

**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

Rezumatul tezei de doctor în științe biologice

CHIȘINĂU, 2021

Teza a fost elaborată în cadrul Centrului de Cercetare a Invaziilor Biologice, Laboratorul „Sistematică și Filogenie Moleculară”, al Institutului de Zoologie și în cadrul Laboratorului de cercetări științifice „Securitate biologică”, Facultatea de Biologie și Pedologie, ale Universității de Stat din Moldova.

Conducător științific:

LEȘANU Mihai, dr. șt. biol., conf. univ.

Consultant științific:

TODERAȘ Ion, dr. hab. șt. biol., prof. univ., acad., Om Emerit al Republicii Moldova,
Membru de Onoare al Academiei Române

Referenți oficiali:

VOLOȘCIUC Leonid, dr. hab. șt. biol., prof. cercet., Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor

CEPOI Liliana, dr. șt. biol., conf. cercet., Institutul de Microbiologie și Biotehnologie

Componența Consiliului Științific Specializat:

Președinte

RUDIC Valeriu, dr. hab. șt. biol., prof. univ., acad., Om Emerit al Republicii Moldova,
Institutul de Microbiologie și Biotehnologie

Secretar științific

CHIRIAC Tatiana, dr. șt. biol., conf. cercet., Institutul de Microbiologie și Biotehnologie

Membri

ERHAN Dumitru, dr. hab. șt. biol., prof. cercet., Institutul de Zoologie

CODREANU Svetlana, dr. șt. biol., conf. cercet., Institutul de Microbiologie și Biotehnologie

CHISELIȚA Oleg, dr. șt. biol., conf. cercet., Institutul de Microbiologie și Biotehnologie

BUȘMACHIU Galina, dr. hab. șt. biol., conf. cercet., Institutul de Zoologie

Susținerea va avea loc la **25 februarie 2021, orele 14:00** în ședința Consiliului științific specializat **D.167.01-39** din cadrul Institutului de Microbiologie și Biotehnologie, (MD 2028, or. Chișinău, str. Academiei 1, Sala „Mircea Ciuhrii” et. 2, biroul 253).

Teza de doctor și rezumatul pot fi consultate la Biblioteca Științifică Centrală (Institut) „Andrei Lupan” (MD 2028, or. Chișinău, str. Academiei 5A), Biblioteca Centrală a Universității de Stat din Moldova (MD 2009, mun. Chișinău, str. Alexei Mateevici 60) și pe pagina web a ANACEC (www.cnaa.md).

Rezumatul a fost expediat la 17 „ianuarie” 2021

Secretar științific
al Consiliului Științific Specializat,
dr. șt. biol., conf. cercet.,

CHIRIAC Tatiana

Conducător științific:
dr. șt. biol., conf. univ.

LEȘANU Mihai

Consultant științific
dr. hab. șt. biol., prof. univ., acad.,
Om Emerit al Republicii Moldova
Membru de Onoare al Academiei Române

TODERAȘ Ion

Autor:

MOLDOVAN Anna

©Moldovan Anna, 2021

CUPRINS

REPERELE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII.....	4
CONȚINUTUL TEZEI.....	7
1. CONTROLUL BIOLOGIC AL COLEOPTERELOR CURCULIONOIDE: PROBLEME ȘI REALIZĂRI.....	7
2. MATERIALE ȘI METODE.....	8
2.1 Obiectele de studiu.....	8
2.2 Metodele de studiu.....	8
2.3 Concluzii la capitolul 2.....	10
3. MICROFLORA FUNGICĂ A SPECIILOR DE COLEOPTERE CURCULIONOIDE INVESTIGATE.....	10
3.1 Identificarea tulpinilor fungice cu utilizarea metodelor molecular-genetice.....	10
3.2 Identificarea tulpinilor fungice în baza caracterelor morfologice.....	11
3.3 Poziția taxonomică și importanța practică a tulpinilor fungice identificate.....	11
3.4 Concluzii la capitolul 3.....	13
4. ELABORAREA PROCEDEULUI DE PRODUCERE ȘI APLICARE A AGENȚILOR FUNGICI DE CONTROL BIOLOGIC AL COLEOPTERELOR CURCULIONOIDE.....	14
4.1 Estimarea susceptibilității insectelor țintă la infecția cu tulpinile fungice potențial entomopatogene.....	14
4.2 Evaluarea activității insecticide a tulpinii <i>Beauveria bassiana</i> L1/6 (CNMN-FE-01).....	15
4.3 Proprietățile fiziologice ale tulpinii de fungi <i>Beauveria bassiana</i> CNMN-FE-01.....	16
4.4 Elaborarea și aplicarea preparatelor bioinsecticide pe baza tulpinii de fungi <i>Beauveria bassiana</i> CNMN-FE-01.....	20
4.5 Concluzii la capitolul 4.....	23
CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI.....	24
BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ.....	27
LISTA PUBLICAȚIILOR LA TEMA TEZEI.....	32
ADNOTARE (în română, rusă și engleză).....	36

