* [online], vol. 20, pp. 233–248 [citat 25.07.2017]. Disponibil: https://doi.org/10.1002/yea.958
150. FRIEDMAN, A.L., FREIDBERG, A. 2007. The Apionidae of Israel and the Sinai Peninsula (Coleoptera: Curculionoidea). In: *Israel Journal of Entomology*, vol. 37, pp. 55–180. ISSN 0075-1243.
151. GADANHO, M., SAMPAIO, J. P. 2002. Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodotorula*: *Rh. glutinis* sensu stricto and *Rh. dairenensis* comb. nov. In: *FEMS Yeast Research*, vol. 2, nr. 1, pp. 47-58. e-ISSN 1567-1364, ISSN 1567-1356.
152. GALAFASSI, S. 2012. Lipid production for second generation biodiesel by the oleaginous yeast *Rhodotorula graminis*. In: *Bioresource Technology*, vol. 111, pp. 398-403. ISSN 0960-8524.

153. GARCIA, E., ALONSO, A., PLATAS, G., SACRISTAN, S. 2013. The endophytic mycobiota of *Arabidopsis thaliana*. In: *Fungal Diversity*, vol. 60, pp. 71-89. e-ISSN 1878-9129, ISSN 1560-2745.
154. GARDNER, D., PUTNAM, D. H. 2018. Alfalfa situation in the USA and Canada. In: *Proceedings of Second World Alfalfa Congress* [online]. 11-14 November, 2018, Cordoba, Argentina, pp. 30-33[citat 05.03.2020]. Disponibil: http://www.worldalfalfacongress.org/resumenes.pdf
155. GASIC, S., TANOVIC, B. 2013. Biopesticide formulations, possibility of application and future trends. In: *Pesticides and Phytomedicine*, vol. 28, nr. 2, pp. 97-102. e-ISSN 2406-1026, ISSN 1820-3949.
156. GAUR, R., SINGH, R. K., GUPTA, M., KUMAR GAUR, M. 2010. *Aureobasidium pullulans*, an economically important polymorphic yeast with special reference to pullulan. In: *African Journal of Biotechnology*, vol. 9, nr. 47, pp. 7989-7997. ISSN 1684-5315.
157. GEHLOT, P., PUROHIT, D.K., SINGH, S.K. 2011. Molecular diagnostics of human pathogenic *Aspergillus* species In: *Indian Journal of Biotechnology* [online], vol. 10, nr. 2, pp. 207-211. e-ISSN 0975-0967, ISSN 0972-5849.
Disponibil: http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/11449/1/IJBT%2010%282%29%20207-211.pdf
158. GELERNTER, W.D., SCHWAB, G.E. 1993. Transgenic bacteria, viruses, algae, and other microorganisms as *Bacillus thuringiensis* toxin delivery systems. In: ENTWISTLE, P. F., CORY, J. S., BAILEY, M. J., HIGGS, S., eds. *Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice*. Chichester (UK): John Wiley & Sons, pp. 89-104. ISBN 978-0471933069.
159. GEORGE, K.S. 1962. Root nodule damage by larvae of *Sitona lineatus* and its effect on yield of green peas. In: *Plant Pathology*, vol. 11, pp. 172-176. e-ISSN 1365-3059.
160. GEORGIS, R., GAUGLER, R. 1991. Predictability in biological control using entomopathogenic nematodes. In: *Journal of Economic Entomology*, vol. 84, pp. 713-720. e-ISSN 1938-291X.
161. GHERBAWY, Y.A., HUSSEIN, N.A. 2010. Molecular characterization of *Mucor circinelloides* and *Rhizopus stolonifer* strains isolated from some saudi fruits. In: *Foodborne Pathogens and Disease*, vol.7, nr. 2, pp. 137-142. e-ISSN 1556-7125, ISSN 1535-3141.
162. GHIZDAVU, I., PASOL, P., PALAGESIU, I., BOBIRNAC, B., FILIPESCU, C., MATEI, I., GEORGESCU, T., BAICU, T., BARBULESCU, A. 1997. *Entomologie agricolă*. București: Editura Didactică și Pedagogică, R.A., 435 p. ISBN 973-40-0397-6.
163. GILES, K.L., OBRYCKI, J.J., DEGOOYER, T.A. 1994. Prevalence of predators associated with *Acyrthosiphon pisum* (Homoptera: Aphididae) and *Hypera postica* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae) during growth of the first crop of alfalfa. In: *Biological Control*, vol. 4, nr. 2, pp. 170-177. ISSN 1049-9644.
164. GÎDEI, P, POPESCU, I. 2014. *Ghidul coleopterelor din România Vol II*. Iași: PIM, 531p. ISBN 978-606-13-2089-9.
165. GOBLE, T.A., COSTET, L., ROBENE, I., NIBOUCHE, S., RUTHERFORD, R.S., CONLONG, D.E., HILL, M.P. 2012. *Beauveria brongniartii* on white grubs attacking sugarcane in South Africa. In: *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 111, nr. 3, pp. 225-236. ISSN 0022-2011.
166. GODFRAY, H.C.J. 1994. *Parasitoids: Behavioral and Evolutionary Ecology.* Princeton University Press, 488 p. ISBN 0-691-00047-6.
167. GOETTEL, M.S., POPRAWSKI, J.D., VANDERBERG, J.D., LI, Z., ROBERTS, D.W. 1990. Safety to nontarget invertebrates of fungal biocontrol agents. In: LAIRD, M., LACEY, L.A., DAVIDSON, E.W., eds. *Safety of microbial insecticides*. Boca Raton, Florida: CRC Press, pp. 209-231. ISBN 0-8493-4793-9.
168. GONG, J., LU, Z., XU, Z. 2011. Isolation, identification and culture optimization of a novel glycinonitrile hydrolyzing fungus - *Fusarium oxysporum* H3. In: *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 165, pp. 963-977. e-ISSN 1559-0291, ISSN 0273-2289.
169. GORDON, T.R., MARTYN, R.D. 1997. The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. In: *Annual Review of Phytopathology*, vol. 35, pp. 111-128. e-ISSN 1545-2107.
170. GORFER, M., BLUMHOFF, M., KLAUBAUF, S., URBAN, A., INSELSBACHER, E., BANDIAN, D., MITTER, B., SESSITSCH, A., WANEK, W., STRAUSS, J. 2011. Community profiling and gene expression of fungal assimilatory nitrate reductases in agricultural soil. In*: ISME Journal*, vol. 5, nr. 11, pp. 1771-1783. e-ISSN 1751-7370, ISSN 1751-7362.

171. GORI, K., SORENSEN, S.M., PETERSEN, M.A., JESPERSEN, L., ARNEBORG. N. 2012. *Debaryomyces hansenii* strains differ in their production of flavor compounds in a cheese-surface model. In: *Microbiology Open*, vol. 1, nr. 2, pp. 161–168 e-ISSN 2045-8827.
172. GOSTINCAR, C., OHM, R. A., KOGEJ, T., SONJAK, S., TURK, M., ZAJC, J., ZALAR, P., GRUBE, M., SUN, H., HAN, J. 2014. Genome sequencing of four *Aureobasidium pullulans* varieties: biotechnological potential, stress tolerance, and description of new species. In: *BMC Genomics*, vol. 15, article nr. 549, 28p. ISSN 1471-2164.
173. GREIB, G., KLINGAUF, F. 1977. Untersuchungen zum Fraβpflanzenspektrum von *Sitona lineatus* L. (Curcul., Coleopt.). In: *Journal of Applied Entomology* [online], vol. 82, pp. 267-274 [citat 05.06.2017]. e-ISSN 1439-0418.
Disponibil: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1439-0418.1976.tb03409.x
174. GRIFFITHS, D.C., BARDNER, R., BATER, J. 1986. Control of *Sitona lineatus* in autumn-sown faba beans. In: *FABIS Newsletter*, vol. 14, pp. 30-33.
175. HAGEN, K.S., FRANZ, J.M. 1973. A history of biological control. p. 433-476. In: SMITH, R. F. MITTLER, T. E., SMITH, C. N. eds. *A History of Entomology*. Palo Alto, California: Annu. Rev. Inc., 517 p. ISBN 978-0686092988.
176. HALLSWORTH, J.E., NARESH, M. 1999. Water and temperature relations of growth of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana*, Metarhizium *anisopliae*, and *Paecilomyces farinosus*. In: *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 74, pp. 261-266. ISSN 0022-2011.
177. HAMON, N., BARDNER, R., ALLEN-WILLIAMS, L., LEE, J. B. 1987. Flight periodicity and infestation size of *Sitona lineatus*. In: *Annals of Applied Biology*, vol. 111, pp. 271-284. e-ISSN 1744-7348.
178. HAMON, N., BARDNER, R., ALLEN-WILLIAMS, L., LEE, J.B. 1990. Carabid populations in field beans and their effect on the population dynamics of *Sitona lineatus* (L.) In: *Annals of Applied Biology*, vol. 117, pp. 51-62. e-ISSN 1744-7348.
179. HAN, G., FENG, X., JIA, Y., WANG, C., HE, X., ZHOU, Q., TIAN, X. 2011. Isolation and evaluation of terrestrial fungi with algicidal ability from Zijin Mountain, Nanjing, China. In: *Journal of Microbiology*, vol. 49, nr. 4, pp. 562-567. e-ISSN 1976-3794, ISSN 1225-8873.
180. HANS, H. 1959. Beitrage zur Biologie von *Sitona lineatus*. *Journal of Applied Entomology* [online], vol. 44, pp. 343-386 [citat 25.11.2018]. e-ISSN 1439-0418. Disponibil: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1439-0418.1959.tb00933.x
181. HANSEN, L.M., BOELT, B. 2008. Thresholds of economic damage by clover seed weevil (*Apion fulvipes* Geoff.) and lesser clover leaf weevil (*Hypera nigrirostris* Fab.) on white clover (*Trifolium repens* L.) seed crops.In: *Grass and Forage Science*, vol. 63, pp. 433-437. e-ISSN 1365-2494.
182. HARCOURT, D., GUPPY, G.M., MACLEOD, D.M., TYRELL. D. 1974. The fungus *Entomophthora phytonomi* pathogenic to the alfalfa weevil, *Hypera postica* (Coleoptera: Curculionidae). In: *Canadian Entomologist*, vol. 109, pp. 1521-1532. e-ISSN 1918-3240, ISSN 0008-347X.
183. HAUGLAND, R.A., VARMA, M., WYMER, L.J., VESPER, S.J. 2004. Quantitative PCR analysis of selected *Aspergillus*, *Penicillium* and *Paecilomyces* species. In: *Systematic and Applied Microbiology*, vol. 27, nr. 2, pp. 198-210. ISSN 0723-2020.
184. HAVLICKOVA, H. 1980. Causes of different feeding rates of pea leaf weevil, *Sitona lineatus* on three pea cultivars. In: *Entomologia Experimentalis et Applicata*, vol. 27, pp. 287-292. e-ISSN 1570-7458.
185. HAVLICKOVA, H. 1982. Different response of alfalfa plants to artificial defoliation and to feeding by the pea leaf weevil (*Sitona lineatus* L.). In: *Experientia*, vol. 38, pp. 569-570. ISSN 0014-4754.
186. HAWTIN, R.E., POSSEE, R.D. 1993. Genetic manipulation of the baculovirus genome for pest control. In: BECKAGE, N.E., THOMPSON, S.N., FEDERICI, B.A., eds. *Parasites and pathogens of insects. Vol. 2.* San Diego, CA, USA: Academic Press, pp. 179-195. ISBN 978-0-12084-4-425.
187. HEDLUND, R.C., PASS, B.C. 1968. Infection of the alfalfa weevil, *Hypera postica*, by the fungus *Beauveria bassiana*. In: *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 11, nr. 1, pp, 25-34. ISSN 0022-2011.
188. HELGESEN, R.G., COOLEY, N. 1976. Overwintering survival of the adult alfalfa weevil. In: *Environmental Entomology*, vol. 5, pp.180-182. e-ISSN 1938-2936, ISSN 0046-225X.

189. HILBURN, D.J. 1985. *Population dynamics of overwintering life stages of the alfalfa weevil, Hypera postica (Gyllenhal)*. Ph.D. Dissertation. Virginia Polytechnic Institute and State University, 119 p.
190. HOEBEKE, E.R., WHEELER JR, A.G. 1985. *Sitona lineatus* (L.), the pea leaf weevil: First records in eastern North America (Coleoptera: Curculionidae). In: *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, vol. 87, pp. 216-220. ISSN 0013-8797.
191. HOFF, K.M., BREWER, M.J., BLODGETT, S.L. 2002. Alfalfa weevil (Coleoptera: Curculionidae) larval sampling: comparison of shake-bucket and sweep-net methods and effect of training. In: *Journal of Economic Entomology*, vol. 95, pp. 748-753. e-ISSN 1938-291X, ISSN 0022-0493.
192. HOFFMANN, M.P., FRODSHAM, A.C. 1993. Natural enemies of vegetable insect pests. In: *Cooperative Extension*, Cornell University, Ithaca, NY, 63 pp.
193. HOFTE, H., WHITELEY, H.R. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. In: *Microbiology Reviews* (*continued by Microbiology and molecular biology reviews*), vol. 53, pp. 242-255. ISSN 1092-2172.
194. HOLDER, D.J., KEYHANI, N.O. 2005. Adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria* (*Cordyceps*) *bassiana* to substrates. In: *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 71, pp. 5260-5266. e-ISSN 1098-5336, ISSN 0099-2240.
195. HOOG de, G.S. 1972. The genera *Beauveria*, *Isaria*, *Tritirachium* and *Acrodontium* gen. nov. In: *Studies in Mycology*, vol. 1, pp. 1-41. ISSN 0166-0616.
196. HOOG de, G.S. 2000. *Atlas of clinical fungi ed. 2*. p 523. Amer Society for Microbiology, 1126p. ISBN 9070351439.
197. HORAK A., BURYSKOVA, L. 1980. The use of soil insecticides for the protection of horse bean (*Faba vulgaris*). In: *Rostlinna Vyroba*, vol. 10, pp. 1069-1079. ISSN 0035-8371.
198. HOSSAIN, Z., GURR, G.M., WRATTEN, S.D., RAMAN, A. 2002. Habitat manipulation in lucerne *Medicago sativa*: Arthropod population dynamics in harvested and "refuge" crop strips. In: *Journal of Applied Ecology*, vol.39, pp. 445–454. e-ISSN 1365-2664.
199. Hotărârea Guvernului Republicii Moldova nr. 123 din 02.02.2018 cu privire la aprobarea Programului naţional de protecţie integrată a plantelor pentru anii 2018-2027 şi Planului de acţiuni privind implementarea acestuia, In: *Monitorul Oficial al Republicii Moldova*, 2018, Nr. 40-47, art nr 142 [citat 03.04.2019]. Disponibil: https://www.legis.md/cautare/getResults?doc_id=102113&lang=ro.
200. HOY, M., RAGHUWINDER, S., ROGERS, M. 2010. Evaluations of a novel isolate of *Isaria fumosorosea* for control of the asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). In: *Florida Entomologist*, vol. 93, nr. 1, pp. 24-32. e-ISSN 2163-632X, ISSN 1930-4013.
201. HSIAO, T.H. 1993. Geographic and genetic variation among alfalfa weevil strains. In: KIM, K. C., MCPHERON, B. A., eds. *Evolution of Insect Pests: Patterns of Variation.* New York: John Wiley & Sons Inc., pp. 311-327. ISBN 0-471-60077-6.
202. HSIEH, F., ROBERTS, S.J., ARMBRUST, E.J. 1974. Developmental rate and population dynamics of alfalfa weevil larvae. In: *Environmental Entomology*, vol. 3, pp. 593-597. e-ISSN 1938-2936, ISSN 0046-225X.
203. HUGHES, S.J., COOKE, J.C. 1979. Anti-inflammatory and anti-diabetic naphthoquinones from an endophytic fungus *Dendryphion nanum* (Nees) S. Hughes. In: *Fungi Canadenses*, vol. 147, pp. 1-2.
204. HUMBER, R.A. 2012. Chapter VI Identification of entomopathogenic fungi. In: LACEY, L., ed. *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology, 2nd Edition*.Academic Press, pp. 151-188. eBook ISBN 978-0-12386-9-005, ISBN 978-0-12386-8-992.
205. HUMPHRIES, A.W., STEWART, A.G., NEWMAN, A.J., BALLARD, R.A. 2018. Overview of the economic utilization and traits of interest of lucerne in Australia. In: *Proceedings of Second World Alfalfa Congress* [online]. 11-14 November, 2018, Cordoba, Argentina, pp. 20-24 [citat 05.03.2020]. Disponibil: http://www.worldalfalfacongress.org/resumenes.pdf
206. HUNTER, M.D. 2001. Out of sight, out of mind: the impacts of root-feeding insects in natural and managed systems. In: *Agricultural and Forest Entomology*, vol. 3, pp. 3-9. e-ISSN 1461-9563.
207. HYAKUMACHI, M. 1994. Plant growth-promoting fungi from turfgrass rhizosphere with potential for disease suppression. In: *Soil Microorganisms*, vol. 44, pp. 53-68. e-ISSN 2189-6518, ISSN 0912-2184.

208. HYAKUMACHI, M., KUBOTA, M. 2004. Fungi as plant growth promoter and disease suppressor. In: ARORA, D.K. ed. *Mycology Series. Vol. 21. Fungal Biotechnology in Agricultural, Food, and Environmental Applications*. UK: Cambridge University Press, pp. 101-110. ISBN 0-8247-4770-4.
209. IMOULAN, A., HUSSAIN, M., KIRK, P.M., el MEZIANE, A., YAO, Y.-J. 2017. Entomopathogenic fungus *Beauveria*: Host specificity, ecology and significance of morpho-molecular characterization in accurate taxonomic classification. In: *Journal of Asia-Pacific Entomology*, vol. 20, nr. 4, pp. 1204-1212. ISSN 1226-8615.
210. INDERBITZIN, P., SHOEMAKER, R.A., O'NEILL, N., GILLIAN TURGEON, B., BERBEEA, M.L. 2006. Systematics and mating systems of two fungal pathogens of opium poppy: the heterothallic *Crivellia papaveracea* with a *Brachycladium penicillatum* asexual state and a homothallic species with a *B. papaveris* asexual state. In: *Canadian Journal of Botany*, vol. 84, pp. 1304-1326. e-ISSN 1480-3305, ISSN 0008-4026.
211. INFANTINO, A., KHARRAT, M., RICCIONI, L., COYNE, C.J., MCPHEE, K.E., GRUNWALD, N.J. 2006. Screening techniques and sources of resistance to root diseases in cool season food legumes. In: *Euphytica*, vol. 147, pp. 201-221. e-ISSN 1573-5060, ISSN 0014-2336.
212. INGLIS, G.D., ENKERLI, J., GOETTEL, M.S. 2012. CHAPTER VII. Laboratory techniques used for entomopathogenic fungi: Hypocreales. In: LACEY, L. eds. *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology, 2nd Edition*. Academic Press, pp. 189-254. eBook ISBN 978-0-12386-9-005, ISBN 978-0-12386-8-992.
213. INGLIS, G.D., GOETTEL, M.S., BUTT, T.M., STRASSER, H. 2001. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In: BUTT, T., JACKSON, C., MAGAN, N. eds. *Fungi as Biocontrol Agents – Progress, Problems and Potential*. Wallingford, UK: CABI Press, CAB International, pp. 23-69. eBook ISBN 978-1-84593-3-005.
214. INGLIS, P.W., TIGANO, M.S. 2006. Identification and taxonomy of some entomopathogenic *Paecilomyces* spp. (Ascomycota) isolates using rDNA-ITS Sequences. In: *Genetics and Molecular Biology*, vol. 29, nr. 1, pp. 132-136. ISSN 0100-8455.
215. INOKOSHI, J., SHIGETA, N., FUKUDA, T., UCHIDA, R., NONAKA, K., MASUMA, R., TOMODA, H. 2013. Epi-trichosetin, a new undecaprenyl pyrophosphate synthase inhibitor, produced by *Fusarium oxysporum* FKI-4553. In: *The Journal of Antibiotics* [online], vol. 66, nr. 9, pp. 549-554 [citat 17.12.2018]. e-ISSN 1881-1469. Disponibil: https://www.nature.com/articles/ja201344
216. JABER, L.R., KHOLOUD, M.A. 2018. Fungal entomopathogens as endophytes reduce several species of *Fusarium* causing crown and root rot in sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). In: *Biological Control* [online], vol. 126, pp. 117-126, ISSN 1049-9644 [citat 12.11.2019]. Disponibil: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1049964418303815
217. JABER, L.R., OWNLEY, B.H. 2018. Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control of insect pests and plant pathogens. In: *Biological Control* [online], vol. 116, pp. 36-45 [citat 13.11.2019]. ISSN 1049-9644. Disponibil: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1049964417300543.
218. JACKSON, D.J. 1920. Bionomics of weevils of the genus *Sitones* injurious to leguminous crops in Britain. In: *Annals of Applied Biology*, vol. 7, pp. 269-298. e-ISSN 1744-7348.
219. JAKOVLJEVIC, V.D., MILICEVIC, J.M., STOJANOVIC, J.D., VRVIC, M.M. 2014. The ability of fungus *Mucor racemosus* Fresenius to degrade high concentration of detergent. In: *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, vol. 20, nr. 4, pp. 587−595. e-ISSN 2217-7434, ISSN 1451-9372.
220. JANG, Y., HUH, N., LEE, J., LEE, J.S., KIM, G.-H., KIM, J.-J. 2011. Phylogenetic analysis of major molds inhabiting woods and their discoloration characteristics. Part 2. Genus *Penicillium*. In: *Holzforschung*, vol. 65, pp. 265-270. e-ISSN 1437-434X, ISSN 0018-3830.
221. JARONSKI, S.T. 2010. Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. In: *BioControl*, vol. 55, pp. 159-185. e-ISSN 1573-8248, ISSN 1386-6141.
222. JARONSKI, S.T., MASCARIN, G.M. 2017. Chapter 9 - Mass Production of Fungal Entomopathogens In: LACEY, L. A., ed. *Microbial Control of Insect and Mite Pests*. Academic Press, pp 141-155. ISBN 978-0-12803-5-276.

223. JAWORSKA, M. 1998. Laboratory preference of annual legumes by pea weevil *Sitona lineatus* L. (Col., Curculionidae) and their effect on susceptibility of weevils to entomogenous nematodes. In: *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 71, pp. 248-250. ISSN 0022-2011.
224. JAWORSKA, M., ROPEK, D. 1994. Influence of host-plant on the susceptibility of *Sitona lineatus* L. (Col., Curculionidae) to *Steinernema carpocapsae* Welser. In: *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 64, pp. 96-99. ISSN 0022-2011.
225. JESSICA, J. J., PENG, T. L., SAJAP, A. S., LEE, S. H., SYAZWAN, S. A. 2019. Evaluation of the virulence of entomopathogenic fungus, *Isaria fumosorosea* isolates against subterranean termites *Coptotermes* spp. (Isoptera: Rhinotermitidae). In: *Journal of Forestry Research*, vol. 30, pp. 213–218. e-ISSN 1993-0607, ISSN 1007-662X.
226. JORGENSEN, R. A., CLUSTER, P. D. 1989. Modes and tempos in evolution of nu clear ribosomal DNA: new characters for evolutionary studies and new markers for genetic and population studies. In: *Annals of the Missouri Botanical Garden*, vol. 75, pp. 1238-1247. ISSN 0026-6493.
227. KALHAP., C.S., SINGHS., P., KANG, S., HUNJAN, M.S., GUPTA, V., SHARMA, R. 2014. Chapter 12: Entomopathogenic viruses and bacteria for insect-pest control. In: ABROL D. P. ed. *Integrated Pest Management*. Academic Press, pp. 225-244. ISBN 978-0-123-98529-3.
228. KALKAR, O., CARNER G. R., SCHARF, D., BOUCIAS, D. G. 2006. Characterization of an Indonesian isolate of *Paecilomyces reniformis*. In: *Mycopathologia*, vol. 161, nr. 2, pp. 109-118. e-ISSN 1573-0832, ISSN 0301-486X.
229. KARTHIKEYAN, A., SHANTHI, V., NAGASATHYA, A. 2008. Effect of different media and pH on the growth of *Beauveria bassiana* and its parasitism on leaf eating caterpillars. In: *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* [online], vol. 4, nr. 2, pp. 117-119 [citat 23.08.2019]. ISSN 1816-1561. Disponibil: http://www.aensiweb.net/AENSIWEB/rjabs/rjabs/2008/117-119.pdf
230. KATAOKA, R. 2018. Biodegradability and biodegradation pathways of chlorinated cyclodiene insecticides by soil fungi. In: *Journal of Pesticide Science* [online], vol. 43, nr. 4, pp. 314-320 [citat 12.02.2020]. e-ISSN 1349-0923, ISSN 1348-589X. Disponibil: https://doi.org/10.1584/jpestics.J18-03
231. KAVKOVA, M., CURN, V. 2005. *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) as a potential mycoparasite on *Sphaerotheca fuliginea* (Ascomycotina: Erysiphales). In: *Mycopathologia*, vol. 159, nr. 1, pp. 53-63. e-ISSN 1573-0832, ISSN 0301-486X..
232. KAYA, H. K., GAUGLER, R. 1993. Entomopathogenic nematodes. In: *Annual Review of Entomology*, vol. 38, pp. 181-206. eISSN 1545-4487.
233. KAYA, H. K., VEGA, F. E. 2012. Scope and basic principles of insect pathology. In: VEGA, F. E., KAYA, H. K., eds., *Insect Pathology*. San Diego, CA: Academic Press, pp. 1-12. eBook ISBN 978-0-12384-9-854, ISBN 978-0-12384-9-847.
234. KECHANG, L., PING, Z., CASH, D. 2009. Biology and management of major alfalfa diseases and pests. In: CASH, D., YUEGAO, H., KECHANG, L., SUQIN, W., PING, Z., RONG, G., eds. *Alfalfa management guide for ningxia*. China: China Agricultural Press, p. 37-62.
235. KEPLER, R.M., LUANGSA-ARD, J.J., HYWEL-JONES, N.L., QUANDT, C.A., SUNG, G.H., REHNER, S.A., AIME, M.C., HENKEL, T.W., SANJUAN, T., ZARE, R., CHEN, M., LI, Z., ROSSMAN, A.Y., SPATAFORA, J. W., SHRESTHA, B. 2017. A phylogenetically-based nomenclature for *Cordycipitaceae* (Hypocreales). In: *IMA Fungus* [online], vol. 8, pp. 335-353 [citat 08.02.2020]. Disponibil: https://doi.org/10.5598/imafungus.2017.08.02.08
236. KESKIN, S., OZKAYA, H. 2015. Effect of storage and insect infestation on the technological properties of wheat. In: *CyTA - Journal of Food* [online], vol. 13, nr. 1, pp. 134-139 [citat 08.09.2018]. Disponibil: https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19476337.2014.919962
237. KHANJANI, M. 2005. Alfalfa pests. In: KHANJANI, M., ed. *Crop pests in Iran*. Iran: Ali Sina University Press, p. 121-138.
238. KHOT, P.D., KO, D.L., FREDRICKS, D.N. 2009. Sequencing and analysis of fungal rRNA operons for development of broad-range fungal PCR assays. In: *Applied and Environmental Microbiology*, vol.75, nr. 6, pp. 1559-1565. e-ISSN 1098-5336, ISSN 0099-2240.
239. KIEWNICK, S. 2007. Practicalities of developing and registering microbial biological control agents. In: *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* [online], vol. 2, nr. 13, 11 p. [citat 27.11.2018]. e-ISSN 1749-8848. Disponibil: https://www.cabi.org/bni/FullTextPDF/2007/20073085842.pdf

240. KIM, J.J., LEE, S.-S., RA, J.-B., LEE, H., HUH, N., KIM, G.-H. 2011 a. Fungi associated with bamboo and their decay capabilities. In: *Holzforschung*, vol. 65, nr. 2, pp. 271-275. e-ISSN 1437-434X, ISSN 0018-3830.
241. KIM, J.S., JE, Y.H., WOO, E.O., PARK, J.S. 2011 b. Persistence of *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: *Cordycipitaceae*) SFP-198 conidia in corn oil-based suspension. In: *Mycopathologia*, vol. 171, pp. 67-75. e-ISSN 1573-0832, ISSN 0301-486X.
242. KIM, W.-K., HWANG, Y.-S., & YU, S.-H. 2008. Two species of *Penicillium* associated with blue mold of yam in Korea. In: *Mycobiology*, vol. 36, nr. 4, pp. 217-221 e-ISSN 2092-9323, ISSN 1229-8093.
243. KING, J.M. 1981. Experiments for the control of pea and bean weevil (*Sitona lineatus*) in peas using granular and liquid insecticides. In: *Proceedings 1981 BCPC Pest and Diseases, 16–19 November 1981, Brighton, England*. pp. 327–331.
244. KIRK, P.M. 1991. IMI Descriptions of Fungi and Bacteria no. 1052. *Apiospora montagnei*. In: *Mycopathologia*, vol. 115, pp. 133-134. e-ISSN 1573-0832, ISSN 0301-486X.
245. KLINGER, E.G., JAMES, R.R., YOUSSEF, N.N., WELKER, D.L. 2013. A multi-gene phylogeny provides additional insight into the relationships between several *Ascosphaera* species. In: *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 112, nr. 1, pp. 41-48. ISSN 0022-2011.
246. KNAPP, D.G., PINTYE, A., KOVACS, G.M. 2012. The dark side is not fastidious - dark septate endophytic fungi of native and invasive plants of semiarid sandy areas. In: *PLoS ONE* [online], vol. 7, nr. 2, pp. 32-570 [citat 18.11.2018]. e-ISSN 1932-6203. Disponibil: https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0032570
247. KNOTH, J. L., KIM, S.H., ETTL, G.J., DOTY, S.L. 2014. Biological nitrogen fixation and biomass accumulation within poplar clones as a result of inoculations with diazotrophic endophyte consortia. In: *New Phytologist*, vol. 201, pp. 599–609. e-ISSN 1469-8137.
248. KNOWLES, A. 2005. New developments in crop protection product formulation. In: *Agrow Reports*. UK: T and F Informa UK Ltd., pp. 153-156.
249. KNOWLES, A. 2006. Adjuvants and additives. In: *Agrow Reports*. UK: T&F Informa UK Ltd., pp. 126-129.
250. KNOWLES, A. 2008. Recent developments of safer formulations of agrochemicals. In: *Environmentalist*, vol. 28, nr. 1, pp. 35-44. ISSN 0251-1088.
251. KNUTSEN, A.K., ROBERT, V., POOT, G.A., EPPING, W., FIGGE, M., HOLST-JENSEN, A., SKAAR, I., SMITH, M.T. 2007. Polyphasic re-examination of *Yarrowia lipolytica* strains and the description of three novel *Candida* species: *Candida oslonensis* sp. nov., *Candida alimentaria* sp. nov. and *Candida hollandica* sp. nov. In: Int. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 57, pp. 2426-2435. e-ISSN 1466-5034, ISSN 1466-5026.
252. KOCH, E., ZINK, P., ULLRICH, C. I., KLEESPIES, R. G. 2018. Light microscopic studies on the development of *Beauveria bassiana* and other putative endophytes in leaf tissues. In: *Journal fur Kulturpflanzen*, vol. 70, nr. 3, pp. 95-107. ISSN 1867-0938.
253. KOEHLER, C. S., ROSENTHAL, S. S. 1975. Economic injury levels of the Egyptian alfalfa weevil or the alfalfa weevil. In: *Journal of Economic Entomology*, vol. 68, pp. 71-75. e-ISSN 1938-291X, ISSN 0022-0493.
254. KOEHLER, P. G., PIMENTEL, D. 1973. Economic injury levels of the alfalfa weevil. In: *Canadian Entomologist*, vol. 105, pp. 61-74. e-ISSN 1918-3240, ISSN 0008-347X.
255. KOKKONEN, M., OJALA, L., PARIKKA, P., JESTOI M. 2010. Mycotoxin production of selected *Fusarium* species at different culture conditions. In: *International Journal of Food Microbiology*, vol. 143, nr. 1-2, pp. 17-25. ISSN 0168-1605.
256. KOLARIK, P., ROTREKL, J. 2013. Regulation of the abundance of clover seed weevils, *Apion* spp. (Coleoptera: Curculionidae) in a seed stand of red clover (*Trifolium pratense* L.). In: *Journal of Entomological and Acarological Research* [online], vol. 45, 19 p. [citat 07.09.2019]. e-ISSN 2279-7084, ISSN 2038-324X.
Disponibil: https://www.pagepressjournals.org/index.php/jear/article/view/jear.2013.e19/5527
257. KOPPENHÖFER, H., GAUGLER, R. 2009. Chapter: Entomopathogenic Nematode and Bacteria Mutualism. In: WHITE, J., TORRES, M. *Defensive mutualism in microbial symbiosis.* Taylor & Francis, pp 99-117. e-ISBN 978-0-42914-0-594.

258. KORDAN, B., SLEDZ, D. 1994. Food preferences of pea weevil (*Sitona lineata* L.) and its survival on different pea (*Pisum sativum* L.) cultivars in laboratory conditions. In: *Acta Academiae Agriculturae ac Technicae Olstenensis*, vol. 59, pp. 107-113. ISSN 0860-2832.
259. KOROTYAEV, B.A. 1990. Materialy po faune zhukov nadsemeistva Curculionoidea (Coleoptera) Mongolii i sopredelnykh stran. In: KERZHNER, I.M., ed., *Insects of Mongolia. Vol. 11*. Leningrad: Zoological Institute, pp. 216–234. [in Russian].
260. KRAFT, J. M., LARSEN, R. C., INGLIS, D. A. 1998. Diseases of pea. In: ALLEN D. J., LENNE, J. M., eds. *The pathology of food and pasture legumes*. Wallingford, UK: CAB International, pp. 325-363. ISBN 0-85199-1666-1.
261. KRASILSHCHIK, I.M. 1916. Organizatsiya bor'by s vreditelyami sel'skogo khozyaystva na mestakh v 1915 godu. In: *Otchet o deyatel'nosti bio-entomologicheskoy stantsii za 1914- 1915 gg*. Kishinev, c. 69 – 94. [in Russian].
262. KRASNOPOLSKAYA, L.F. 1968. Damage caused to leguminous crops by root-nodule weevils of the genus *Sitona* (abstract). In: *The Review of Applied Entomology Series A*, vol. 56, p. 2288. ISSN 0305-0076.
263. KRUESS, A., TSCHARNTKE, T. 1994. Habitat fragmentation, species loss, and biological control. In: *Science*, vol. 264, pp. 1581- 1584. e-ISSN 1095-9203, ISSN 0036-8075.
264. KRUYS, A., ERIKSSON, O.E., WEDIN, M. 2006. Phylogenetic relationships of coprophilous Pleosporales (Dothideomycetes, Ascomycota), and the classification of some bitunicate taxa of unknown position. *Mycological Research*, 110 (PT 5), pp. 527-536. ISSN 0953-7562.
265. KUDELA, V., HAVLICKOVA, H., VACKE, J. 1984. *Sitona lineatus* as a vector of *Corynebacterium michiganense* p.v. *insidiosum*. In: *Ochrana Rostlin* (*Plant Protection Science*), vol. 20, pp. 267-271. e-ISSN 1805-9341, ISSN 1212-2580.
266. KUHAR, T. P., YOUNGMAN, R. R., LAUB, C. A. 2000. Alfalfa weevil (Coleoptera: Curculionidae) population dynamics and mortality factors in Virginia. In: *Environmental Entomology*, vol. 29, pp. 1295–1304. e-ISSN 1938-2936, ISSN 0046-225X.
267. KULDAU, G. A., YATES, I. E. 2000. Evidence for *Fusarium* endophytes in cultivated and wild plants. In: BACON, C. W., WHITE Jr., J. F., eds. *Microbial endophytes*. New York: Marcel Dekker, Inc., pp. 85-117. ISBN 978-0-82478-8-315.
268. KUMAR, S., STECHER, G., TAMURA, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. In: *Molecular Biology and Evolution*, vol. 33, pp. 1870-1874. e-ISSN 1537-1719, ISSN 0737-4038.
269. KURTZMAN, C.P., ROBNETT, C.J. 2013. Relationships among genera of the Saccharomycotina (Ascomycota) from multigene phylogenetic analysis of type species. In: *FEMS Yeast Research*, vol. 13, nr. 1, pp. 23-33. e-ISSN 1567-1364, ISSN 1567-1356.
270. KUWATA, R., TOKUDA, M., YAMAGUCHI, D., YUKAWA, J. 2005. Coexistence of two mitochondrial DNA haplotypes in Japanese populations of *Hypera postica* (Col., Curculionidae). *Journal of Applied Entomology* [online], vol. 129, pp. 191-197 [citat 27.10.2018]. e-ISSN 1439-0418. Disponibil: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1439-0418.2005.00954.x
271. LACEY, L.A., FRUTOS, R., KAYA, H.K., VAIL, P. 2001. Insect pathogens as biological control agents: do they have a future? In: *Biological Control*, vol. 21, pp. 230-248. ISSN 1049-9644.
272. LACEY, L.A, GRZYWACZ, D., SHAPIRO-ILAN, D.I., FRUTOS, R., BROWNBRIDGE, M., GOETTEL, M.S. 2015. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. In: *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 132, pp. 1-41. ISSN 0022-2011.
273. LACEY, L.A., SOLTER, L.F. 2012. Chapter I. Initial handling and diagnosis of diseased invertebrates. In: LACEY, L., ed. *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology, 2nd Edition*. Academic Press, pp. 1-14. e-ISBN 978-0-12386-9-005, ISBN 978-0-12386-8-992.
274. LAMBERTH, C., JEANMART, S., LUKSCH, T., PLANT A. 2013. Current challenges and trends in the discovery of agrochemicals. In: *Science* [online], vol. 341, nr. 6147, pp. 742-746 [citat 25.09.2018]. e-ISSN 1095-9203, ISSN 0036-8075.
Disponibil: https://science.sciencemag.org/content/341/6147/742
275. LANDA, B.B., LOPEZ-DIAZ, C., JIMENEZ-FERNANDEZ, D., MONTES-BORREGO, M., MUNOZ-LEDESMA, F. J., ORTIZ-URQUIZA, A., QUESADA-MORAGA, E. 2013. In-planta detection and monitorization of endophytic colonization by a *Beauveria bassiana* strain using a new-

developed nested and quantitative PCR-based assay and confocal laser scanning microscopy. In: *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 114, nr. 2, pp. 128-138. ISSN 0022-2011.
276. LANDIS, D. A., WRATTEN, S. D., GURR, G. M. 2000. Habitat management to conserve natural enemies of arthropod pests in agriculture. In: *Annual Review of Entomology*, vol. 45, pp. 175–201. eISSN 1545-4487.
277. LANDON, F., LEVIEUX, J., HUIGNARD, J., ROUGAN, D., TAUPIN, M. P. 1995. Feeding activity of *Sitona lineatus* L. (Col., Curculionidae) on *Pisum sativum* L. (Leguminosae) during its imaginal life. In: *Journal of Applied Entomology*, vol. 119, pp. 515-522. e-ISSN 1439-0418.
278. LARKIN, R.P., HOPKINS, D.L., MARTIN, F.N. 1993. Effect of successive watermelon plantings on *Fusarium oxysporum* and other microorganisms in soils suppressive and conducive to fusarium wilt of watermelon. In: *Phytopathology*, vol. 83, pp. 1097-1105. e-ISSN 1545-2107.
279. LECATO, G. L., PIENKOWSKI, R. L. 1972. High- or low-temperature treatments affecting alfalfa weevil fecundity, egg fertility, and longevity. In: *Journal of Economic Entomology*, vol. 65, pp. 146-148. e-ISSN 1938-291X, ISSN 0022-0493.
280. LEE, J.Y., WOO, R.M., CHOI, C.J., SHIN, T.Y., GWAK, W.S., WOO, S.D. 2019. *Beauveria bassiana* for the simultaneous control of *Aedes albopictus* and *Culex pipiens* mosquito adults shows high conidia persistence and productivity. In: *AMB Express* [online], vol. 9, nr. 1, art. nr. 206, 9 p. [citat 09.02.2020] e-ISSN: 2191-0855.
Disponibil: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6925604/
281. LEE, Y.M., JANG, Y., KIM, G.-H., KIM, J.-J. 2012. Phylogenetic analysis and discoloration characteristics of major molds inhabiting woods. Part 3. Genus *Cladosporium*. In: *Holzforschung*, vol. 66, pp. 537-541 e-ISSN 1437-434X, ISSN 0018-3830.
282. LEMANCEAU, P., BAKKER, P.A., de KOGEL, W.J., ALABOUVETTE, C., SCHIPPERS, B. 1993. Antagonistic effect of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* fo47 and Pseudobactin 358 upon pathogenic *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. In: *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 59, pp. 74-82. e-ISSN 1098-5336, ISSN 0099-2240.
283. LERIN, J. 2004. Modeling embryonic development in *Sitona lineatus* (Coleoptera: Curculionidae) in fluctuating temperatures. In: *Environmental Entomology*, vol. 33, pp. 107-112. e-ISSN 1938-2936, ISSN 0046-225X.
284. LIMTONG, S., KAEWWICHIAN, R. 2015. The diversity of culturable yeasts in the phylloplane of rice in Thailand. In: *Annals of Microbiology*, vol. 65, pp. 667-675. ISSN 1869-2044.
285. LINNAKOSKI, R., KASANEN, R., LASAROV, I., MARTTINEN, T., OGHENEKARO, A.O., SUN, H., ASIEGBU, F.O., WINGFIELD, M.J., HANTULA, J., HELIOVAARA, K. 2018. *Cadophora margaritata* sp. nov., and other fungi associated with thelonghorn beetles *Anoplophora glabripennis* and *Saperda carcharias* in Finland. In: *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 111, pp. 2195–2211. e-ISSN 1572-9699, ISSN 0003-6072.
286. LITSINGER, J. A., APPLE, J. W. 1973. Thermal requirements for embryonic and larval development of the alfalfa weevil in Wisconsin. In: *Journal of Economic Entomology*, vol. 66, pp. 309-311. e-ISSN 1938-291X, ISSN 0022-0493.
287. LONCARIC, I., OBERLERCHNER, J. T., HEISSENBERGER, B., MOOSBECKHOFER, R. 2009. Phenotypic and genotypic diversity among strains of *Aureobasidium pullulans* in comparison with related species. In: *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 95, nr. 2, pp. 165-178. e-ISSN 1572-9699, ISSN 0003-6072.
288. LONDERO, M.R., ZANROSSO, C.D., CORSO, L.L., MICHELIN, L., SOLDERA, J. 2018. Catheter-related infection due to *Papiliotrema laurentii* in an oncologic patient: Case report and systematic review. In: *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* [online], vol. 23, nr. 6, pp. 451-461 [citat 15.02.2020]. ISSN 1413-8670.
Disponibil: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1413867019304714
289. LONG, R.F., NETT, M., PUTNAM, D.H., SHAN, G. SCHMIERER, J., REED, B. 2002. Insecticide choice for alfalfa may protect water quality. In: *California Agriculture* [online], vol. 56, p. 163-169 [citat 27.04.2018]. Disponibil: https://escholarship.org/uc/item/16t77932#main
290. LOPES, R.B., FARIA, M. 2019. Influence of two formulation types and moisture levels on the storage stability and insecticidal activity of *Beauveria bassiana*. In: *Biocontrol Science and Technology* [online], vol. 29, nr. 5, pp. 437-450 [citat 23.02.2020]. Disponibil: https://doi.org/10.1080/09583157.2019.1566436