REPERELE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII

Actualitatea și importanța problemei abordate. Productivitatea culturilor agricole este compromisă de un număr mare de factori, printre care 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. Speciile *Sitona lineatus* L., *Hypera postica* (Gyll.) și *Protapion apricans* (Hbst.) (Coleoptera, Curculionoidea) sunt vătămători semnificativi ai culturilor de leguminoase (*Fabaceae*, *Leguminosae*) răspândiți în Europa, Africa, Asia și America de Nord, inclusiv în Republica Moldova. Fabaceele se clasează pe locul doi după familia *Poaceae* privind importanța economică. Reprezentanții leguminoaselor constituie o sursă semnificativă de proteine și grăsimi de origine vegetală, sunt cultivați în scopuri furajere, în calitate de fertilizanți, sunt utilizați de asemenea ca sursă de fibră, condimente și plante decorative (Bennett 2011).

Managementul speciilor de dăunători ai fabaceelor este o provocare datorită fecundității înalte, comportamentului migrator și habitatului ascuns al larvelor. Aplicarea insecticidelor chimice reprezintă cea mai frecvent utilizată metodă de combatere, chiar dacă majoritatea posedă un nivel înalt de toxicitate și prezintă un pericol considerabil pentru sănătatea omului. De asemenea, pesticidele au un impact negativ asupra mediului, cât și asupra biodiversității (Pimentel 2005, Damalas, Eleftherohorinos 2011). Drept consecință, în legislația unor țări au fost introduse prevederi privind 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 plan global, însă, se constată o tendință de creștere a cantităților de pesticide chimice utilizate, inclusiv a celor 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 biologice de control al dăunătorilor bazate pe utilizarea altor organisme în reducerea efectivului numeric al organismelor periculoase sub pragul economic de dăunare. Insectele, ca și celelalte organisme vii, posedă un număr larg de inamici naturali, care pot fi utilizați în calitate de agenți de control biologic, 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 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, au o perioadă de valabilitate lungă și pot fi aplicate, 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* inclusiv microorganismele care ar putea fi utilizate în controlul biologic al insectelor investigate. Studiarea în complex a microflorei fungice a acestor specii de insecte 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 procedurii 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. Exemplarele de insecte au fost colectate, folosind metode clasice entomologice (colectarea manuală, cosirea cu fileul entomologic) și identificate morfologic cu utilizarea cheilor dihotomice. Izolarea tulpinilor de fungi a fost realizată, folosind metode clasice microbiologice (izolarea directă și indirectă pe medii nutritive uzuale, selective și înalt selective), cu intenția de a obține un spectru mai extins de tulpini fungice asociate dăunătorilor și un număr mai mare de tulpini cu potențial insecticid. Pentru stabilirea apartenenței specifice a tulpinilor fungice au fost utilizate metode clasice microbiologice (metode morfo-culturale cu utilizarea cheilor dihotomice) și metode molecular-genetice (extragerea ADN folosind kit-ului DNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN; amplificarea fragmentelor ADN polimorfice, cu utilizarea perechilor de primeri NS5/NS6 și ITS4/ITS5; electroforeza în gel de agaroză de 1,5%; purificarea produsului PCR și secvențierea acestuia). În scopul selectării tulpinii potențial producător a fost estimată susceptibilitatea insectelor țintă la infecția cu tulpinile fungice cu potențial insecticid (fiind verificate postulatele lui Koch) și a fost evaluată activitatea insecticidă (exprimată în valoarea LC_{50}) a tulpinii cu potențial insecticid maxim. Pentru a confirma tulpina de fungi selectată în calitate de tulpină producător, elabora formula preparatului insecticid și recomandările de aplicare au fost caracterizate particularitățile de creștere și dezvoltare (viteza de creștere radială, cantitatea de conidii produse per unitate de suprafață, rata de germinare) a tulpinii fungice în diferite condiții ale mediului ambiant (temperatură, pH, salinitate, etc.). În scopul elaborării fluxului tehnologic de producere a preparatelor insecticide naturale pe baza tulpinilor autohtone de fungi au fost caracterizate condițiile de păstrare pe termen lung, mediu și scurt a tulpinii fungice și verificată viabilitatea acesteia după păstrare. La proiectarea experiențelor, analiza, interpretarea și validarea rezultatelor obținute au fost utilizate metode matematice, statistice (calcularea intervalelor de încredere, analiza dispersională unifactorială) și bioinformatică (programul de căutare BLAST, programele de calcul TreePuzzle, PhyML și MEGA).