291. LOPEZ, D.C., SWORD, G.A. 2015. The endophytic fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Purpureocillium lilacinum* enhance the growth of cultivated cotton (*Gossypium hirsutum*) and negatively afect survival of the cotton bollworm (*Helicoverpa zea*). In: *Journal of Biological Control*, vol. 89, pp. 53–60. e-ISSN 2230-7281, ISSN 0971-930X.
292. LOPEZ-PEREZ, M., RODRIGUEZ-GOMEZ, D., LOERA, O. 2015. Production of conidia of *Beauveria bassiana* in solid-state culture: current status and future perspectives. In: *Critical Reviews in Biotechnology*, vol. 35, nr. 3, pp. 334-341. e-ISSN 1549-7801, ISSN 0738-8551.
293. LOPS, F., CIBELLI, F., RAIMONDO, M.L., CARLUCCI, A. 2013. First report of stem wilt and root rot of schlumbergera truncata caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *Opuntiarum* in Southern Italy. In: *Plant Disease*, vol. 97, nr. 6, p. 846 e-ISSN 1943-7692, ISSN 0191-2917.
294. LORD, J.C., ANDERSON, S., STANLEY, D.W. 2012. Eicosanoids mediate *Manduca sexta* cellular response to the fungal pathogen *Beauveria bassiana*: a role for the lipoxygenase pathway. In: *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, vol. 51, pp. 46 - 54. e-ISSN 1520-6327.
295. LUANGSA-ARD, J.J., BERKAEW, P., RIDKAEW, R., HYWEL-JONES, N.L., ISAKA, M. 2009. A beauvericin hot spot in the genus *Isaria*. In: *Mycological Research*, vol. 113, pp. 1389-1395. ISSN 0953-7562.
296. LUGAUSKAS, A., RAUDONIENE, V., SVEISTYTE, L. 2005. Toxin producing micromycetes on imported products of plant origin. In: *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, vol. 12, nr. 1, pp. 109-118. e-ISSN 1898-2263, ISSN 1232-1966.
297. LUKYANOVICH, F.K., TER-MINASYAN, M.E. 1955. Semeystvo Curculionidae – Dolgonosiki, ili sloniki. In: *Vrediteli lesa*. Moscva, Leningrad.-L. T.2, pp. 592 - 648. [in Russian].
298. LUNDIN, O., RUNDLOF, M., SMITH, H.G., BOMMARCO, R. 2012. Towards integrated pest management in red clover seed production. In: *Journal of Economic Entomology*, vol. 105, nr. 5, pp. 1620-1628. e-ISSN 1938-291X.
299. LYKOURESSIS, D.P., EMMANOUEL, N.G. 1991. Biological aspects of some arthropod pests of lucerne in Greece. In: *Journal of Applied Entomology*, vol. 111, pp. 526-532. e-ISSN 1439-0418.
300. MACIA-VICENTE, J.G., FERRARO, V., BURRUANO, S., LOPEZ-LLORCA, L.V. 2012. Fungal assemblages associated with roots of halophytic and non-halophytic plant species vary differentially along a salinity gradient. In: *Microbial Ecology*, vol. 64, nr. 3, pp. 668-679. e-ISSN 1432-184X, ISSN 0095-3628.
301. MAJEED, M.Z., FIAZ, M., MA, C.-S., AFZAL, M. 2017. Entomopathogenicity of three muscardine fungi, *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea* and *Metarhizium anisopliae*, against the asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Psyllidae). In: *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, vol. 27, pp. 211–215. e-ISSN 2536-9342.
302. MALEVANCIUC, N., MUNTEANU, N. 2010. Fauna and ecology of the weevils (Coloptera: *Curculionidae*) associated with leguminous plants in the Republic of Moldova. In: *Oltenia. Studii şi comunicări. Ştiinţele naturii*, vol. 26, nr. 2, pp. 151-154. ISSN 1454-6914.
303. MANTLE, P., KATHARINE, G., MCHUGH, M., FINCHAM, J. E. 2010. Contrasting nephropathic responses to oral administration of extract of cultured *Penicillium polonicum* in rat and primate. In: *Toxins*, vol. 2, pp. 2083-2097. ISSN 2072-6651.
304. MARKKULA, M., KOPPA, P. 1960. The composition of the *Sitona* (Col., Curculionidae) population on grassland legume and some other leguminous plants. In: *Annales Entomologici Fennici*, vol. 26, pp. 246-263. ISSN 0003-4428.
305. MARONI, M., FANETTI, A.C., METRUCCIO, F. 2006. Risk assessment and management of occupational exposure to pesticides in agriculture. In: *La Medicina del Lavoro*, vol. 97, pp. 430-437. e-ISSN 2532-1080, ISSN 0025-7818.
306. MARTINEZ-SILVEIRA, A., PEREYRA, V., GARMENDIA, G., RUFO, C., VERO, S. 2019. Optimization of culture conditions of *Rhodotorula graminis* S1/2R to obtain saponifiable lipids for the production of second-generation biodiesel. In: *Environmental Sustainability* [online], vol. 2, pp. 419-428 [citat 17.02.2020]. e-ISSN 2523-8922. Disponibil: https://doi.org/10.1007/s42398-019-00085-x
307. MATHENY, P.B., GOSSMANN, J.A., ZALAR, P., ARUN KUMAR, T.K., HIBBETT, D.S. 2006. Resolving the phylogenetic position of the Wallemiomycetes: an enigmatic major lineage of Basidiomycota. InL *Canadian Journal of Botany*, vol. 84, pp. 1794-1805. e-ISSN 1480-3305, ISSN 0008-4026.

308. MCCLATCHIE, G.V., MOORE, D., BATEMAN, R.P., PRIOR, C. 1994. Effect of temperature on the viability of the conidia of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations. In: *Mycological Research*, vol. 98, pp. 749–756. ISSN 0953-7562.
309. MCCOY, C.W., SAMSON, R.A., BOUCIAS, D.G. 1988. Entomogenous fungi. In: IGNOFFO, C.M., MANDAVA, N.B., eds. *Handbook of natural pesticides. Vol. 5. Microbial pesticides. Part A: entomogenous protozoa and fungi.* Boca Raton, Florida: CRC Press, pp. 151-236. ISBN 9780849336607.
310. MCKINNON, A.C., SAARI, S., MORAN-DIEZ, M.E., MEYLING, N.V., RAAD, M., GLARE, T.R. 2017. *Beauveria bassiana* as an endophyte: a critical review on associated methodology and biocontrol potential. In: *BioControl* [online], vol. 62, pp. 1–17 [citat 08.04.2020]. e-ISSN 1573-8248, ISSN 1386-6141. Disponibil: https://doi.org/10.1007/s10526-016-9769-5
311. MEADOWS, M.P. 1993. *Bacillus thuringiensis* in the environment: ecology and risk assessment. In: ENTWISTLE, P.F., CORY, J.S., BAILEY, M.J., HIGGS, S., eds. *Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, , pp. 193-220. ISBN 978-0471933069.
312. MEDINA-CORDOVA, N., ROSALES-MENDOZA, S., HERNANDEZ-MONTIEL, L.G., ANGULO, C. 2018. The potential use of *Debaryomyces hansenii* for the biological control of pathogenic fungi in food. In: *Biological Control*, vol. 121, pp. 216-222. ISSN 1049-9644.
313. MEDLIN, L., ELWOOD, H. J., STICKEL, S., SOGIN, M. L. 1988. The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA - coding regions. In: *Gene*, vol. 71, pp. 491-499. ISSN 0378-1119.
314. MEKLIN, T., HAUGLAND, R.A., REPONEN, T., VARMA, M., LUMMUS, Z., BERNSTEIN, D., WYMER, L.J., VESPER, S.J. 2004. Quantitative PCR analysis of house dust can reveal abnormal moldconditions. In: *Journal of Environmental Monitoring*., vol. 6, nr. 7, pp. 615-620. ISSN 1464-0325.
315. MERT, H.H., DIZBAY, M. 1977. The effect of osmotic pressure and salinity of the medium on the growth and sporulation of *Aspergillus niger* and *Paecilomyces lilacinum* species. In: *Mycopathologia*, vol. 61, pp. 125-127. e-ISSN 1573-0832, ISSN 0301-486X.
316. MEYLING, N.V., EILENBERG, J. 2007. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. In: *Biological Control* [online], vol. 43, nr. 2, pp. 145-155 [citat 27.02.2018]. ISSN 1049-9644, Disponibil: https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.07.007.
317. MEYLING, N.V., SCHMIDT, N.M., EILENBERG, J. 2012. Occurrence and diversity of fungal entomopathogens in soils of low and high Arctic Greenland. In: *Polar Biology*, vol. 35, pp. 1439-1445. e-ISSN 1432-2056, ISSN 0722-4060.
318. MICHELBACHER, A.E. 1943. The present status of the alfalfa weevil in California. In: *Univ. Calif., Berkeley, Agric. Exp. Stn., Bull.*, vol. 677, pp. 12-16.
319. MICHELY, S., GAILLARDIN, C., NICAUD, J.M., NEUVEGLISE, C. 2013. Comparative physiology of oleaginous species from the *Yarrowia* clade. In: *PLoS One* [online], vol. 8, nr. 5, nr. article, e63356. e-ISSN 1932-6203.
Disponibl: https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0063356
320. MIETKIEWSKI, R., TKACZUK, C., ZUREK, M., van der GEEST, L.P.S. 1994. Temperature requirements of four entomopathogenic fungi. In: *Acta Mycologica*, vol. 29, nr. 1, pp. 109-120. e-ISSN 2353-074X, ISSN 0001-625X (anulat din 2015).
321. MILLER, G.T. 2004. *Sustaining the Earth: An Integrated Approach*. Thomson, Brooks Cole, , pp. 211–216. ISBN 978-0-534-40088-0.
322. MILLER, K.I., QING, C., SZE, M.-Y. D., ROUFOGALIS, B.D., NEILAN, B.A. 2012. Culturable endophytes of medicinal plants and the genetic basis for their bioactivity. In: *Microbial Ecology*, vol. 64, nr. 2, pp. 431-449. e-ISSN 1432-184X, ISSN 0095-3628.
323. MISHRA, P.K., FOX, R.T., CULHAM, A. 2003. Development of a PCR-based assay for rapid and reliable identification of pathogenic *Fusaria*. In: *FEMS Microbiology Letters*, vol. 218 (2), pp. 329-332. e-ISSN 1574-6968, ISSN 0378-1097.
324. MISHRA, S., KUMAR, P., MALIK, A. 2015. Effect of temperature and humidity on pathogenicity of native *Beauveria bassiana* isolate against *Musca domestica* L. In: *Journal of Parasitic Diseases*, vol. 39, pp. 4, pp. 697-704. e-ISSN 0975-0703, ISSN 0971-7196.

325. MOHAMMADPOUR, K., JAFARLU, M., SOLTANI, H. 2018. Studying the efficacy of fipronil (WG 80%) against alfalfa weevil, Hypera postica (Coleoptera: Curculionidae). In: *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, vol. 53, nr. 2, pp. 241-245. ISSN 0238-1249.
326. MOLITOR, C., INTHAVONG, B., SAGE, L., GEREMIA, R.A., MOUHAMADOU, B. 2009. Potentiality of the cox1 gene in the taxonomic resolution of soil fungi. In: *FEMS Microbiology Letters*, vol. 302, nr. 1, pp. 76-84. e-ISSN 1574-6968, ISSN 0378-1097.
327. MOLLET, H., GRUBENMANN, A. 2001. *Formulation technology*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag, pp. 389-397, 421p. ISBN 3-527-30201-8.
328. MOLNAR, O., WUCZKOWSKI, M., PRILLINGER, H. 2008. Yeast biodiversity in the guts of several pests on maize; comparison of three methods: Classical isolation, cloning and DGGE. In: Mycological Progress, vol. 7, nr. 2, pp. 111-123. e-ISSN 1861-8952, ISSN 1617-416X.
329. MOORE, D., BATEMAN, R.P., CAREY, M., PRIOR, C. 1995. Longterm storage of *Metarhizium flavoviride* conidia in oil formulation for the control of locusts and grasshoppers. In: *Biocontrol Science and Technology* [online], 5, 193-199 [citat 17.07.2018]. Disponibil: https://doi.org/10.1080/09583159550039918
330. MORA, M.A.E., CASTILHO, A.M.C., FRAGA, M.E. 2017. Classification and infection mechanism of entomopathogenic fungi. In: *Arquivos do Instituto Biologico* [online], vol. 84, nr. article e0552015 [citat 08.07.2020].
Disponibil: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1808-16572017000100403&lng=en&nrm=iso
331. *MORDOR INTELLIGENCE. Alfalfa hay market - growth, trends, and forecast (2020 - 2025).* © 2020. [citat 07.06.2020]. Disponibil: https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/alfalfa-hay-market
332. MORLEY-DAVIS, J., MOORE, D., PRIOR, C. 1995. Screening of *Metarhizium* and *Beauveria* spp. conidia with exposure to stimulated sunlight and a range of temperatures. In: *Mycological Research*, vol. 100, pp. 31-38. ISSN 0953-7562.
333. MOUNIR, R., DURIEUX, A., BODO, C., ALLARD, C., SIMON, J.P., ACHBANI, E.H., EL-JAAFARI, S., DOUIRA, A., JIJAKLI. M.H. 2007. Production, formulation and antagonistic activity of the biocontrol like-yeast *Aureobasidium pullulans* against *Penicillium expansum*. In: *Biotechnology Letters*, vol. 29, pp. 553-559. e-ISSN 1573-6776, ISSN 0141-5492.
334. MULLER-KOGLER, E., STEIN, W. 1970. Greenhouse studies with *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. on the infection of *Sitona lineatus* (L.) (Coleopt., Curcul.) in the soil. In: *Journal of Applied Entomology* [online], vol. 65, nr. 1, pp. 59-76 [citat 19.09.2018]. e-ISSN 1439-0418.
Disponibil: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1439-0418.1970.tb03940.x
335. MUNIZ-PAREDES, F., MIRANDA-HERNANDEZ, F., LOERA, O. 2017. Production of conidia by entomopathogenic fungi: from inoculants to final quality tests. In: *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 33, nr. 3, p 57. e-ISSN 1573-0972, ISSN 0959-3993.
336. MURRAY, P.J., CLEMENTS, R.O. 1992. Studies on the feeding of *Sitona lineatus* L. (Coleoptera: Curculionidae) on white clover (*Trifolium repens* L.) seedlings. In: *Annals of Applied Biology*, vol. 121, pp. 233-238. e-ISSN 1744-7348.
337. MURRAY, P.J., CLEMENTS, R.O. 1994. Investigations of the host feeding preferences of *Sitona* weevils found commonly on white clover (*Trifolium repens*) in the UK. In: *Entomologia Experimentalis et Applicata*, vol. 71, pp. 73-79. e-ISSN 1570-7458.
338. MURRAY, P.J., CLEMENTS, R.O. 1995. Distribution and abundance of three species of *Sitona* (Coleoptera: Curculionidae) in grassland England. In: *Annals of Applied Biology*, vol. 127, pp. 229-237. e-ISSN 1744-7348.
339. MUSSA, A.Y., RANDHAWA, H.S., KHAN, Z.U. 2000. Decaying wood as a natural habitat of melanin-forming (Mel+) variant of *Cryptococcus laurentii*. In: *Current Science*, vol.79, pp. 1471–1477. ISSN 0011-3891.
340. MUSTAFA, R.A.M, LAZGEEN, H.A., ABDULLAH, S.K. 2014. Comparative pathogenicity of *Beauveria bassiana*, *Clonostachys rosea*, *Metarhizium anisopliae*, and *Lecanicillium lecanii* to adult, alfalfa weevil *Hypera postica* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae). In: *International Conference on Applied Life Sciences (ICALS2014) Malaysia, 18-20 September, 2014*. p. 11. ISSN 2304-0513.
341. MUSTAFA, U., GURVINDER, K. 2008. UV-B radiation and temperature stress causes variable growth response in *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* isolates. In: *The Internet Journal*

of Microbiology [online], vol. 7, nr.1, 8p [citat 09.07.2020]. Disponibil: https://print.ispub.com/api/0/ispub-article/11494

342. MUTCH, L.A., YOUNG, P.W. 2004. Diversity and specificity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* on wild and cultivated legumes. In: *Molecular Ecology*, vol. 13, pp. 2435-2444. e-ISSN 1365-294X.
343. MWAMBURI, L.A., LAING, M.D., MILLER, R.M. 2015. Effect of surfactants and temperature on germination and vegetative growth of *Beauveria bassiana*. In: *Brazilian Journal of Microbiology*. [online], vol.46, n. 1. pp. 67-74 [citat 10.07.2020]. ISSN 1678-4405. Disponibil: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822015000100067&lng=en&nrm=iso
344. NAZARENKO, V.I. 2013. K izucheniyu zhukov nadsemeystva Curculionoidea (Coleoptera) Natsional'nogo prirodnogo parka „Desnyansko-Starogutskiy". In: *Ukraïns'kiy entomologichniy zhurnal*, vol.1, nr. 6, pp. 12-32. ISSN 2226-4272 [in Russian].
345. NELSON, P.E., DIGNANI, M.C., ANAISSIE, E.J. 1994. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. In: *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 7, pp. 479-504. e-ISSN 1098-6618, ISSN 0893-8512.
346. NIELSEN, B.S., JENSEN, T.S. 1993. Spring dispersal of *Sitona lineatus*: the use of aggregation pheromone traps for monitoring. In: *Entomologia Experimentalis et Applicata*, vol. 66, pp. 21-30. e-ISSN 1570-7458.
347. NIEMCZYK, H. D., FLESSEL, J. K. 1970. Population dynamics of alfalfa weevil eggs in Ohio. In: *Journal of Economic Entomology*, vol. 63, pp. 242-247. e-ISSN 1938-291X, ISSN 0022-0493.
348. NIKOLOVA, I. 2018. Insect pests in forage crops and integrated plant protection. In: *Agricultural Research & Technology: Open Access Journal* [online], vol. 17, nr. 5, article nr. 556038, 14p. [citat 08.07.2020]. Disponibil: https://juniperpublishers.com/artoaj/pdf/ARTOAJ.MS.ID.556038.pdf
349. NISHIMOTO, R. 2019. Global trends in the crop protection industry. In: *Journal Pesticide Science* [online], vol. 44, nr. 3, pp. 141-147 [citat 12.07.2020]. e-ISSN 1349-0923, ISSN 1348-589X. Disponibil: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jpestics/44/3/44_D19-101/_pdf/-char/en
350. NOVICKI, T.J., LAFE, K., BUI, L., BUI, U., GEISE, R., MARR, K., COOKSON, B.T. 2003. Genetic diversity among clinical isolates of *Acremonium strictum* determined during an investigation of a fatal mycosis In: *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 41, nr. 6, pp. 2623-2628. e-ISSN 1098-660X, ISSN 0095-1137.
351. OBERPRIELER, R.G. 2014. 3.7 Curculionidae Latreille, 1802. In: LESCHEN, R.A.B., BEUTEL, R.G., eds. *Handbook of zoology, Vol. IV: Arthropoda: Insecta. Part 38 Coleoptera, beetles, Vol. III: Morphology and systematics (Phytophaga)*. Berlin, Germany: Walter de Gruyter, pp. 423–424. ISBN 978-3-11-027370-0, e-ISBN 978-3-11-027446-2.
352. OERKE, E.C. 2006. Centenary review, crop losses to pests. In: *The Journal of Agricultural Science*, vol. 144, pp. 31-43. e-ISSN 1469-5146, ISSN 0021-8596.
353. OH, S.Y., NAM, K.W., YOON, D.H. 2014. Identification of *Acremonium acutatum* and *Trichothecium roseum* isolated from grape with white stain symptom in Korea. In: *Mycobiology* [online], vol. 42, nr. 3, pp. 269-273 [citat 07.09.2019]. e-ISSN 2092-9323, ISSN 1229-8093. Disponibil: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4206793/pdf/mb-42-269.pdf
354. OKUMURA, M., SHIRAISHI, A. 2002. Establishment of alfalfa weevil parasitoid and its potential for biological control. In: *Plant Protection*, vol. 56, nr. 8, pp. 329-333. ISSN 2617-1287.
355. OLIVEIRA de, D. G. P., LOPES, R. B., REZENDE, J. M., DELALIBERA, I. 2018. Increased tolerance of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* conidia to high temperature provided by oil-based formulations. In: *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 151, pp. 151-157. ISSN 0022-2011.
356. OSBORNE, L., LANDA, Z. 1992. Biological control of whiteflies with entomopathogenic fungi. In: *Florida Entomologist*, vol. 75, pp. 456-471. e-ISSN 2163-632X, ISSN 1930-4013.
357. OUAYOGODE, B., DAVIS, D. 1981. Feeding by selected predators on alfalfa weevil larvae. In: *Environmental Entomology*, vol. 10, pp. 62–64. e-ISSN 1938-2936, ISSN 0046-225X.
358. PADMAVATHI, J., UMA DEVI, K., UMA MAHESWARA RAO, C. 2003. The optimum and tolerance pH range is correlated to colonial morphology in isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* – a potential biopesticide. In: *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 19, pp. 469–477. e-ISSN 1573-0972, ISSN 0959-3993.

359. PARSA, S., ORTIZ, V., VEGA, F.E. 2013. Establishing fungal entomopathogens as endophytes: towards endophytic biological control. In: *JOVE Journal of Visualized Experiments* [online], vol. 74, article nr. 50360, 5p. [citat 07.02.2020].
Disponibil: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3654456/pdf/jove-74-50360.pdf
360. PASHLEY, C.H., FAIRS, A., FREE, R.C., WARDLAW, A.J. 2012. DNA analysis of outdoor air reveals a high degree of fungal diversity, temporal variability, and genera not seen by spore morphology. In: *Fungal Biology*, vol. 116, nr. 2, pp. 214-224. ISSN 1878-6146.
361. PASS, B.C. 1967. Observations on the oviposition by the alfalfa weevil. In: *Journal of Economic Entomology*, vol. 60, p. 288. e-ISSN 1938-291X, ISSN 0022-0493.
362. PATOCKA, J. 2016. Bioactive metabolites of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*. I: *Military Medical Science Letters (Voj. Zdrav. Listy)*, vol. 85, nr.2, pp. 80-88. ISSN 0372-7025.
363. PELLISSIER, M.E., NELSON, Z., JABBOUR, R. 2017. Ecology and management of the alfalfa weevil (Coleoptera: Curculionidae) in Western United States alfalfa. In: *Journal of Integrated Pest Management* [online], vol. 8, nr. 1, pp. 1-7 [citat 17.02.2020]. e ISSN 2155-7470. Disponibil: https://academic.oup.com/jipm/article/8/1/5/3064074
364. PERJU, T. 1995. *Entomologie agricolă, componentă a protecției integrate a agroecosistemelor*. București: Editura Ceres, 309 p. ISBN 973-40-0312-7.
365. PERLAK, F.J., DEATON, T.A., ARMSTRONG, R.L., FUCHS, S.R., SIMS, J.T., GREENPLATE, J.T., FISCHHOFF, D.A. 1990. Insect resistant cotton plants. In: *Bioyechnology*, vol. 8, pp. 939-943. e-ISSN 1546-1696.
366. PERSSON, Y., VASAITIS, R., LÅNGSTROM, B., OHRN, P., IHRMARK, K., STENLID, J. 2009. Fungi vectored by the bark beetle *Ips typographus* following hibernation under the bark of standing trees and in the forest litter. In: *Microbial Ecology*, vol. 58, nr. 3, pp. 651-659. e-ISSN 1432-184X, ISSN 0095-3628.
367. PETERSEN, K.M., MOLLER, P.L., JESPERSEN, L. 2001. DNA typing methods for differentiation of *Debaryomyces hansenii* strains and other yeasts related to surface ripened cheeses. In: *International Journal of Food Microbiology*, vol. 69 (1-2), pp. 11-24. ISSN 0168-1605.
368. PETRUKHA, O.I. 1969. Kluben'kovye dolgonosiki roda *Sitona* Germ. fauny SSSR, vredyashchie bobovym kul'turam. Leningrad: Nauka, 255 s. [in Russian].
369. PHILIPS, C.R., ROGERS, M.A., KUHAR, T.P. 2014. Understanding farmscapes and their potential for improving IPM programs. In: *Journal of Integrated Pest Management* [online], vol. 5, nr. 1, pp. 1-9 [citat 25.09.2019]. e ISSN 2155-7470.
Disponibil: https://academic.oup.com/jipm/article/5/3/C1/2194144
370. PIATKOWSKI, J., KRZYZEWSKA, A. 2007. Influence of some physical factors on the growth and sporulation of entomopathogenic fungi. In: *Acta Mycologica*, vol. 42, nr. 2 pp. 255-265, 2007. e-ISSN 2353-074X, ISSN 0001-625X (anulat din 2015).
371. PIETRANTONIO, P.V., FEDERICI, B.A., GILL, S.S. 1993. Interaction of *Bacillus thuringiensis* endotoxins with the insect midgut epithelium. In: BECKAGE, N.E.,THOMPSON, S.N., FEDERICI, B.A., eds. *Parasites and pathogens of insects. Vol. 2.* San Diego, CA: Academic Press, , pp. 55-79. ISBN 978-0120844425.
372. PIMENTEL, D. 2002. Introduction: non-native species in the world. In: PIMENTEL, D. ed. *Biological invasions economic and environmental costs of alien plant, animal, and microbe species*. New York: CRC Press, pp. 3-8. ISBN 978-0849308369.
373. PIMENTEL, D. 2005. Environmental and economic costs of the application of pesticides primarily in the United States. In: *Environment, Development and Sustainability*, vol. 7, pp. 229-252. e-ISSN 1573-2975, ISSN 1387-585X.
374. POINAR, G.O., JR. 1979. *Nematodes for biological control of insects*. Boca Raton: CRC Press, 277 p. ISBN 0849353335.
375. POINAR, G.O., JR. 1990. Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In: GAUGLER, R., KAYA, H. K., eds. *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control.* Boca Raton: CRC Press, pp. 23-61. eISBN 9781351071741.
376. POINAR, G.O. JR, GREWAL, P.S. 2012. History of entomopathogenic nematology. In: *Journal of Nematology*, vol. 44, nr. 2, pp. 153-161. eISSN 2640-396X, ISSN 0022-300X.
377. POIRAS, A.A. 2006. *Zhestokrylye nadsemeystva Curculionidae (Insecta, Coleoptera) Respubliki Moldova ih raznoobrazie i znachenie*. Avtoreferat, dokt. dis. Kishinau. [in Russian].

378. POPRAWSKI, T.J., MARCHAL, M., ROBERT, P.H. 1985. Comparative susceptibility of *Otiorhynchus sulcatus* and *Sitona lineatus* (Coleoptera: Curculionidae) early stages to five entomopathogenic Hyphomycetes. In: *Environmental Entomology*, vol. 14, pp. 247-253. e-ISSN 1938-2936, ISSN 0046-225X.
379. POSADAS, J.B., ANGULO, L. M., MINI, J.I., LECUONA, R.E. 2012. Natural tolerance to UV-B and assessment of photoprotectants in conidia of six native isolates of *Beauveria bassiana* (Bals-Criv) Vuillemin. In: *World Applied Sciences Journal*, vol. 20, nr. 7, pp.1024-1030. e-ISSN 1991-6426, ISSN 1818-4952.
380. PRESCOTT, H.W., REEHER, M.H. 1961. The pea leaf weevil, an introduced pest of legumes in the Pacific Northwest. In: *U.S. Department of Agriculture Technological Bulletin*, vol. 1233, 12 p.
381. QUINN M.A., BEZDICEK D.F. 1996. Effect of cryIIIA protein production in nodules on pea-pea leaf weevil (Coleoptera: Curculionidae) interactions. In: *Journal of Economic Entomology*, vol., pp. 550-557. e-ISSN 1938-291X.
382. QUINN, M.A., BEZDICEK, D.F., SMART, L.E., MARTIN, J. 1999. An aggregation pheromone system for monitoring pea leaf weevil (Coleoptera: Curculionidae) in the Pacific Northwest. In: *Journal of the Kansas Entomological Society*, vol. 72, pp. 315-321.e-ISSN 1937-2353, ISSN 0022-8567.
383. RADCLIFFE, E.B., FLANDERS, K.L. 1998. Biological control of alfalfa weevil in North America. In: *Integrated Pest Management Reviews*, vol. 3, pp. 225–242. ISSN 1572-9745.
384. RAKEMAN, J.L., BUI, U., LAFE, K., CHEN, Y.C., HONEYCUTT, R.J.. COOKSON, B.T. 2005. Multilocus DNA sequence comparisons rapidly identify pathogenic molds. In: *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 43, nr. 7, pp. 3324-3333. e-ISSN 1098-660X, ISSN 0095-1137.
385. RANGEL, D.E.N., ANDERSON, A.J., ROBERTS, D.W. 2008. Evaluating physical and nutritional stress during mycelial growth as inducers of tolerance to heat and UV-B radiation in *Metarhizium anisopliae* conidia. In: *Mycological Research*, vol. 112, pp. 1362-1372. ISSN 0953-7562.
386. RANGEL, D.E.N., BRAGA, G.U.L., ANDERSON, A.J., ROBERTS, D.W. 2005. Variability in conidial thermotolerance of *Metarhizium anisopliae* isolates from different geographic regions. In: *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 88, pp. 116-125. ISSN 0022-2011.
387. RATH, S., SAHU, M.C., DUBEY, D., DEBATA N.K., PADHY R.N. 2011. Which value should be used as the lethal concentration 50 (LC_{50}) with bacteria? In: *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences*, vol. 3, pp. 138-143. e-ISSN 1867-1462, ISSN 1913-2751.
388. REDDY, G.V.P., SHRESTHA, G., MILLER, D.A., OEHLSCHLAGER, A.C. 2018. Pheromone-trap monitoring system for pea leaf weevil, *Sitona lineatus*: effects of trap type, lure type and trap placement within fields. In: *Insects* [online], vol. 9, article nr. 75, 11 p [citat 10.03.2020]. Disponibil: https://doi.org/10.3390/insects9030075
389. *Registrul de Stat al Produselor de Uz Fitosanitar și Fertilizanților* [citat 08.07.2020]. Disponibil: http://www.pesticide.md/indice-de-produse/
390. Regulamentul (CE) Nr. 1107/2009 al Parlamentului European și al Consiliului din 21 octombrie 2009 privind introducerea pe piață a produselor fitosanitare și de abrogare a Directivelor 79/117/CEE și 91/414/CEE ale Consiliului [citat 19.11.2018]. Disponibil: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/RO/TXT/PDF/?uri=CELEX:02009R1107-20140630&qid=1500813608053&from=RO
391. REHNER, S.A., BUCKLEY, E. 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-alpha sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. In: *Mycologia*, vol. 97, nr. 1, pp. 84-98. e-ISSN 1557-2536, ISSN 0027-5514.
392. REHNER, S.A., MINNIS, A.M., SUNG, G.H., LUANGSA-ARD, J.J., DEVOTTO, L., HUMBER, R.A. 2011. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. In: *Mycologia*, vol. 103, nr. 5, pp. 1055-1073. e-ISSN 1557-2536, ISSN 0027-5514.
393. REKALO, E.P. 1888. O vrednykh nasekomykh Bessarabii v 1887 g. In: *Iz otchetov Bessarabskoy gubernskoy Zemskoy Upravy*. Kishinev, 42 s. [in Russian].
394. RENKER, C., OTTO, P., SCHNEIDER, K., ZIMDARS, B., MARAUN, M., BUSCOT, F. 2005. Oribatid mites as potential vectors for soil microfungi: study of mite-associated fungal species. In: *Microbial Ecology*, vol. 50, nr. 4, pp. 518-528. e-ISSN 1432-184X, ISSN 0095-3628.
395. RENKER, C., WEISSHUHN, K., KELLNER, H., BUSCOT, F. 2006. Rationalizing molecular analysis of field-collected roots for assessing diversity of arbuscular mycorrhizal fungi: to pool, or

not to pool, that is the question. In: *Mycorrhiza*, vol. 16, nr. 8, pp. 525-531. e-ISSN 1432-1890, ISSN 0940-6360.
396. RIBES, J.A., VANOVER-SAMS, C.L., BAKER, D.J. 2000. Zygomycetes in human disease. In: *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 13, nr. 2, pp. 236-301. e-ISSN 1098-6618, ISSN 0893-8512.
397. RIEDEL, W., STEENBERG, T. 1998. Adult polyphagous coleopterans overwintering in cereal boundaries: winter mortality and susceptibility to the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. In: *BioControl*, vol. 43, pp. 175-188. e-ISSN 1573-8248, ISSN 1386-6141.
398. RIVERA-VARAS, V.V., FREEMAN, T.A., GUDMESTAD, N.C., SECOR, G.A. 2007. Mycoparasitism of *Helminthosporium solani* by *Acremonium strictum*. In: *Phytopathology*, vol. 97, nr. 10, pp. 1331-37. e-ISSN 1545-2107.
399. ROBENE-SOUSTRADE, I., JOUEN, E., PASTOU, D., PAYET HOAREAU, M., GOBLE, T., LINDERME, D., LEFEUVRE, P., CALMÈS, C., REYNAUD, B., NIBOUCHE, S., COSTET, L. 2015. Description and phylogenetic placement of *Beauveria hoplocheli* sp. nov. used in the biological control of the sugarcane white grub, *Hoplochelus marginalis*, in Reunion Island. In: *Mycologia*, vol. 107, pp. 1221-1232. e-ISSN 1557-2536, ISSN 0027-5514.
400. ROBERTS, S. J., DEWITT, J. R., ARMBRUST, E. J. 1970. Predicting spring hatch of the alfalfa weevil. In: *Journal of Economic Entomology*, vol. 63, pp. 921-923. e-ISSN 1938-291X, ISSN 0022-0493.
401. RODRIGUEZ, A., PERESTELO, F., CARNICERO, A., REGALADO, V., PEREZ, R., de la FUENTE, G., FALCON, M.A. 1996. Degradation of natural lignins and lignocellulosic substrates by soil-inhabiting fungi imperfecti. In: *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 21, pp. 213-219. e-ISSN 1574-6941, ISSN 0168-6496.
402. RODRIGUEZ, M., GERDING, M., FRANCE, A. 2009. Selection of entomopathogenic fungi to control *Varroa destructor* (Acari: Varroidae). In: *Chilean Journal of Agricultural Research* [online], vol. 69, nr. 4, pp. 534-540 [citat 23.09.2019]. e-ISSN 0718-5839. Disponibil: http://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392009000400008.
403. ROHRLICH, C., MERLE, I., MZE HASSANI, I., VERGER, M., ZUIN, M., BESSE, S., ROBENE, I., NIBOUCHE, S., COSTET, L. 2018. Variation in physiological host range in three strains of two species of the entomopathogenic fungus *Beauveria*. In: *PLoS One* [online], vol. 13, nr. 7, article nr. e0199199. e-ISSN 1932-6203.
Disponibil: https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0199199
404. ROPARS, J., CRUAUD, C., LACOSTE, S., DUPONT, J. 2012. A taxonomic and ecological overview of cheese fungi. In: *International Journal of Food Microbiology*, vol. 155, nr. 3, pp. 199-210. ISSN 0168-1605.
405. ROPEK, D., JAWORSKA, M. 1994. Effect of an entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae* Weiser (Nematoda, Steinernematidae), on carabid beetles in field trials with annual legumes. In: *Journal of Pest Science*, vol. 64, pp. 97-100. e-ISSN 1612-4766, ISSN 1612-4758.
406. ROTREKL, J., CEJTCHAML, J. 2008. Control by seed dressing of leaf weevils of the genus *Sitona* (Col.: Curculionidae) feeding on sprouting alfalfa. In: *Plant Protection Science*, vol. 44, pp. 61-67. e-ISSN 1805-9341, ISSN 1212-2580.
407. SADHNA, S., HAWALDAR, R.2015. Isolation of *Cryptococcus laurentii* in bal fluid in an asthmatic patient -a case report. In: *Indian Journal ofMicrobiology Research* [online], vol.2, nr. 1, pp. 72-75 [citat 17.09.2019]. e-ISSN 2394-5478, ISSN 2394-546X. Disponibil: http://oaji.net/articles/2015/1754-1432807682.pdf
408. SAJEENA, A., NAIR, D.S., SREEPAVAN, K. 2020. Non-pathogenic *Fusarium oxysporum* as a biocontrol agent. In: *Indian Phytopathology* [online], vol. 73, pp. 177-183. e-ISSN 1545-2107. Disponibil: https://doi.org/10.1007/s42360-020-00226-x
409. SAMSON, R.A. 1974. *Paecilomyces* and some allied Hyphomycetes. In: *Studies in Mycology*, vol. 6, p. 38. ISSN 0166-0616.
410. SAMSON, R.A., EVANS, H.C., LATGE, J.P. 1988. *Atlas of entomopathogenic fungi*. Berlin, Germany: Springer-Verlag, ISBN 978-3-662-05890-9.
411. SAMSON, R.A., HOEKSTRA, E.S., FRISVAD, J.C. 2004. *Introduction to food- and air borne fungi. 7th Ed*. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 389p. ISBN 9070351528.

412. SANAHUJA, G., BANAKAR, R., TWYMAN, R., CAPELL, T., CHRISTOU, P. 2011. *Bacillus thuringiensis:* a century of research, development and commercial applications. In: *Plant Biotechnology Journal*, pp. 283 -300. e-ISSN 1467-7652.
413. SANJUAN, T., TABIMA, J., RESTREPO, S., LAESSOE, T., SPATAFORA, J.W., FRANCO-MOLANO, A.E. 2014. Entomopathogens of Amazonian stick insects and locusts are members of the *Beauveria* species complex (*Cordyceps* sensu stricto). In: *Mycologia*, vol. 106, pp. 260–275. e-ISSN 1557-2536, ISSN 0027-5514.
414. SANTELLI, C.M., PFISTER, D.H., LAZARUS, D., SUN, L., BURGOS, W.D., HANSEL, C.M. 2010. Promotion of Mn(II) oxidation and remediation of coal mine drainagein passive treatment systems by diverse fungal and bacterial communities. In: *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 76, nr. 14, pp. 4871-4875. e-ISSN 1098-5336, ISSN 0099-2240.
415. SARANRAJ, P., JAYAPRAKASH, A. 2017. Agrobeneficial entomopathogenic fungi – *Beauveria bassiana*: a review. In: *Indo – Asian Journal of Multidisciplinary Research (IAJMR)*, vol. 3, nr. 2, pp. 1051-1087. ISSN: 2454-1370.
416. SCHITEA, M. 2010. Rezultate în ameliorarea lucernei la I.N.C.D.A. Fundulea în perioada 2000-2009. In: *An. I.N.C.D.A. Fundulea*, vol. LXXVIII, (2).
417. SCHOCH, C.L., SHOEMAKER, R.A., SEIFERT, K.A., HAMBLETON, S., SPATAFORA, J.W., CROUS, P.W. 2006. A multigene phylogeny of the Dothideomycetes using four nuclear loci. In: *Mycologia*, vol. 98, nr. 6, pp. 1041-1052. e-ISSN 1557-2536, ISSN 0027-5514
418. SCHOTZKO, D.J., O'KEEFFE, L.E. 1986 a. Reproductive system maturation and changes in flight muscles of female pea leaf weevils (Coleoptera: Curculionidae). In: *Annals of the Entomological Society of America*, vol. 79, pp. 109-111. e-ISSN 1938-2901, Print ISSN 0013-8746.
419. SCHOTZKO, D.J., O'KEEFFE, L.E. 1986 b. Ovipositional rhythms and egg melanization rate of *Sitona lineatus* (L.) (Coleptera: Curculionidae). In: *Environmental Entomology*, vol. 15, pp. 601-606. e-ISSN 1938-2936, ISSN 0046-225X.
420. SCHOTZKO, D.J., O'KEEFFE, L.E. 1988. Effects of food type, duration of hibernal quiescence, and weevil density on longevity of *Sitona lineatus* (Coleoptera: Curculionidae). In: *Journal of Economic Entomology*, vol 81, pp. 1631-1636. e-ISSN 1938-291X.
421. SEAMAN, D. 1990. Trends in the formulation of pesticides: An overview. In: *Pest Management Science*, vol. 29, nr. 4, p. 437-449. e-ISSN 1526-4998.
422. SEIDENGLANZ, M., ROTREKL, J., SMYKALOVA, I., POSLUSNA, J., KOLARIK, P. 2010. Differences between the effects of insecticidal seed and foliar treatments on pea leaf weevils (*Sitona lineatus* L.) in the field pea (*Pisum sativum* L.). In: *Plant Protection Science* [online], vol. 46, nr. 1, pp. 19–27 [citat 07.11.2018]. e-ISSN 1805-9341, ISSN 1212-2580. Disponibil: https://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/34_2009-PPS.pdf.
423. SEIFERT, K.A., LOUIS-SEIZE, G., SAVARD, M.E. 1997. The phylogenetic relationships of two trichothecene-producing hyphomycetes, *Spicellum roseum* and *Trichothecium roseum*. In: *Mycologia*, vol. 89, nr. 2, pp. 250-257. e-ISSN 1557-2536, ISSN 0027-5514.
424. SENER, A.G., YUCESOY, M., SENTURKUN, S., AFSAR, I., YURTSEVER, S.G., TURK, M. 2008. A case of *Acremonium strictum* peritonitis. In: *Medical Mycology*, vol. 46, nr. 5, pp. 495-497. e-ISSN 1460-2709, ISSN 1369-3786
425. SEVIM A., DEMIR, I., HOFTE, M., HUMBER, R.A., DEMIRBAG, Z. 2010. Isolation and characterization of entomopathogenic fungi from hazelnut-growing region of Turkey. In: *BioControl*, vol. 55, nr. 2, ppp. 279-297. e-ISSN 1573-8248, ISSN 1386-6141
426. SHADE, R.E., HINTZ, T.R. 1983. Factors influencing alfalfa weevil (Coleoptera: Curculionidae) egg hatch and larval establishment. In: *Environmental Entomology*, vol. 12, pp. 1129-1132. e-ISSN 1938-2936, ISSN 0046-225X.
427. SHAH, N.K., AZMI, M.I., TYAGI, P.K. 2011. Pathogenicity of Rhabditid nematodes (Nematoda: Heterorhabditidae and Steinernematidae) to the grubs of alfalfa weevil, *Hypera postica* (Coleoptera: Curculionidae). In: *Range Management and Agroforestry*, vol. 32, pp. 64-67. ISSN 0971-2070.
428. SHANMUGAM, V., DHYANI, D., ANANTHAPADMANABAN, D. 2011. First report of *Alternaria* sp. causing blight on *Incarvillea emodi*. In: *Australasian Plant Disease Notes* [online], vol. 6, nr. 1, pp. 33-35 [citat 18.11.2019]. ISSN 1833-928X.
Disponibil: https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s13314-011-0012-z.pdf

429. SHARMA, A., HAZARIKA, N. K., BARUA, P., SHIVAPRAKASH, M R, CHAKRABARTI, A. 2013. *Acremonium strictum*: report of a rare emerging agent of cutaneous hyalohyphomycosis with review of literatures. In: *Mycopathologia*, vol. 176, pp. 435-441. e-ISSN 1573-0832, ISSN 0301-486X.
430. SHARMA, A., KUMAR, S., BHATNAGAR, R.K. 2011. *Bacillus thuringiensis* Protein Cry6B (BGSC ID 4D8) is toxic to larvae of *Hypera postica*. In: *Current Microbiology*, vol. 62, pp. 597-605. e-ISSN 1432-0991, ISSN 0343-8651.
431. SHARMA, S., AGARWAL, G.P., RAJAK, R.C. 1992. Effect of temperature, pH and light on toxin production by *Beauveria bassiana* (Bal) Vuill. *Indian Journal of Experimental Biology*, vol. 30, pp. 918-919. e-ISSN 0975-1009, ISSN 0019-5189.
432. SHIMIZU, S., MITANI, T. 2000. Effects of temperature on viability of conidia from Beauveria bassiana in oil formulations. In: *Journal of Applied Entomology and Zoology*, vol. 44, nr. 1, pp. 51-53. e-ISSN 1347-605X, ISSN 0003-6862.
433. SHIN, S., CLARKE, D.J., LEMMON, A.R., MORIARTY LEMMON, E., AITKEN, A.I., HADDAD, S., FARRELL, B.D., MARVALDI, A.E, OBERPRIELER, R.G., MCKENNA, D.D. 2018. Phylogenomic data yield new and robust insights into the phylogeny and evolution of weevils. In: *Molecular Biology and Evolution*, vol. 35, nr. 4, pp. 823-836. e-ISSN 1537-1719, ISSN 0737-4038.
434. SILVA, S., LICEN, M., FRISVAD, J.C., GUNDE-CIMERMAN, N. 2010. The mycobiota of three dry-cured meat products from Slovenia. In: *Food Microbiology*, vol. 28, nr. 3, pp. 373-376. ISSN 0740-0020.
435. SIMMONDS, F.J., FRANZ, J. M., SAILER, R. I. 1976. History of biological control. In: HUFFAKER, C. B., MESSENGER, P. S., eds. *Theory and Practice of Biological Control*. New York: Academic Press, 788 pp. ISBN 978-0-12-360350-0.
436. SINGH, D., RAINAB, T. K., SINGHA, J. 2017. Entomopathogenic Fungi: An Effective Biocontrol Agent for Management of Insect Populations Naturally In: *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, vol. 9, nr. 6, pp. 830-839, ISSN 0975-1459.
437. SKINNER, M., PARKER, B.L., KIM, J.S. 2014. Chapter 10 - Role of entomopathogenic fungi in Integrated Pest Management. In: ABROL, D.P., ed. *Integrated Pest Management*. Academic Press, pp. 169-191, ISBN 978-0-12-398529-3. Disponibil: https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398529-3.00011-7
438. SKOT, L., TIMMS, E. E., MYTTON, L.R. 1994. The effect of toxin-producing *Rhizobium* strains on larvae of *Sitona* flavescens feeding on legume roots and nodules. In: *Plant and Soil*, vol. 63, pp. 141-150. e-ISSN 1573-5036, ISSN 0032-079X.
439. SKOUBOE, P., FRISVAD, J.C., TAYLOR, J.W., LAURITSEN, D., BOYSEN, M., ROSSEN L. 1999. Phylogenetic analysis of nucleotide sequences from the ITS region of terverticillate *Penicillium* species. In: *Mycological Research*, vol. 103, nr. 7, pp. 873-881. ISSN 0953-7562.
440. SKUHROVEC, J. 2006. Identification of instars of *Hypera postica* using chaetotaxy. In: *Journal of Economic Entomology*, vol. 99, nr. 6, pp. 2216-2218. e-ISSN 1938-291X.
441. SMITH, P. 1993. Control of *Bemisia tabaci* and the potential of *Paecilomyces fumosoroseus* as a biopesticide. In: *Biocontrol News and Information*, vol. 14, pp. 71-78.
442. SPAINK, H.P. 1994. The molecular basis of the host specificity of the *Rhizobium* bacteria. In: *Antoine van Leeuwenhoek*, vol. 65, pp. 81-98. e-ISSN 1572-9699, ISSN 0003-6072.
443. ST. LEGER, R. 1993. Biology and mechanisms of insect-cuticle invasion by Deuteromycete fungal pathogens. In: BECKAGE, N.E., THOMPSON, S.N., FEDERICI, B.A., eds. *Parasites and pathogens of insects. Vol. 2*. San Diego, CA: Academic Press, pp. 211-229. ISBN 978-0-12084-4-425.
444. ST. LEGER, R.J., JOSHI, L., ROBERTS, D. 1998. Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. In: *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 64, pp. 709-713. e-ISSN 1098-5336, ISSN 0099-2240.
445. ST. LEGER, R.J., WANG, C. 2010. Genetic engineering of fungal biocontrol agents to achieve greater efficacy against insect pests. In: *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 85, pp. 901-907. e-ISSN 1432-0614, ISSN 0175-7598.
446. STARODUB, V. 2008. *Tehnologii în fitotehnie*. Chișinău: Centrul Ed. UASM, 399 p. ISBN 978-9975-64-121-0.

447. STEENBERG, T., RAVN, H.P. 1996. Effect of *Beauveria bassiana* against overwintering pea leaf weevil, *Sitona lineatus*. In: *IOBC WPRS Bulletin*, vol. 19, nr. 9. pp. 183-185. ISSN 1027-3115.
448. STEENE van de, F., VULSTEKE, G., de PROFT, M., CALLEWAERT, D. 1999. Seed coating to control the pea leaf weevil, *Sitona lineatus* (L.) in pea crops. In: *Journal of Plant Diseases and Protection*, vol. 106, pp. 633-637. ISSN 1861-3829.
449. STERN, V.M., SMITH, R.F, VAN DEN BOSCH, R., HAGEN, K.S. 1959. The integrated control concept. In: *Hilgardia*, vol. 29, pp. 81-101.
450. STONER, M.F. 1981. Ecology of *Fusarium* in noncultivated soils. In: NELSON, P.E., TOUSSOUN, T.A., COOK, R.J. eds. *Fusarium: Diseases, Biology, and Taxonomy*. The Pennsylvania State University Press, University Park, pp. 276-286. ISBN 9780271002934.
451. SUBRAMANIAN, S.B., YAN, S., TYAGI, R.D., SURAMPALLI, R.Y. 2008. A new, pellet-forming fungal strain: its isolation, molecular identification, and performance for simultaneous sludge-solids reduction, flocculation, and dewatering. In: *Environmental Research*, vol. 80, nr. 9, pp. 840-852. ISSN 0013-9351.
452. SUMMERBELL, R.C., GUEIDAN, C., SCHROERS, H. J., de HOOG, G. S., STARINK, M., ROSETE, Y. A., GUARRO, J., SCOTT, J. A. 2011. *Acremonium* phylogenetic overview and revision of *Gliomastix*, *Sarocladium*, and *Trichothecium.* In: *Studies in Mycology*, vol. 68, pp. 139-162. ISSN 0166-0616.
453. SWEETMAN, H.L. 1936. *The biological control of insects : with a chapter on weed control*. Ithaca, N. Y. : Comstock Pub. Co., 461 p.
454. TADROS, F. 2005. *Applied surfactants, principles and applications.* Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA, pp. 187-256. e-ISBN 9783527604814, ISBN 9783527306299.
455. TAKANO, K. ITOH, Y., OGINO, T., KUROSAWA, K., SASAKI, K. 2006. Phylogenetic analysis of manganese-oxidizing fungi isolated from manganese-rich aquatic environments in Hokkaido, Japan. In: *Limnology*, vol. 7, pp. 219-223. e-ISSN 1439-863X, ISSN 1439-8621.
456. TALWAR, N. 2015. Trophic relationship, annual cycle, seasonal diapause and pest potentiality of alfalfa weevil, *Hypera postica* (Gyll.) (Hyperinae: Curculionidae: Coleoptera). In: *ÇOMÜ Zir. Fak. Derg.* (*COMU J. Agric. Fac.*) [online], vol. 3, nr. 1, pp. 9-13 [citat 09.12.2019]. Disponibil: http://dergi.comu.edu.tr/dosyalar/Ziraat/cilt-3-sayi-1.pdf#page=16
457. TAMURA, M., KAWAHARA, K., SUGIYAMA, J. 2000. Molecular phylogeny of *Aspergillus* and associated teleomorphs in the Trichocomaceae (Eurotiales). In: SAMSON, R.A., PITT, J.I., eds. *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification*. Amsterdam, The Netherlands, pp. 357-372. ISBN 9058231593.
458. TANADA, Y., FUXA, J.R. 1987. The pathogen population. In: FUXA, J.R., TANADA, Y., eds. *Epizootiology of insect diseases*. New York: John Wiley & Sons, pp. 113-157, 576 p. ISBN 978-0-471-87812-4.
459. TANADA, Y., KAYA, H.K. 1993. *Insect Pathology*. San Diego: Academic Press, 1993, 666 p. e-ISBN 9780080926254.
460. TANG, Y.J., ZHAO, W., LI, H.M. 2011. Novel tandem biotransformation process for the biosynthesis of a novel compound, 4-(2,3,5,6-tetramethyl pyrazine-1)-4'-demethylepipodophyllo-toxin. In: *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 77, nr. 9, pp. 3023-3034. e-ISSN 1098-5336, ISSN 0099-2240.
461. TEETOR-BARSCH, G.H., ROBERTS, D.W. 1983. Entomogenous *Fusarium* species. In: *Mycopathologia*, vol. 84, pp. 3-16. e-ISSN 1573-0832, ISSN 0301-486X.
462. TEFERA, T., VIDAL, S. 2009. Efect of inoculation method and plant growth medium on endophytic colonizationof sorghum by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. In: *Biocontrol*, vol. 54, pp. 663-669. e-ISSN 1573-8248, ISSN 1386-6141.
463. TEJESVI, M.V., SEGURA, D.R., SCHNORR, K.M., SANDVANG, D., MATTILA, S., OLSEN, P.B., NEVE, S., KRUSE, T., KRISTENSEN, H.H., PIRTTILA, A.M. 2013. An antimicrobial peptide from endophytic *Fusarium tricinctum* of *Rhododendron tomentosum* Harmaja. In: *Fungal Diversity*, vol. 60, nr. 1, pp. 153-159. e-ISSN 1878-9129, ISSN 1560-2745.
464. TESFAYE, M., SAMAC, D.A., LAMB, J.F.S. 2009. Alfalfa. In: CHITTARANJAN, K., TIMOTRY, C.H., eds. *Compendium of transgenic crop*. New York: Wiley, pp. 199-210, 2776 p. ISBN 978-1-405-16924-0.

465. TEVINI, M. 1993. Molecular biological effects of ultraviolet radiation. In: TEVINI, M., ed. *UV-B radiation and ozone depletion: effects on humans, animals, plants, microorganisms, and materials*. Boca Raton: Lewis Publishers, pp. 1-15, 256 p. ISBN 978-0873719117.
466. THOM, C., CHURCH, M. 1926. *The Aspergilli*. Baltimore: Williams & Wilkins Comp., p. 155, 272 p.
467. THOMAS, E.D., HEIMPEL, A.M., ADAMS, J.R. 1974. Determination of the active nuclear polyhedrosis virus content of untreated cabbages. In: *Environmental Entomology*, vol. 3, pp. 908-910. e-ISSN 1938-2936, ISSN 0046-225X.
468. TOHIDFAR, M., NASER, Z., GHOLAMREZA, S.J., SEIDE, M.E. 2013. *Agrobacterium*-mediated transformation of alfalfa (*Medicago sativa*) using a synthetic cry3a gene to enhance resistance against alfalfa weevil. In: *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol.113, pp. 227-235. e-ISSN 1573-5044, ISSN 0167-6857.
469. TONG, S., FENG, M. 2020. Phenotypic and molecular insights into heat tolerance of formulated cells as active ingredients of fungal insecticides. In: *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 104, pp. 5711–5724. e-ISSN 1432-0614, ISSN 0175-7598.
470. TORRES, D.E., ROJAS-MARTINEZ, R.I., ZAVALETA-MEJIA, E., GUEVARA-FEFER, P., MARQUEZ-GUZMAN, G.J., PEREZ-MARTINEZ, C. 2017. *Cladosporium cladosporioides* and *Cladosporium pseudocladosporioides* as potential new fungal antagonists of *Puccinia horiana* Henn., the causal agent of chrysanthemum white rust. In: *PLoS One* [online], vol. 12, nr. 1, article nr. e0170782, 16p [citat 07.07.2019]. Disponibil: https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0170782&type=printable
471. TROVAO, J., MESQUITA, N., PAIVA, D.S., PAIVA DE CARVALHO, H., AVELAR, L., PORTUGAL, A. 2013. Can arthropods act as vectors of fungal dispersion in heritage collections? A case study on the archive of the University of Coimbra, Portugal. In: *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 79, pp. 49-55. ISSN 0964-8305.
472. TUCKER, D.L., BERESFORD, C.H., SIGLER, L., ROGERS, K. 2004. Disseminated *Beauveria bassiana* infection in a patient with acute lymphoblastic leukemia. In: *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 42, nr. 11, pp. 5412-5414. e-ISSN 1098-660X, ISSN 0095-1137.
473. TURAEV, N.S. 1957. Gorokhovye sloniki (*S. lineatus* i *S. crinitus* Hbst.). In: *Trudy Sverdlovskogo SKhI*. Sverdlovsk, t. 1, s. 125-250. [in Russian].
474. TYSOWSKY, M., DORSEY, C.K. 1970. Hibernation and estivation habits of the alfalfa weevil in West Virginia. In: *Journal of Economic Entomology*, vol. 63, pp. 347-350. e-ISSN 1938-291X, ISSN 0022-0493.
475. URBAN, J. 2015. Occurrence, biology and harmfulness of *Byctiscus betulae* (L.) (Coleoptera, Rhynchitidae). In : *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, vol. 63, nr. 5, pp. 1601-1624. ISSN 1211-8516.
476. USANMAZ-BOZHUYUK, A., KORDALI, S., KESDEK, M., SIMSEK, D., ALTINOK, M.A., ALTINOK, H.H., KOMAKI, A. 2018. Mortality effects of six different entomopathogenic fungi strains on rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). In: *Fresenius Environmental Bulletin*, vol. 27, pp. 4373-4380. ISSN 1018-4619.
477. VALICENTE, F., da SILVA R.B. 2017. Characterization of *Bacillus thuringiensis* using plasmid patterns, AFLP and Rep-PCR. In: *Bacillus thuringiensis and Lysinibacillus sphaericus*. Springer International Publishing AG, pp. 79-87. ISBN 978-3-319-56677-1.
478. VANKOSKY, M.A., CARCAMO, H.A., DOSDALL, L.M. 2009. Distribution, biology and integrated management of the pea leaf weevil, *Sitona lineatus* L. (Coleoptera: Curculionidae), with an analysis of research needs. In: *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, vol. 4, nr. 7, PP. 1-18. ISSN 1749-8848.
479. VANKOSKY, M., CARCAMO, H.A., DOSDALL, L.M. 2011. Identification of potential natural enemies of the pea leaf weevil, Sitona lineatus L. in western Canada. In: *Journal of Applied Entomology* [online], vol. 135, pp. 293-301 [citat 22.10.2018]. e-ISSN 1439-0418 Disponibil: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1439-0418.2010.01542.x
480. VEGA, F.E., POSADA, F., PETERSON, S.W., GIANFAGNA, T.J. ŞI CHAVES, F. 2006. *Penicillium* species endophytic in coffee plants and ochratoxin A production. In: *Mycologia*, vol. 98, nr. 1, pp. 31-42. e-ISSN 1557-2536, ISSN 0027-5514.

481. VEGA, F.E., MEYLING, N.V., LUANGSA-ARD, J.J., BLACKWELL, M. 2012. Fungal Entomopathogens. In: VEGA, F., KAYA, H.K., eds. *Insect Pathology. 2nd Edition*. San Diego, CA: Academic Press, p. 171-220. eBook ISBN 978-0-12384-9-854, ISBN 978-0-12384-9-847.
482. VELAZQUEZ DE CASTRO, A.J., ALONSO-ZARAZAGA, M.A., OUTERELO, R. 2007. Systematics of Sitonini (Coleoptera: Curculionidae: Entiminae), with a hypothesis on the evolution of feeding habits. In: *Systematic Entomology*, vol. 32, pp. 312-331. e-ISSN:1365-3113.
483. VERESHCHAGIN, B.V. 1968. O nekotorykh kompleksakh, sistematicheskikh gruppakh i diagnostike dendrofil'nykh nasekomykh Moldavii. In: *Vrednaya i poleznaya fauna bespozv. Moldavii. Vyp.3.* Kishinev: Shtiintsa, pp. 3 - 28. [in Russian].
484. VERKLEIJ, F.N., van AMELSVOORT, P.A.M., SMITS, P.H. 1992. Control of the pea weevil (*Sitona lineatus* L.) (Col., *Curculionidae*) by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* in field beans. In: *Journal of Applied Entomology*, vol. 113, pp. 183-193. e-ISSN 1439-0418.
485. VIDAL, S., JABER, L.R. 2015. Entomopathogenic fungi as endophytes: plant-endophyte-herbivore interactions and prospects for use in biological control. In: *Current Science*, vol. 109, pp. 46–54. ISSN 0011-3891.
486. VITKOVSKIY, N. 1913. Kratkiy obzor glavneyshikh vrediteley i bolezney kul'turnykh i dikorastushchikh rasteniy, nablyudavshikhsya v 1912 g. v Bessarabskoy gubernii. In: *Trudy Bessarab. ob-va estestvoispytat. i lyubit. estestvoznaniya. T.4*, c. 263 - 277. [in Russian].
487. VOLOŞCIUC, L. 2015. Realizări în protecţia microbiologică a plantelor. In: *Revista de Ştiinţă, Inovare, Cultură şi Artă „Akademos”*, nr. 3(38), pp. 57-64. ISSN 1857-0461.
488. VU, D., GROENEWALD, M., SZOKE, S., CARDINALI, G., EBERHARDT, U., STIELOW, B., de VRIES, M., VERKLEIJ, G.J., CROUS, P.W., BOEKHOUT, T., ROBERT,V. 2016. DNA barcoding analysis of more than 9000 yeast isolates contributes to quantitative thresholds for yeast species and genera delimitation. In: *Studies in Mycology*, vol. 85, pp. 91-105. ISSN 0166-0616.
489. VU, D., GROENEWALD, M., de VRIES, M., GEHRMANN, T., STIELOW, B., EBERHARDT, U., AL-HATMI, A., GROENEWALD, J.Z., CARDINALI, G., HOUBRAKEN, J., BOEKHOUT, T., CROUS, P.W., ROBERT, V., VERKLEY, G.J.M. 2019. Large-scale generation and analysis of filamentous fungal DNA barcodes boosts coverage for kingdom fungi and reveals thresholds for fungal species and higher taxon delimitation. In: *Studies in Mycology*, vol. 92, pp. 135-154. ISSN 0166-0616.
490. VUJANOVIC, V., HAMELIN, R.C., BERNIER, L., VUJANOVIC, G., ST-ARNAUD, M. 2007. Fungal diversity, dominance, and community structure in the rhizosphere of clonal Picea mariana plants throughout nursery production chronosequences. In: *Microbial Ecology*, vol. 54, nr. 4, pp. 672-684. e-ISSN 1432-184X, ISSN 0095-3628.
491. WAGNER, B.L., LEWIS, L.C. 2000. Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. In: *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 66, nr. 8, pp. 3468-3473. e-ISSN 1098-5336, ISSN 0099-2240.
492. WANG, B., WANG, L. 2013. *Penicillium kongii*, a new terverticillate species isolated from plant leaves in China. In: *Mycologia*, vol. 105, nr. 6, pp. 1547-1554. e-ISSN 1557-2536, ISSN 0027-5514.
493. WANG, H., UMEOKOLI, B.O., EZE, P., HEERING, C., JANIAK, C., MÜLLER, W.E.G., ORFALI, R.S., HARTMANN, R., DAI, H., LIN, W., LIU, Z., PROKSCH, P. 2017. Secondary metabolites of the lichen-associated fungus *Apiospora montagnei*. In: *Tetrahedron Letters*, vol. 58, nr. 17. ISSN 0040-4039.
494. WANG, J.B., ST. LEGER, R.J., WANG, C. 2016. Advances in genomics of entomopathogenic fungi. In: *Advances in Genetics*, vol. 94, pp. 67-105. ISSN 0065-2660.
495. WANG, Z.-Z., LIU, Y.-Q., SHI, M., HUANG, J.-H., CHEN, X.-X. 2019. Parasitoid wasps as effective biological control agents. In: *Journal of Integrative Agriculture*, vol. 18, nr. 4, pp. 705-715. ISSN 2095-3119.
496. WANNER, K.W. 2016. Pea Leaf Weevil. Bozeman, MT, USA: MontGuide; Montana State University, pp. 1–2.
497. WATSON, D.W., GEDEN, C.J., LONG, S.J., RUTZ, D.A. 1995. Efficacy of *Beauveria bassiana* for controlling the house fly and stable fly (Diptera: Muscidae). In: *Biological Control*, vol. 5, pp. 405-411. ISSN 1049-9644.
498. WEAVER, J.E., BALASKO, J.A., TOWNSEND, E.C. 1993. Effects of alfalfa weevil (Coleoptera: Curculionidae) larval population densities on yield and quality of alfalfa. In: *Journal of Agricultural*

Entomology [online], vol. 10, nr. 1, pp. 35-43 [citat 22.10.2018]. ISSN 0735-939X. Disponibil: http://scentsoc.org/Volumes/JAE/v10/1/00101035.pdf

499. WENZEL RODRIGUES, I.M., FORIM, M.R., SILVA, M.F., FERNANDES, J.B., BATISTA FILHO, A.B. 2016. Effect of ultraviolet radiation on fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, pure and encapsulated, and bio-insecticide action on *Diatraea saccharalis*. In: *Advances in Entomology* [online], vol. 4, pp. 151-162 [citat 19.02.2020]. e-ISSN 2331-2017, Print 2331-1991 Disponibil: https://www.scirp.org/journal/paperinformation.aspx?paperid=68528
500. WERF van der, H.M. 1996. Assessing the impact of pesticides on the environment. In: *Agriculture, Ecosystems and Environment*, vol. 60, pp. 81-96. ISSN 0167-8809.
501. WERNER, M., SAAR, K., DIETRICH, S. 2015. Establishing of the entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* as an endophyte in *Triticum aestivum* and molecular detection of strain JKI-BI-1496. In: *JKI (Hrsg.): Achtes Nachwuchswissenschaftlerforum. 19-21 Oktober 2015, in Quedlinburg. Abstracts (Berichte aus dem Julius-Kühn-Institut 181), Quedlinburg, Ribbesbüttel, 17*.
502. WHITE, C.E., ARMBRUST, E.J., DEWITT, J.R., ROBERTS, S.J. 1969. Evidence of a second generation of the alfalfa weevil in southern Illinois. In: *Journal of Economic Entomology*, vol. 62, pp. 509-510. e-ISSN 1938-291X, ISSN 0022-0493.
503. WHITE, T.J., BRUNS, T., LEE, S., TAYLOR, J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A., GELGARD, D.H., SNINSKY, J.J., WHITE, T.J., eds.. *PCR Protocols: A guide to methods and applications.* California, USA: Academic Press Inc., 482 p. ISBN 0-12-372181-4.
504. WHITFORD, F., QUISENBERRY, S. S. 1990. Population dynamics and seasonal biology of the alfalfa weevil (Coleoptera: Curculionidae) on alfalfa in Louisiana. In: *Environmental Entomology*, vol. 19, pp. 1443-1451. e-ISSN 1938-2936, ISSN 0046-225X.
505. WICKLOW, D.T., POLING, S.M., SUMMERBELL, R.C. 2008. Occurrence of pyrrocidine and dihydroresorcylide production among *Acremonium zeae* populations from maize grown in different regions. In: *Canadian Journal of Plant Pathology*, vol. 30, pp. 425-433. e-ISSN 1715-2992, ISSN 0706-0661.
506. WIECH, K., JAWORKSA, M. 1990. Susceptibility of *Sitona* weevils (Col., Curculionidae) to entomogenous nematodes. In: *Journal of Applied Entomology* [online], vol. 110, pp. 214-216 [citat 25.11.2018]. e-ISSN 1439-0418.
Disponibil: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1439-0418.1990.tb00115.x
507. WIEST, P., WIESE, K.,. JACOBS, M.R., MORRISSEY, A.B., ABELSON, T.I., WITT, W., LEDERMAN, M.M. 1987. *Alternaria* infection in a patient with acquired immunodeficiency syndrome: case report and review of invasive *Alternaria* infections. In: *Reviews of Infectious Diseases*, vol. 9, nr. 4, pp. 799–803. ISSN 0162-0886.
508. WILLIAMS, L., SCHOTZKO, D.J., O'KEEFFE, L.E. 1995. Pea leaf weevil herbivory on pea seedlings: effects on growth response and yield. In: *Entomologia Experimentalis et Applicata*, vol. 76, pp. 255-269. e-ISSN 1570-7458.
509. WILLIAMS, L., SCHOTZKO, D.J., O'KEEFFE, L.E. 1998. Herbivory, seed priming, and tillage systems: impacts on the growth response of *Pisum sativum* L. In: *Journal of Entomological Science*, vol. 33, pp. 196-211. ISSN 0749-8004.
510. WILLIAMS, M.A.J., SPOONER, B.M. 1991. IMI descriptions of fungi and bacteria: Set 109, nos. 1081–1090. No, 1806, *Phyalophora cyclaminis*. In: *Mycopathologia*, vol. 116, pp. 125-148. e-ISSN 1573-0832, ISSN 0301-486X.
511. WILSON, C., TISDELL, C. 2001. Why farmers continue to use pesticides despite environmental, health and sustainability costs. In: *Ecological Economics*, vol. 39, pp. 449-462. ISSN 0921-8009.
512. WOESE, C.R., OLSEN, G.J. 1986. Arhaebacterial phylogeny: perspectives on urkingdoms. In: *Systematic and Applied Microbiology*, vol. **7**, pp. 161-167. ISSN 0723-2020.
513. WOJCIECHOWICZ-ZYTKO, E., MLYNARCZYK, M. 2002. The preference of different broad bean cultivars by *Sitona lineatus* L. (Coleoptera: Curculionidae). In: *Journal of Plant Protection Research*, vol. 42, pp. 81-89. eISSN 1899-007X, ISSN 1427-4345.
514. WOODSIDE, A. M., BISHOP, J. L., PIENKOWSKI, R. L. 1968. Winter oviposition by the alfalfa weevil in Virginia. In: *Journal of Economic Entomology*, vol. 61, pp. 1230-1232. e-ISSN 1938-291X, ISSN 0022-0493.

515. WU, Z., TSUMURA, Y., BLOMQUIST, G., WANG, X.R. 2003. rRNA gene variation among common airborne fungi, and development of specific oligonucleotide probes for the detection of fungal isolates. In: *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 69, nr. 9, pp. 5389-5397. e-ISSN 1098-5336, ISSN 0099-2240.
516. XAVIER, I.J, KHACHATOURIANS, G.G. 1996. Heat-shock response of the entomopathogenic fungus *Beauveria brongniartii*. In: *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 42, pp.577-585, e-ISSN 1480-3275, ISSN 0008-4166.
517. XIN, G., GLAWE, D., DOTY, S.L. 2009. Characterization of three endophytic, indole-3-acetic acid-producing yeasts occurring in *Populus* trees. In: *Mycological Research*, vol. 113, pp. 973-980. ISSN 0953-7562.
518. YALAZ, M., HILMIOGLU, S., METIN, D., AKISU, M., NART, D., CETIN, H., OZTURK, C., ISIK, E., KULTURSAY, N. 2003. Fatal disseminated *Acremonium* strictum infection in a preterm newborn: a very rare cause of neonatal septicaemia. In: *Journal of Medical Microbiology*, vol. 52, nr. 9, pp. 835-837. e-ISSN 1473-5644, ISSN 0022-2615.
519. YOKOYAMA, E., YAMAGISHI, K., HARA, A. 2002. Group-I intron containing a putative homing endonuclease gene in the small subunit ribosomal DNA of *Beauveria bassiana* IFO 31676. In: *Molecular Biology and Evolution*, vol. 19, nr. 11, pp. 2022-2025. e-ISSN 1537-1719, ISSN 0737-4038.
520. YUAN, Z.L., RAO, L.B., CHEN, Y.C., ZHANG, C.L., WU, Y.G. 2011. From pattern to process: species and functional diversity in fungal endophytes of *Abies beshanzuensis*. In: *Fungal Biology*, vol. 115, nr. 3, pp. 197-213. ISSN 1878-6146.
521. YUCEL, B., GOZUACIK, C., GENCER, D., DEMIR, I., DEMIRBAG, Z. 2018. Determination of fungal pathogens of *Hypera postica* (Gyllenhall) (Coleoptera: Curculionidae): isolation, characterization, and susceptibility. In: *Egyptian Journal of Biological Pest Control* [online], vol. 28, article nr. 39, 8p. [citat 19.03.2020]. Disponibil: https://link.springer.com/content/pdf/10.1186/s41938-018-0043-2.pdf
522. YUN, H.G., KIM, D.J., GWAK, W.S., SHIN, T.Y., WOO, S.D. 2017. Entomopathogenic fungi as dual control agents against both the pest *Myzus persicae* and phytopathogen *Botrytis cinerea*. In: *Mycobiology*, vol. 45, nr. 3, pp. 192-198. e-ISSN 2092-9323, ISSN 1229-8093.
523. YURKOV, A., KRUGER, D., BEGEROW, D., ARNOLD, N., TARKKA, M.T. 2012. Basidiomycetous yeasts from boletales fruiting bodies and their interactions with the mycoparasite *Sepedonium chrysospermum* and the host fungus *Paxillus*. In: *Microbial Ecology*, vol. 63, nr. 2, pp. 295-303. e-ISSN 1432-184X, ISSN 0095-3628.
524. ZABRINSKIY, P.A. 1890. Ob ambarnom dolgonosike (*Sitohilus granarius* L.) i sposobakh bor'by s nim (v Bessarab. i dr. guberniy yuga Rossii). In; *Tr. 9-go obl. entomologicheskogo s"ezda, sozyvavshegosya v aprele 1888 g. v Odesse*, s. 117-127. [in Russian].
525. ZAHIRI, B., FATHIPOUR, Y., KHANJANI, M., ZALUCKI, M.P. 2014. Alternatives to key factor analyses for assessing the population dynamics of *Hypera postica* (Coleoptera: Curculionidae). In: *Population Ecology*, vol. 56, pp. 185-194. e-ISSN 1438-390X, ISSN 1438-3896.
526. ZALESSKY, K.M. 1927. Über die in Polen gefundenen Arten der Gruppe *Penicillium* Link. I, II, III. In: *Bulletin International de l'Academie Polonaise des Sciences et des Lettres Série B*, pp. 417-563.
527. ZHANG, H., ZHENG, X., YU, T. 2007. Biological control of postharvest diseases of peach with *Cryptococcus laurentii*. In: *Food Control*, vol. 18, nr. 4, pp. 287-291. ISSN: 0956-7135.
528. ZHANG, X., LI, G., MA, J., ZENG, Y., MA, W., ZHAO, P. 2010. Endophytic fungus *Trichothecium roseum* LZ93 antagonizing pathogenic fungi in vitro and its secondary metabolites. In: *Journal of microbiology* (Seoul, Korea) [online], vol. 48, nr.6, pp. 784–790 [citat 27.09.2019]. https://doi.org/10.1007/s12275-010-0173-z
529. ZHANG, Y., SCHOCH, C.L., FOURNIER, J., CROUS, P.W., de GRUYTER, J., WOUDENBERG, J.H.C., HIRAYAMA, K., TANAKA, K., POINTING, S.B., SPATAFORA, J.W., HYDE, K.D. 2009. Multi-locus phylogeny of Pleosporales: a taxonomic, ecological and evolutionary re-evaluation. In: *Studies in Mycology*, vol. 64, pp. 85-102. ISSN 0166-0616.
530. ZHENG, R.Y., CHEN, G.Q., HUANG, H., LIU, X.Y. 2007. A monograph of *Rhizopus*. In: *Sydowia* [online], vol. 59, nr. 2, pp. 273-372 [citat 27.09.2019]. Disponibil: http://www.sydowia.at/syd59-2/T7-Zheng.htm

531. ZHOU, Z.X., JIANG, H., YANG, C., YANG, M.-Z., ZHANG, H.B. 2010. Microbial community on healthy and diseased leaves of an invasive plant *Eupatorium adenophorum* in Southwest China. In*: Journal of Microbiology*, vol. 48, nr. 2, pp. 139-145. e-ISSN 1976-3794, ISSN 1225-8873.
532. ZIMMERMANN, G. 2008. The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): biology, ecology and use in biological control. In: *Biocontrol Science and Technology* [online], vol. 18, nr. 9, pp. 865-901 [citat 26.11.2018]. Disponibil: https://doi.org/10.1080/09583150802471812
533. ZLATANOV, S. 1968. The bioecological factors governing the numerical distribution of some insect pests under the influence of shelter belts (abstract). In: *The Review of Applied Entomology Series A*, vol. 56, p. 911. ISSN 0305-0076.

Anexa 1

Brevet de invenție MD 4560

MD 4560 B1 2018.04.30

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenţia de Stat pentru Proprietatea Intelectuală

(11) 4560 (13) B1

(51) Int.Cl: ***A01N 63/00*** (2006.01)
A01N 63/04 (2006.01)
C12N 1/14 (2006.01)
C12R 1/645 (2006.01)
A01P 7/04 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENŢIE

In termen de 6 luni de la data publicării menţiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenţie, orice persoană poate face opoziţie la acordarea brevetului

(21) Nr. depozit: a 2017 0057
(22) Data depozit: 2017.05.23

(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului:
2018.04.30, BOPI nr. 4/2018

(71) Solicitant: INSTITUTUL DE ZOOLOGIE AL ACADEMIEI DE ŞTIINŢE A MOLDOVEI, MD

(72) Inventatori: MOLDOVAN Anna, MD; MUNTEANU-MOLOTIEVSKIY Natalia, MD; TODERAŞ Ion, MD

(73) Titular: INSTITUTUL DE ZOOLOGIE AL ACADEMIEI DE ŞTIINŢE A MOLDOVEI, MD

MD 4560 B1 2018.04.30

(54) Tulpină de fungi *Beauveria bassiana* în calitate de bioinsecticid pentru combaterea coleopterelor curculionide

(57) Rezumat:

Invenţia se referă la biotehnologie şi poate fi utilizată în agricultură pentru combaterea coleopterelor curculionide.

Tulpina de fungi *Beauveria bassiana* este depozitată în Colecţia Naţională de Microorganisme Nepatogene cu numărul CNMN-FE-01 şi poate fi utilizată în calitate de bioinsecticid pentru combaterea coleopterelor curculionide.

Revendicări: 1

Anexa 1

Brevet de invenție MD 4560

(54) Strain of *Beauveria bassiana* fungi as a bioinsecticide against weevils

(57) Abstract:

1

The invention relates to biotechnology and can be used in agriculture for controlling weevils.

The *Beauveria bassiana* fungi strain is deposited in the National Collection of

2

Nonpathogenic Microorganisms under the number CNMN-FE-01 and can be used as a bioinsecticide against weevils.

Claims: 1

(54) Штамм грибов *Beauveria bassiana* в качестве биоинсектицида против жуков-долгоносиков

(57) Реферат:

1

Изобретение относится к биотехнологии и может быть использовано в сельском хозяйстве для борьбы с жуками-долгоносиками.

Штамм грибов *Beauveria bassiana* депонирован в Национальной Коллекции

2

Непатогенных Микроорганизмов под номером CNMN-FE-01 и может быть использован в качестве биоинсектицида против жуков-долгоносиков.

П. формулы: 1

Brevet de invenție MD 4560

MD 4560 B1 2018.04.30

Descriere:
(Descrierea se publică în redacția solicitantului)

Invenţia se referă la biotehnologie, în special la o tulpină de fungi şi poate fi utilizată în agricultură pentru combaterea coleopterelor curculionide.

Speciile din familia *Fabaceae* reprezintă culturi agricole importante fiind cultivate pe suprafeţe extinse. Datorită calităţilor nutritive sporite (conţinut înalt de proteine şi grăsimi) seminţele acestora sunt utilizate în alimentaţia umană. Biomasa fabaceelor, precum şi seminţele unor specii sunt utilizate în calitate de furaj. De asemenea unele specii sunt utilizate în calitate de plante decorative. O bogată diversitate de insecte sunt ataşate trofic de aceste culturi în toată lumea. Coleopterele curculionide (*Coleoptera, Curculionidea*) sunt considerate dăunători abundenţi în multe state din Europa, inclusiv Republica Moldova. Impotriva curculionidelor se utilizează un spectru larg de insecticide chimice, însă aplicarea acestor preparate manifestă acţiuni negative asupra mediului (Registrul Î.S. "Centrul de Stat pentru Atestarea şi Omologarea Produselor de Uz Fitosanitar şi a Fertilizanţilor. Găsit Internet: http://www.pesticide.md/registru-cautare/?ame_registr=0&name_reg=0&t=0&c=0&comp=0&par=18497&search=Cautare).

Elaborarea metodelor inofensive şi totodată efective de combatere a coleopterelor curculionide este una dintre problemele stringente şi actuale.

Controlul microbiologic al insectelor dăunătoare a fost adesea considerat o alternativă favorabilă folosirii insecticidelor chimice, care posedă acţiune nespecifică, poluează mediul ambiant şi se acumulează în aer, apă şi sol. Utilizarea agenţilor microbiologici pentru controlul insectelor contribuie la reducerea dependenţei de insecticidele chimice asigurând sustenabilitatea agriculturii (Singh H.B., Keswani C., Ray S., Yadav S.K, Singh S.P., Singh S., Sarma B.K. Chapter 10 *Beauveria bassiana*: Biocontrol Beyond Lepidopteran Pests. Ed. Sree K.S., Varma A. Biocontrol of Lepidopteran Pests, Soil Biology, 2015, vol. 43, p. 219-235).

Beauveria bassiana este un agent patogen fungic caracteristic multor grupe de insecte fiind cunoscute cazuri de infestare a mai bine de 100 specii (McCoy C.W., Samson R.A., Boucias D.G. Entomogenous fungi. Ed. Ignoffo C.M., Mandava N.B., Handbook of natural pesticides. Vol. Microbial pesticides. Part A: Entomogenous protozoa and fungi. Boca Raton (FL): CRC Press., 1988, p. 151-236).

Cu toate acestea, tulpinile de *Beauveria bassiana*, izolate de pe anumite specii de insecte, fiind testate in laborator impotriva unei game largi de specii de insecte, au prezentat un spectru îngust de acţiune. Astfel, fiecare tulpină poate avea o acţiune relativ specifică faţă de o gazdă anumită (Fargues J. Specificite des champignons pathognes imparfaits (Hyphomycetes) pour les larves de Coleopteres (Scarabaeidae et Chrysomelidae). Entomophaga, 1976, vol. 21, p. 313-323). *Beauveria bassiana* este utilizată pe scară largă ca bioinsecticid pentru controlul multor insecte dăunătoare, datorită absenţei efectelor toxice asupra omului şi altor organisme homeoterme şi lipsei poluării mediului ambiant.

Este cunoscută tulpina *Beauveria bassiana* F419, utilizată pentru combaterea speciei *Sitona obsoletus* [1].

Neajunsul acestei tulpini constă în activitatea insecticidă redusă şi timpul de acţiune lent de la aplicare.

Cea mai apropiată după esenţă şi rezultatul tehnic este tulpina de fungi *Beauveria bassiana* 238, activă împotriva speciei *Sitona lineatus* L. [2].

Dezavantajul acestei tulpini constă în activitatea insecticidă redusă, timpul de acţiune lent şi cantitatea sporită de spori aplicată pentru asigurarea efectului insecticid.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenţie constă în izolarea unei tulpini noi autohtone de *Beauveria bassiana*, care ar asigura producerea de metaboliţi cu efecte insecticide, cu o activitate insecticidă sporită contra coleopterelor curculionide intr-un timp mai scurt.

Invenţia soluţionează problema prin aceea că se propune o tulpină de fungi *Beauveria bassiana*, depozitată în Colecţia Naţională de Microorganisme Nepatogene cu numărul CNMN-FE-01, care poate fi utilizată în calitate de bioinsecticid pentru combaterea coleopterelor curculionide.

Rezultatul tehnic al invenţiei constă în faptul că tulpina propusă:

- posedă o activitate insecticidă sporită asupra speciei *Sitona lineatus* faţă de cea mai

apropiată soluţie;

- este o tulpină autohtonă, ceea ce reduce semnificativ cheltuielile pentru obţinerea bioinsecticidelor şi asigură micşorarea gradului de poluare a mediului ambiant.

Rezultatul tehnic (efectul insecticid) obţinut este determinat de particularităţile biochimice ale tulpinii, şi anume capacitatea de a penetra cuticula insectei şi de a produce metaboliţi cu efect insecticid.

Tulpina propusă nu este patogenă pentru organismele homeoterme şi se păstrează în tuburi pe medii agarizate cartof-glucoză-agar, la temperatura de 4°C în Colecţia Institutului de Microbiologie şi Biotehnologie al AŞM.

Tulpina a fost izolată în cultură pură din corpul insectei *Sitona lineatus* L. colectate pe teritoriul Republicii Moldova (Manual of Techniques in Invertebrate Pathology, 2nd Edition, Ed. L. Lacey, Academic Press, eBook ISBN :9780123869005, 2012, 504 p).

Pentru cultivarea tulpinii poate fi utilizat mediul nutritiv cu următoarea componenţă (g/L): infuzie din cartofi 4, D-glucoză 20, agar microbiologic 15.

Caracterele morfo-culturale ale tulpinii. Cercetarea macroscopică a tulpinii a evidenţiat prezenţa coloniilor cu aspectul exterior lânos-flocos sau catifelat spre pulverulent, uneori filamentoase. Coloniile cresc iniţial de culoare albă, mai târziu devenind de culoare gălbuie, uneori roşcate. Uneori produce exsudat fără miros. Hifele submerse sunt hialine cu pereţii netezi de aproximativ 1,5…3 μ lăţime. Hifele miceliului aerian sunt, de asemenea, hialine cu pereţii netezi de aproximativ 1…2 μ lăţime, târâtoare sau ascendente. Hifele poartă grupuri laterale de celule umflate cel mai des de 3…6 x 3…5 μ, care ulterior formează ramificaţii şi dau naştere altor celule umflate mai mici sau 1-5 celule conidiogene. In cazul culturilor tinere conidiile sunt strans grupate, la culturile mai bătrâne ramurile devin mai răzleţe, celulele conidiogene apar in grupuri mici sau solitar pe celulele laterale elipsoidale sau cilindrice (de aproximativ 15 x 6 μ) sau direct din hife. Celulele conidiogene sunt globulare uneori alungite bazal (3…6 x 2,5…3,5 μ), celulele terminale cel mai des sunt subţiri cu axul central bine dezvoltat, de până la 20 μ lungime, geniculat sau neregulat îndoit, zimţat. Conidiile hialine sunt uneori de culoare gălbuie, netede, globulare spre elipsoide cu o bază apicală (1,5 -) 2 - 3 (- 4) x (1,5 -) 2 - 2,5 (- 3) μ. Clamidospori nu au fost observaţi.

Caracteristica fiziologo-biochimică a tulpinii. Coloniile ciupercii timp de 8 zile ating diametrul de 6 … 23 mm, temperatura optimă de dezvoltare a tulpinii fiind de 20 ... 25°C. Tulpina creşte bine pe mediul cartof-glucoză-agar. *Beauveria bassiana* produce un şir de enzime proteolitice, lipolitice, amilaza, chitinaza cu ajutorul cărora penetrează integumentele. De asemenea produce toxina beauvericina, un ciclodepsipeptid (Hamill R.L., Higgens C.E., Boaz H.E., Gorman M. The structure of beauvericin, a new depsipeptide antibiotic toxic to *Artemia salina*. Tetrahedron Letters, 1969, Nr. 49, p. 4255-4258), care împreună cu alte toxine are efect antibacterian (Ferron P. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. Annual Review of Entomology, 1978, vol. 23, p. 409-442).

Gradul de puritate al tulpinii. Tulpina a fost izolată în cultură pură din corpul insectei *Sitona lineatus* L. colectate pe teritoriul Republicii Moldova. Pentru cultivare se utilizează mediul agarizat cartof-glucoză-agar. Gradul de puritate al tulpinii a fost verificat prin reacţia de polimerizare în lanţ cu utilizarea primerilor specifici ITS (Internal Transcribed Spacer) şi 18S.

Exemplu de utilizare a invenţiei

Tulpina *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01 este cultivată timp de 7…14 zile pe mediu agarizat cartof-glucoză-agar la temperatura de 25 °C pentru a asigura sporularea culturii. Pentru a pregăti inoculul, sporii sunt recoltaţi de pe suprafaţa mediului şi transferaţi cu ajutorul unui micropistil steril intr-un tub de 2 ml ce conţine 1,5 ml de apă distilată sterilă. Masa de conidii este agitată uşor. Pentru a suspenda uniform propagulele hidrofobe în apă, sunt folosite metode de suspensie mecanică fără a provoca deteriorarea celulelor. Cuantificarea numărului de propagule per unitate de volum este realizată cu utilizarea hemocitometrului (camera Goreaev). Ulterior, se determină rata de germinare a sporilor. Pentru a calcula numărul de spori viabili per unitate de volum, cantitatea de spori/ml determinată cu ajutorul hemocitometrului este multiplicată cu valoarea ratei de germinare.

Se pregăteşte suspensia de contaminare în apă distilată sterilă cu diferită concentraţie: $0{,}969 \cdot 10^7$ spori/ml, $0{,}969 \cdot 10^6$ spori/ml, $0{,}969 \cdot 10^5$ spori/ml, $0{,}969 \cdot 10^4$ spori/ml, $0{,}969 \cdot 10^3$ spori/ml.

MD 4560 B1 2018.04.30

5

În experienţă a fost utilizat dăunătorul culturilor agricole *Sitona lineatus* Linnaeus 1758, (*Coleoptera, Curculionidae*).

Eficienţa a fost evaluată prin monitorizarea efectivului numeric al dăunătorilor colectaţi după prelucrare şi cantitatea exemplarelor de insecte pierite după infestare.

Exemplul 1. Estimarea eficacităţii metodei de combatere a dăunătorului culturilor agricole *Sitona lineatus* Linnaeus 1758, (*Coleoptera, Curculionidae*).

Activitatea insecticidă a tulpinii propuse a fost testată pe insectele adulte sănătoase, provenite din populaţia naturală a speciei *Sitona lineatus* L. Se prepară o serie din cinci diluţii ale culturii tulpinii în apă distilată sterilă cu pasul 10 (concentraţiile indicate mai sus). In calitate de martor a fost utilizată apa distilată sterilă. Inoculul cu volumul de 1 ml a fost aplicat pe hârtie de filtru sterilă plasată în cutii Petri. Ulterior, în fiecare cutie Petri au fost plasate cate 10 exemplare ale speciei *Sitona lineatus*. Insectele au fost lăsate să se deplaseze pe suprafaţa hârtiei de filtru timp de 3 h pentru a intra în contact cu sporii fungici (Watson D.W., Geden C.J., Long S.J., Rutz D.A. Ef cacy of *Beauveria bassiana* for controlling the house ?y and stable y (Diptera: Muscidae). Biol. Control, 1995, vol. 5, p. 405-411).

După inoculare, insectele au fost incubate câte 10 în cuşti cu lucernă proaspătă în condiţii controlate, la temperatura camerei de 25±1°C şi durata zilei de 14 h. Verificarea mortalităţii a fost efectuată la fiecare 24 de ore. Cadavrele insectelor au fost îndepărtate înainte ca ciuperca să sporuleze pentru a preveni transmiterea orizontală. Ulterior cuştile au fost spălate, sterilizate, iar lucerna a fost schimbată. Pentru a confirma că moartea insectelor a fost cauzată de infecţia fungică cadavrele au fost plasate în eprubete sterile cu dop de bumbac în condiţii de umiditate sporită urmărind dezvoltarea miceliului. Activitatea biologică a tulpinii, exprimată în LC_{50}, a fost calculată după formula lui Kerber în valorile concentraţiei de spori în diluţii ale culturii fungice: $\lg LC_{50} = \lg C_M - \Sigma (\Sigma L - 0,5)$, unde C_M - concentraţia maximă testată, Σ - logaritmul multiplicării diluţiei, ΣL - suma valorilor L pentru toate concentraţiile.

Cea mai efectivă dintre concentraţiile testate, pentru *Sitona lineatus* L., s-a dovedit a fi $0,969 \cdot 10^6$ spori/ml cauzand o mortalitate de 100% la a 5-a zi de la tratament. Totodată, o reducere cu 50% a efectivului dăunătorului *Sitona lineatus* L. poate fi obţinută la aplicarea culturii fungice *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01 în concentraţie de $1,127 \cdot 10^4$ spori/ml, in apă distilată. Rezultatele sunt prezentate in tabel.

Tabel

Rata mortalităţii dăunătorului *Sitona lineatus* L. după aplicarea suspensiei de spori din cultura fungică a tulpinilor de *Beauveria bassiana*

Nr.	Tulpina	Cantitatea de spori per individ	Mortalitatea, nr. exemplare moarte/nr. total	Mortalitatea, %
1.	*Beauveria bassiana* CNMN-FE-01	$0,969 \cdot 10^5$	10/10	100
2.	*Beauveria bassiana* 238	$1 \cdot 10^7$	17/20	85

Datele din tabel denotă că tulpina de fungi propusă posedă o activitate insecticidă pronunţată asupra coleopterelor curculionide şi poate fi utilizată în calitate de agent biologic in controlul efectivului lor numeric. Tulpina este ecologic inofensivă, deoarece a fost extrasă din mediu natural, nu este patogenă pentru plante şi organismele homeoterme. În natură nu sunt introduse organisme noi, ceea ce exclude deteriorarea ecosistemelor, cum se observă în cazul utilizării altor patogeni şi preparate.

Anexa 1

Brevet de invenție MD 4560

MD 4560 B1 2018.04.30

(56) Referințe bibliografice citate in descriere:

1. Nelson T.L., McNeill M.R., van Koten C., Goldson S.L. Comparative virulence of Beauveria bassiana isolates against clover root weevil (*Sitona obsoletus*). New Zealand Plant Protection. 2015, vol. 68, p. 139-145
2. Riedel W., Steenberg T. Adult polyphagous coleopterans overwintering in cereal boundaries: winter mortality and susceptibility to the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Biocontrol. 1998, vol. 43, p.175...188

(57) Revendicări:

Tulpină de fungi *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01 in calitate de bioinsecticid pentru combaterea coleopterelor curculionide.

Agenția de Stat pentru Proprietatea Intelectuală
str. Andrei Doga, nr. 24, bloc 1, MD-2024, Chișinău, Republica Moldova

Anexa 2

Adeverința de depozitare a tulpinii *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01

CNMN

INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE
ŞI BIOTEHNOLOGIE AL A.Ş.M.
COLECŢIA NAŢIONALĂ DE MICROORGANISME NEPATOGENE

str. Academiei, 1, MD-2028, Chişinău, Republica Moldova, Tel. (373 22) 73 96 09, e-mail: imbcnmn@yahoo.com

ADEVERINŢĂ DE DEPOZITARE

Munteanu-Molotievskiy Natalia, Moldovan Anna, Toderaş Ion

(*numele, prenumele deponentului*)

Institutul de Zoologie al AŞM

(*denumirea organizaţiei*)

str. Academiei, 1, MD-2028, Chişinău, Republica Moldova

(*adresa deponentului*)

***Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin-**

controlul biologic al insectelor dăunătoare

(Genul, specia şi destinaţia tulpinii)

Numărul de înregistrare, invocat tulpinii depozitate de către Colecţie:

Beauveria bassiana CNMN-FE-01

Data depozitării: 08. 07. 2016

Adresa şi denumirea colecţiei:

str. Academiei 1, MD-2028, Institutul de Microbiologie şi Biotehnologie,
Colecţia Naţională de Microorganisme Nepatogene (CNMN),
Chişinău, Republica Moldova
Tel.: (+373 22) 73 96 09
E-mail: imbcnmn@yahoo.com
Web: www.imb.asm.md

Directorul Institutului de Microbiologie şi Biotehnologie,
academician, profesor universitar _____ V. Rudic

Şef al CNMN, doctor în biologie _____ O. Chiseliţa

L.Ş.

Anexa 3

Pașaportul tulpinii *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01

CNMN
INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE
ŞI BIOTEHNOLOGIE AL AŞM
COLECŢIA NAŢIONALĂ DE MICROORGANISME NEPATOGENE
MD-2028, Republica Moldova, Chişinău, str. Academiei 1. Tel. (373 22) 73 96 09, e-mail: imbcnmn@yahoo.com

PAŞAPORTUL TULPINII DE MICROORGANISME

Cifrul atribuit de către
COLECŢIA NAŢIONALĂ DE
MICROORGANISME NEPATOGENE:
CNMN-FE-01

Data depunerii în CNMN
„08" iulie 2016

1. **Denumirea de specie a tulpinii:** *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin
2. **Denumirea atribuită tulpinii de către deponent:** *Beauveria bassiana* L1/6
3. **Proveniența tulpinii (*cine, când, unde și prin ce metodă a obținut tulpina dată*):** Munteanu-Molotievskiy Natalia, Moldovan Anna, Toderaş Ion, 02.12.2010, Institutul pentru Control Biologic, Centrul Federal de Cercetare pentru Plantele Cultivate, Julius Kühn Institute (JKI), tulpina a fost izolată din corpul insectei *Sitona lineatus* L., colectată pe teritoriul Republicii Moldova.
4. **Cine și unde a identificat tulpina:** Specia a fost identificată de dr. Natalia Munteanu-Molotievskiy și dr. Andreas Leclerque, în Institutul pentru Control Biologic, Centrul Federal de Cercetare pentru Plantele Cultivate, Julius Kühn Institute (JKI).
5. **Referința bibliografică din clasificator:**

Fernandes E.K., Moraes A.M., Pacheco R.S., Rangel D.E., Miller M.P., Bittencourt V.R., Roberts D.W. Genetic diversity among Brazilian isolates of *Beauveria bassiana*: comparisons with non-Brazilian isolates and other *Beauveria* species. Journal of Applied Microbiology 107(3), 2009. p. 760-774.

Ferron P. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. Annual Review of Entomology 23, 1978. p. 409-442.

Hamill R.L., Higgens C.E., Boaz H.E., Gorman M. The structure of beauvericin, a new depsipeptide antibiotic toxic to Artemia salina. Tetrahedron Letters No. 49, 1969. p. 4255-4258.

Hoog De G.S. The genera Beauveria, Isaria, Tritirachium, and Acrodontium gen. nov. Studies in Mycology 1, 1972, p. 1 - 41.

Humber R.A. Fungi: identification. L.A. Lacey (Ed.), Manual of techniques in insect pathology, Academic Press, San Diego, 1997, p. 153.

Rehner S.A., Buckley E.A. *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-alpha sequences: evidence for cryptic diversification and links to Cordyceps teleomorphs. Mycologia 97(1), 2005. p. 84-98.

Renker C. et al. Oribatid mites as potential vectors for soil microfungi: study of mite-associated fungal species. Microb. Ecol. 50 (4), 2005. p. 518-528.

Vuillemin P. Beauveria, nouveau genre de Verticilliacées. Bulletin de la Société botanique de France 29, 1912, p. 34 - 40.

Anexa 3

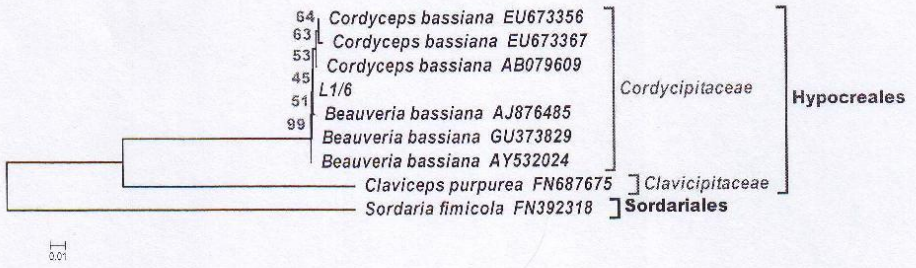
Pașaportul tulpinii *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01

Yokoyama E., Yamagishi K., Hara A. Group-I intron containing a putative homing endonuclease gene in the small subunit ribosomal DNA of *Beauveria bassiana* IFO 31676. Mol. Biol. Evol. 19 (11), 2002. p. 2022-2025.

Rezultatele analizei BLAST a succesiunilor nucleotidice pentru porțiunea de genă ITS (Internal Transcribed Spacer):

Tulpina fungică izolată	Specia fungică asociată	Numărul de acces	Similaritatea (%)	Referință bibliografică
L1/6	*Beauveria bassiana* MT14	AJ876485	99	Renker ș.a. 2005
	Beauveria bassiana 4021	AY532024	99	Rehner, Buckley 2005
	Beauveria bassiana 2594	U373829	99	Nepublicată
	Cordyceps bassiana BCMU BB01	AB079609	99	Yokoyama ș.a. 2002
	Cordyceps bassiana CG227	EU673356	99	Fernandes ș.a 2009
	Cordyceps bassiana CG309	EU673367	99	Fernandes ș.a 2009

Tulpina L1/6 a fost identificată ca *Beauveria bassiana* prezentă 99% omologie în secvența nucleotidică a regiunii ITS.



Relațiile filogenetice ale tulpinii L1/6 (*Beauveria bassiana*).

6. Caracterele morfo-culturale ale tulpinii: Caracterizarea macroscopică a tulpinii a evidențiat prezența coloniilor cu aspectul exterior lânos-flocos sau catifelate spre pulverulente, uneori filamentoase (Blunck, 1939). Coloniile cresc înalte de culoare albă, mai târziu devenind de culoare gălbuie, uneori roșcate. Uneori produce exudat fără miros. Hifele submerse sunt hialine cu pereții netezi de aproximativ 1,5 - 3 microni lățime. Hifele miceliului aerian sunt, de asemenea, hialine cu pereții netezi de aproximativ 1 - 2 microni lățime, târâtoare sau ascendente. Hifele poartă grupuri laterale de celule umflate cel mai des de 3 - 6 x 3 - 5 microni, care ulterior formează ramificații și dau naștere altor celule umflate mai mici sau 1 - 5 celule conidiogene. În cazul culturilor tinere conidiile sunt strâns grupate, la culturile mai bătrâne ramurile devin mai răzlețe, celulele conidiogene apar în grupuri mici sau solitar pe celulele laterale elipsoidale sau cilindrice (de aproximativ 15 x 6 microni) sau direct din hife. Celulele conidiogene sunt globulare uneori alungite bazal (3 - 6 x 2,5 - 3,5 microni), celulele terminale cel mai des sunt subțiri cu axul central bine dezvoltat, de până la 20 microni lungime, geniculat sau neregulat îndoit, zimțat. Conidiile hialine uneori de culoare gălbuie, netede, globulare spre elipsoide uneori cu o bază apicală (1,5 -) 2 - 3 (- 4) x (1,5 -) 2 - 2,5 (- 3) microni. Clamidospori nu au fost observați.

2

Anexa 3

Pașaportul tulpinii *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01

7. **Particularitățile fiziologice și biochimice ale tulpinii.** Coloniile ciupercii timp de 8 zile ating diametrul de 6 - 23 mm, temperatura optimă de dezvoltare a tulpinii este de 20 - 25°C. Tulpina crește bine pe mediul cartof-glucoză-agar.

8. **Importanța practică a tulpinii (domeniul de utilizare):** Tulpina *Beauveria bassiana* L1/6 are importanță biotehnologică și poate fi utilizată în controlul biologic al insectelor dăunătoare.

9. **Produsul sintetizat de tulpină:** *Beauveria bassiana* produce un șir de enzime proteolitice, lipolitice, amilaza, chitinaza cu ajutorul cărora penetrează integumentele. De asemenea produce toxina beauvericina, un ciclodepsipeptid (Hamill 1969) care, alături de alte toxine are efect antibacterian (Ferron 1978).

10. **Parametrii productivi ai tulpinii:** Valoarea acumulării biomasei absolute uscate (BAU) nu a fost determinată.

11. **Metoda de determinare a activității tulpinii**: Activitatea insecticidă a tulpinii a fost determinată pe insectele adulte *Sitona* spp. În calitate de control negativ a fost utilizată soluție de 0,9 % NaCl. Pentru testarea fiecărei diluții sunt utilizate câte 10 insecte. Activitatea biologică a tulpinii a fost determinată după formula lui Kerber lg Lc50=lgCM-σ(ΣL-0,5), unde CM-concentrația maximă testată; σ-logaritmul concentrației; ΣL-suma valorii L pentru fiecare concentrație.

12. **Condițiile și componența mediului pentru cultivare:** Mediul PDA (Potato Dextrose Agar, Merck) (1L H_2O dublu-distilată; 4g infuzie din cartofi; 20g D-glucoză; 15g Agar microbiologic.

13. **Condițiile și componența mediilor pentru păstrarea îndelungată a tulpinii:** Tulpina se păstrează în eprubete pe mediu agarizat. Termenul de reinoculare 2-3 luni. Păstrarea în frigider la temperatura de + 4±1°C. De asemenea poate fi păstrată îndelungat la temperaturi de - 20 -80°C care se efectuează în soluții de glicerol 100%.

14. **Metoda, condițiile și componența mediilor pentru multiplicarea tulpinii:** multiplicarea tulpinii se efectuează pe mediu agarizat. Cultivarea se efectuează timp de 5-7 zile, la temperatură de 20-25°C.

15. **Particularitățile genetice ale tulpinii (auxotrofie, rezistență la antibiotice, fagi etc.):** au fost amplificate și analizate secvențele parțiale a genei ARNr 18S și genei ITS (Internal transcribed Spacer).

16. **Este oare tulpina:** **zoopatogenă ?** **da -** patogenă pentru insecte
fitopatogenă? Nu.

17. **Informație complementară, comentarii:**

18. **Cauza depunerii:** Brevetarea tulpinii ca agent biologic în controlul efectivului numeric al insectelor dăunătoare.

19. **Autorul dorește să fie informat despre solicitarea tulpinii patentate?** Da.

20. **Informația despre tulpină poate fi publicată în catalogul CNMN pînă la obținerea patentului?** Nu.

21. **Autorul este informat despre includerea tulpinii date în fondul CNMN, exemplarele tulpinii pot fi repartizate conform regulilor naționale și internaționale.**

Autorul este obligat să restabilească tulpina în colecție în cazul pierderii viabilității sale în condițiile indicate de către autor.

Autorul va informa în scris CNMN despre obținerea patentului (cu indicarea numărului patentului) pînă la expirarea termenului de 3 ani.

22. **Adresa deponentului:** Laboratorul de Sistematică și Filogenie Moleculară, Institutul de Zoologie al AȘM, MD - 2028, str. Academiei 1, Chișinău, Republica Moldova.

23. **Autorul sau colectivul de autori:** Munteanu-Molotievskiy Natalia, Moldovan Anna, Toderaș Ion.

24. **Informație despre deținătorul brevetului de invenție:** _____

- Cererea de brevet Nr. _____ **din** _____

- Brevetul Nr. _____ **din** _____

3

Anexa 3

Paşaportul tulpinii *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01

25. Coordonatele deţinătorului (adresa, tel/fax, e-mail): str. Academiei 1, Chişinău, 2028, Republica Moldova; tel/fax: (37322) 73-98-09; e-mail: munteanu_natalia_v@yahoo.com, anna.moldovan@yahoo.com

Data 08.07.2016

Deponenţi-autori: Moldovskiy

Colecţia confirmă faptul că paşaportul de faţă a fost depus la 08 iulie 2016

Şef al CNMN dr. în biol., O. CHISELIŢA

Semnătura Dlui O. Chiseliţa o confirm,
secr. şt. al I.M.B., dr. în biol. conf. cerc. V. MISCU

4

Anexa 4 a

Acte de implementare a rezultatelor tezei de doctorat

UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA

Facultatea de Biologie şi Pedologie

MD-2009, Chişinău
Str. M.Kogălniceanu, 65A
tel . 022-24-43-24

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ МОЛДОВЫ

Факультет Биологии и Почвоведения

МД-2009, Кишинэу
ул. М.Когэлничеану, 65A
тел. 022-24-43-24

Nr. 345 i din „ 27 ” noiembrie 2019

Act de implementare

a rezultatelor cercetărilor ştiinţifice realizate de Dna Moldovan Anna, pretendentă la gradul ştiinţific de doctor în ştiinţe biologice, expuse în teza de doctor întitulată „*Controlul biologic al coleopterelor curculionoide dăunători ai culturilor agricole*”

Prin prezentul act se confirmă că rezultatele ştiinţifice obţinute de Dna Moldovan Anna, lector univ., cercetător ştiinţific stagiar, Universitatea de Stat din Moldova, cercetător ştiinţific, Institutul de Zoologie, expuse în teza de doctor şi publicaţiile ştiinţifice la tema tezei, sunt aplicate în procesul didactic în cadrul orelor de curs şi laborator la disciplinele „Microbiologie”, pentru studenţii anului II, licenţă; „Biologie moleculară”, „Biotehnologie” pentru studenţii anului III, licenţă ai Facultăţii de Biologie şi Pedologie, Universitatea de Stat din Moldova.

Decanul Facultăţii de Biologie şi Pedologie,
doctor în ştiinţe biologice,
conferenţiar universitar LEŞANU Mihai

FACULTATEA DE BIOLOGIE ŞI PEDOLOGIE

Anexa 4 b

Acte de implementare a rezultatelor tezei de doctorat

ASOCIAŢIA OBŞTEASCĂ BIOS **NON GOVERNMENTAL ORGANIZATION**

Membru a Coaliției Internaționale a Pământului (ILC)
Membru al Uniunii Internaționale de Știință a Solului (IUSS)
Membru a Rețelei ONG-urilor a Facilității Globale de Mediu (GEF)
Membru al Asociației Mondiale de Conservare a Solului și Apei (WASWC)
Membru a Platformei Naționale a Parteneriatului Estic cu Uniunea Europeană
Membru a Comitetului Consultativ a Platformei Actorilor Locali Dunărene SUERD
Acreditat la Convenția Națiunilor Unite privind Combaterea Deșertificării (UNCCD)
Acreditat la Convenția Cadru a Națiunilor Unite privind Schimbările Climatice (UNFCCC)

Nr. 45 din 26 noiembrie 2019

Institutul de Zoologie
Universitatea de Stat din Moldova

Act de implementare

a rezultatelor cercetărilor ştiinţifice realizate de Dna Moldovan Anna, pretendentă la gradul ştiinţific de doctor în ştiinţe biologice, expuse în teza de doctor întitulată *"Controlul biologic al coleopterelor curculionoide dăunători ai culturilor agricole"*

Prin prezentul act se confirmă că rezultatele ştiinţifice obţinute de Dna Moldovan Anna, lector universitar, Universitatea de Stat din Moldova, cercetător ştiinţific, Institutul de Zoologie, sunt aplicate în cadrul şcolilor de instruire a formatorilor şi fermierilor în domeniul agriculturii ecologice şi anume în cadrul cursurilor privind protecţia plantelor realizate de Asociaţia Obştească BIOS în cadrul Programului rural de reziliență economică-climatică inclusivă – IFAD-VI.

Rezultatele privind controlul biologic al dăunătorilor culturilor agricole, incluse în manualul de instruire pentru formatori şi fermieri „Sistemul de Agricultură Ecologică" (2018) şi expuse în teza de doctor în ştiinţe biologice întitulată "Controlul biologic al coleopterelor curculionoide dăunători ai culturilor agricole", cât şi în alte lucrări, sunt utilizate în calitate de suport ştiinţific şi de instruire întru realizarea prevederilor Strategiei Naţionale de Implicare privind soluţionarea problemelor pământului pentru anii 2017-2021 şi a Planului de Acţiuni în domeniul respectiv.

Cu respect,

Ciubotaru Valentin
Doctor în ştiinţe agricole,
director executiv

REPUBLICA MOLDOVA, mun. CHIŞINĂU «BIOS» IDNO 1011620009271 ASOCIAŢIA OBŞTEASCĂ

AO BIOS
str. Columna 72/3, oficiul 3,
Chişinău, MD 2012, Republica Moldova.

Tel./Fax: (373-22) 54-57-33; 069134294
E-mail: ngobios@yahoo.com.
Site: www.bios.ong.md

Anexa 5 a

Diplome și distincții



Anexa 5 b

Diplome și distincții



FORUMUL INVENTATORILOR ROMANI
ROMANIAN INVENTORS FORUM

IAȘI - ROMÂNIA

DIPLOMA

MEDALIA EUROINVENT

MOLDOVAN ANNA[A,B], MUNTEANU-MOLOTIEVSKIY NATALIA[A], TODERAȘ ION[A]

TULPINĂ DE FUNGI *BEAUVERIA BASSIANA* – BIOINSECTICID PENTRU COMBATEREA COLEOPTERELOR CURCULIONIDE

[A]INSTITUTUL DE ZOOLOGIE,
[B]UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA

Presedinte,
Dr.Ing. Andrei Victor SANDU

EURO INVENT
www.euroinvent.org

Târgul Internaţional de Inventică şi Educaţie Creativă pentru Tineret,
ICE-USV
Universitatea „Ştefan cel Mare" din Suceava
07 – 09 iunie 2018

www.afir.org.ro

Anexa 5 c

Diplome și distincții

The International Student Innovation and Scientific Research Exhibition
- "Cadet INOVA'19" -
The "Nicolae Bălcescu" Land Forces Academy of Sibiu, Romania
11-13 April 2019

THE SILVER MEDAL
OF THE "Cadet INOVA'19" EXHIBITION

Is bestowed on the researchers

Anna MOLDOVAN, Natalia MUNTEANU-MOLOTIEVSKIY, Ion TODERAŞ

for the innovation:

STRAIN OF BEAUVERIA BASSIANA FUNGI AS A BIOINSECTICIDE AGAINST WEEVILS

President of the Jury,
Dipl. – Eng.
Andrei Victor SANDU PhD

President of the Exhibition,
Dipl. – Eng.
Silviu Mihai PETRIŞOR PhD

MAg-CI-2019

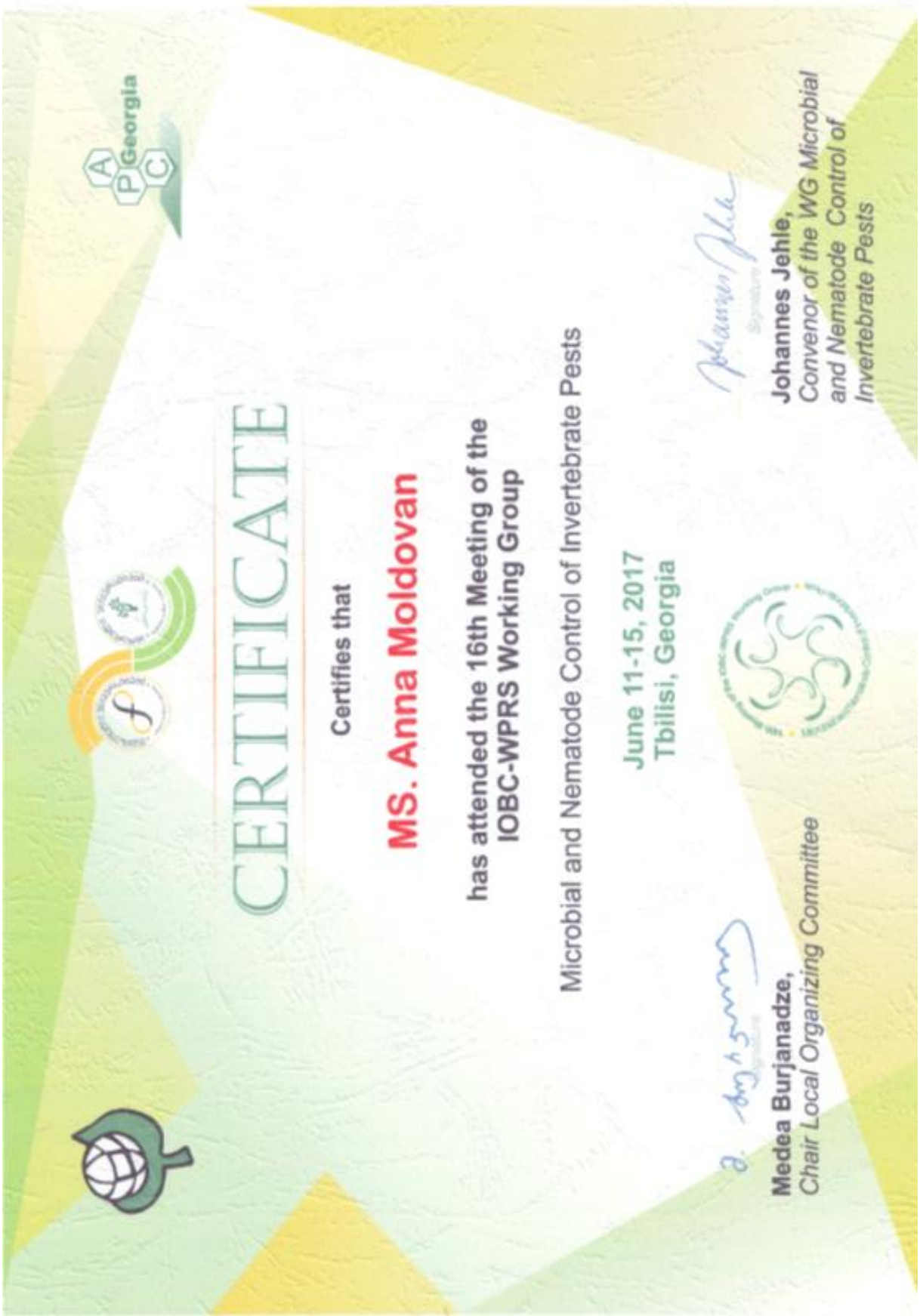
Anexa 5 d

Diplome și distincții



Anexa 5 e

Diplome și distincții



Anexa 5 f

Diplome și distincții



DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII

Subsemnata, declar pe răspundere personală că materialele prezentate în teza de doctorat sunt rezultatul propriilor cercetări şi realizări ştiinţifice. Conştientizez că, în caz contrar, urmează să suport consecinţele în conformitate cu legislaţia în vigoare.

Numele de familie, prenumele Moldovan Anna

Semnătura 

Data 05.01.2021

CURRICULUM VITAE

Moldovan Anna

DATE PERSONALE:



Data naşterii	27 ianuarie 1990
Cetăţenia	Republica Moldova
Adresa de serviciu	Laboratorul Sistematică şi Filogenie Moleculară, Centrul de Cercetare a Invaziilor Biologice, Institutul de Zoologie, str. Academiei 1, MD-2028, Chişinău, Republica Moldova
Telefon	+373 67 18 1990
E-mail	anna.moldovan@yahoo.com

STUDII:

2014-2017	Universitatea de Stat din Moldova, Facultatea „Biologie şi Pedologie”, doctorandă, specialitatea 167.01 „Biotehnologie, bio-nanotehnologie”.
2012-2014	Universitatea de Stat din Moldova, Facultatea „Biologie şi Pedologie”, specialitatea „Ştiinţe biologice aplicate”, Master în ştiinţe ale naturii.
2009-2012	Universitatea de Stat din Moldova, Facultatea „Biologie şi Pedologie”, specialitatea Biologie Moleculară, Licenţiat în ştiinţe ale naturii.

FORMARE PROFESIONALĂ

07.2018	Mobilitate academică, International Research Development Week, University of Granada, Granda, Spania.
09.2017	Cercetător invitat, curs intensiv de metode moleculare şi analiza datelor în cadrul proiectului „Training the new generation of entomologists in DNA-based molecular methods – international network (EntoMol)” (Proiect CPEA-LT-2016/10140).
04 - 06.2016	Curs teoretic şi practic Barcodarea ADN, Biodiversity Institute of Ontario, University of
07 - 08.2016	Guelph, Canada.
08.2015	Curs de formare continuă „Scrierea proiectelor internaţionale”, UnAŞM, Chişinău, Republica Moldova.
03.2015	Curs practic secvenţierea ADN şi Real Time PCR.
02.2014	Cursul de instruire cu privire la evaluarea impactului OMG vii în cadrul Protocolului de la Cartagena „Advancing LMO assessment: principles, practice and progress”.

ACTIVITATE PROFESIONALĂ:

2017 - 2018	Membru Consiliu Olimpic Republican la Biologie şi la Ştiinţe pentru Juniori.
2017 - prezent	Cercetător ştiinţific stagiar, Universitatea de Stat din Moldova, Facultatea de Biologie şi Pedologie, Departamentul Biologie şi Ecologie.
2014 - prezent	Cercetător ştiinţific, Institutul de Zoologie, Centrul de Cercetare a Invaziilor Biologice, Laboratorul Sistematică şi Filogenie Moleculară.
06 - 11.2014	Şef secţie aer atmosferic, Centrul de Investigaţii Ecologice, Agenţia Ecologică Chişinău.
2012 - 2014	Inspector superior, Direcţia Expertiză Ecologică şi Autorizaţii de Mediu, Inspectoratul Ecologic de Stat.
2012 - prezent	Asistent universitar, Universitatea de Stat din Moldova, Facultatea de Biologie şi Pedologie, Departamentul Biologie şi Ecologie.
2012 - 2014	Cercetător ştiinţific stagiar, Institutul de Zoologie, Academia de Ştiinţe a Modovei.
2010 - 2012	Operator la calculator, inginer, Institutul de Zoologie, Academia de Ştiinţe a Modovei.

APARTENENŢA LA SOCIETĂŢI ŞI ASOCIAŢII:

2015 - prezent	Membru al Societăţii de Biochimie şi Biologie Moleculară, Republica Moldova.
2015 - prezent	Membru al Society for Invertebrate Pathology.
2014 - prezent	Membru al Asociaţiei Obşteşti „BIOS”.

DOMENII DE INTERES ŞTIINŢIFIC:

- Biotehnologie: oportunităţi şi provocări, consideraţii privind biosecuritatea;
- controlul biologic al insectelor dăunătoare;
- filogenia moleculară a organismelor;
- diversitatea, ecologia şi importanţa coleopterelor din suprafamilia *Curculionoidea*;
- conservarea biodiversităţii în condiţiile unui presing antropic sporit asupra ecosistemelor.

PARTICIPĂRI ÎN PROIECTE:

2019-2023 **20.80009.7007.12 DIVZOO** „Diversitatea artropodelor hematofage, a zoo- şi fitohelminţilor, vulnerabilitatea, strategiile de tolerare a factorilor climatici şi elaborarea procedeelor inovative de control integrat al speciilor de interes socio-economic", conducător – acad. Toderaş Ion.

2017-2019 **STCU/A/6233** „Elaborarea şi aplicarea procedeelor agroecologice în gestionarea durabilă a insectelor dăunătoare pentru producerea tomatelor sănătoase", conducător – acad. Toderaş Ion.

2017-2018 **RESINFRA** „Modernizarea infrastructurii Centrului de Cercetare a Invaziilor Biologice în domeniul biobankingului şi barcodării genetice a biodiversităţii", conducător – acad. Toderaş Ion.

2017-2018 **Proiect instituţional 15.817.05.02F** „Substanţele biologic active ca bază a valorificării biotehnologiilor moderne în modularea şi adaptarea proceselor metabolice ale organismelor vii", conducător – dr. hab. Crivoi Aurelia.

2017 Development of training materials and providing training of trainers in organic and conservation agriculture in framework of "Inclusive Rural Economic and Climate Resilience Programme" (IFAD VI), funded by IFAD/GEF, NGO BIOS, conducător – dr. Ciubotaru Valentin.

2015-2016 **IPMD-GROW** Capacity building of Biological Invasions Research Center in the field of IPM through connexion to the European Research Infrastructure, Institutul de Zoologie, conducător – acad. Toderaş Ion.

2015-2016 **RM-UE, Contract de Grant Nr. 2014/ 346-992** „Fortificarea capacităţilor Centrului de Cercetare a Invaziilor Biologice în domeniul IPM prin conexiune la Infrastructura de Cercetare Europeană", conducător– acad. Toderaş Ion.

2015-2016 **Rufford Small Grant** „Beetle communities and their conservation in steppe areas of Republic of Moldova", conducător - Moldovan Anna.

2015-2016 **AUF Bureau Europe centrale et orientale 2015** Ecole doctorale Cluj, Chisinau, Liege, conducător – prof. Cozma Vasile.

2015 **PRRECI/15/20** „Elaborarea studiului de analiză a măsurilor de reziliență a schimbărilor climaterice", ONG BIOS, conducător – dr. Ciubotaru Valentin.

2014-2019 **5.817.02.12F** „Diversitatea, structura şi funcţionarea complexelor faunistice naturale şi antropizate în contextul fortificării strategiei securităţii naţionale a Republicii Moldova", conducător – acad. Toderaş Ion.

2011-2014 **11.817.08.13F** „Invaziile biologice şi impactul lor asupra diversităţii, structurii şi funcţionării ecosistemelor naturale şi antropizate din Republica Moldova" conducător - acad. Toderaş Ion.

2011-2014 **Air-Q-Gov** Guvernarea Calităţii Aerului în ţările din Europa de Est (Beneficiar Ministerul Mediului al Republicii Moldova), implementat de AO BIOS.

PARTICIPĂRI LA MANIFESTĂRI ŞTIINŢIFICE:

2019 - International Congress on Invertebrate Pathology and Microbial Control and 52nd Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology and 17th Meeting of the IOBC-WPRS Working Group „Microbial and Nematode Control of Invertebrate Pests" (Spania, Valencia).

2018 - International Conference on Microbial Biotechnology, 4th edition (R. Moldova, Chişinău); Simpozionul Internaţional „Ecologie funcţională a animalelor" consacrat aniversării a 70 de ani de la naşterea academicianului Ion Toderaş (R. Moldova, Chişinău).

2017 - The 16th Meeting of the IOBC-WPRS Working Group „Microbial and Nematode Control of Invertebrate Pests" (Georgia, Tbilisi); International Symposium of Ecologists of Montenegro

(Montenegro, Sutomore); Simpozionul Internațional „Problemele actuale ale Zoologiei şi Parazitologiei: Realizări şi Perspective” (Chișinău); National Scientific Conference with International Participation „Integration through Research and Innovation” (R. Moldova, Chișinău).

2016 - International Zoological Congress of „Grigore Antipa” Museum (România, Bucureşti).

2015 - International Congress on Invertebrate Pathology and Microbial Control and the 48th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology (Canada, Vancouver); Simpozionul științific internațional „Protecția Plantelor - Realizări și perspective” (R. Moldova, Chișinău); Conferința științifico-practică „Rezultatele cercetărilor la cultura plantelor de câmp în Republica Moldova” (R. Moldova, Bălți).

2014 - Sesiunea națională de comunicări științifice studențești (R. Moldova, Chișinău); International Zoological Congress of „Grigore Antipa” Museum (România, Bucureşti).

2013 - Conferinţa Internaţională a Zoologilor „Problemele actuale ale protecţiei şi valorificării durabile a diversităţii lumii animale” (R. Moldova, Chişinău); Ist Euroasian pest management conference (Rusia, Moscova); Annual Zoological Congres of „Grigore Antipa” Museum (România, Bucureşti); IVth International Symposium of Alien species in Holarctic (Borok - 4) (Rusia, Moscova).

2012 - Conferinţa ştiinţifico- practică internaţională „Ecologia, evoluţia şi sistematica animalelor” (Rusia, Reazani); Conferinţa interuniversitară Educaţie prin Cercetare - Garant al Performanţei Învăţământului Superior (R. Moldova, Chişinău); Annual Zoological Congress of „Grigore Antipa” Museum (România, Bucureşti).

2011 - International Congress on Invertebrate Pathology and Microbial Control and 44th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology (Canada, Nova Scotia); Conferinţa Internaţională a Zoologilor „Problemele actuale ale protecţiei şi valorificării durabile a diversităţii lumii animale” (R. Moldova, Chişinău); International Conference of Young Researchers, IXth edition (R. Moldova, Chişinău).

DIPLOME ŞI MENŢIUNI:

- **Diplome și medalii** decernate în cadrul saloanelor și expozițiilor de inventică naționale și internaționale inclusiv **8 medalii de aur** (ICE-USV 2018, EUREKA 2015 și 2013, „Budi Uzor Inova” 2015, INVENTICA 2014, Al 42 salon de Inventică, Geneva 2014, INFOINVENT 2013), **2 medalii de argint** (CADET INOVA 2019, IWIS 2011), **2 medalii de bronz** (INFOINVENT 2015, IWIS 2014,), **diploma și medalia Organizației Mondiale a Proprietății Intelectuale WIPO „Best Young Inventor” 2013**.
- **Premii speciale** inclusiv Chris Lomer Award of Society for Invertebrate Pathology 2019; diploma și medalia de excelență INVENTICA 2019; premiul EUROINVENT 2018, IOBC-WPRS Working Group „Microbial and Nematode Control of Invertebrate Pests” Travel Award 2017; Society for Invertebrate Pathology Travel Award 2015; Premiul Autorității Naționale pentru Cercetare Științifică și Inovare din România 2015, Diplomă și medalie oferite de Ministerul Educației Naționale a României 2014; Locul III, Direcția strategică: Biotehnologii. Concursul național „Topul Inovațiilor” 2014.
- **Burse** inclusiv Bursa de Excelență a Guvernului Republicii Moldova 2016; Laureat al Bursei de Merit pentru anul 2011.
- **Titluri onorifice** inclusiv Ambasador al Society for Invertebrate Pathology, din anul 2018; Șef de promoție, specialitatea „Biologie Moleculară”, 2012.

PUBLICAŢII ŞITIINŢIFICE ŞI ŞTIINŢIFICO-METODICE:

- **4** capitole în monografii colective (2 monoautorat),
- **22** articole (2 articole în reviste cu factor de impact 0,1-0,9; 3 articole în alte reviste editate în străinătate; 5 articole în reviste naționale categoria B și C, 12 articole în culegeri naționale și internaționale; dintre care 4 monoautorat),
- **18** rezumate ale comunicărilor științifice,
- **3** brevete de invenție de scurtă durată.

LIMBI VORBITE:

română – nativ, rusă – nativ, engleză – fluent.