CONȚINUTUL TEZEI

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 insecte 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*, vătămători semnificativi ai culturilor de *Fabaceae*.

Sunt discutate metodele utilizate în combaterea coleopterelor curculionoide dăunătoare, fiind subliniat faptul că insecticidele chimice rămân a fi cea mai practică metodă. Acestea se utilizează extensiv, chiar dacă sunt cunoscute efectele adverse 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. 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 care presupune utilizarea altor organisme în reducerea efectivului numeric al organismelor vizate 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 microbiene pe bază de micromicete. Capitolul se încheie cu concluzii, este formulată problema de cercetare și direcțiile de rezolvare a acesteia, sunt definite scopul și obiectivele lucrării.

2. MATERIALE ȘI METODE

2.1 Obiectele de studiu

Subcapitolul conține descrierea obiectelor de studiu. Sunt prezentate informații cu privire la biologia și ecologia speciilor de insecte *Sitona lineatus* L., *Hypera (Hypera) postica* (Gyll.), *Protapion apricans* (Hbst.) (Coleoptera, Curculionidae) și a speciilor de fungi entomopatogeni *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. și *Isaria fumosorosea* Wize, (Hypocreales, Cordycipitaceae) necesare pentru elaborarea procedurii de obținere și aplicare a preparatului entomopatogen natural.

2.2 Metodele de studiu

2.2.1 Metode entomologice

Exemplarele adulte din speciile *S. lineatus*, *H. postica* și *P. apricans* au fost colectate în perioada lunilor aprilie - septembrie 2010 și 2016 în 6 localități din Nordul, Centrul și Sudul Republicii Moldova, folosind metode clasice entomologice (Bacal, Cocîrță, Munteanu 2014). Identificarea apartenenței specifice a coleoptelilor curculionide a fost efectuată cu utilizarea lupei binoculare BEL Photonics. Confirmarea corectitudinii identificării speciilor a fost realizată prin consultarea materialului Muzeului de Entomologie al Institutului de Zoologie.

2.2.2 Metode microbiologice

Tulpinile fungice au fost izolate și evidențiate în cultură pură folosind metode clasice microbiologice cu utilizarea mediilor nutritive uzuale, selective și înalt selective: PDA (Potato Dextrose Agar, Merck), PDA selectiv (suplimentat cu 2ml/L Ampicilină cu concentrația de 25 mg/ml), SAPF (Selectiv Agar for Pathogenic Fungi, Merck) și SAPF înalt selectiv (suplimentat cu 5ml/L dodine, 65 mg/L). Pentru păstrarea de lungă durată a genotipului inițial al tulpinilor izolate acestea au fost plasate în soluție de glicerol 10% la temperatura de -80 °C. Tulpinile fungice entomopatogene de interes au fost depuse în Colecția Națională de Microorganisme Neputogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie.

Pentru identificarea tulpinilor fungice au fost utilizate metode clasice microbiologice de identificare (morfo-culturale) și metode molecular-genetice de identificare. Pentru a selecta tulpina producător 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) fiind verificată satisfacerea postulatelor lui Koch (Kaya, Vega 2012, Lacey, Solter 2012).

Pentru a caracteriza tulpinile fungice care au demonstrat potențial insecticid 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 (15-35 °C) (Fargues et al. 1997) și al radiațiilor UV ($\lambda=312$ nm) (Mustafa, Gurvinder 2008 cu unele modificări) asupra creșterii și dezvoltării tulpinilor fungice. A fost determinată influența pH-ului (pH = 5-9), salinității mediului nutritiv (1, 2, 3, 5, 7, 9 % NaCl) (Mert, Dizbay 1977), presiunii osmotice (0,001M; 0,01M și 0,1M NaCl) (Piatkowski, Krzyzewska 2007 cu unele modificări) 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.

2.2.3 Metode molecular-genetice

Extragerea ADN a fost efectuată cu ajutorul kit-ului de extragere a ADN-ului genomic, DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN). Cantitatea de ADN a fost estimată vizual prin electroforeză în gel de agaroză de 1,5 % timp de 30 min, la 150V.

Amplificarea fragmentelor ADN polimorfice (PCR) s-a realizat în termociclu automat T1 Plus Thermocycler Biometra (t° de aliniere 55°C) cu utilizarea a două perechi de primeri: ITS4/ITS5, care amplifică spacer-ul transcriptibil și porțiunea de genă care codifică ARNr 5,8S și perechea NS5/NS6, care amplifică porțiunea de genă ce codifică ARNr 18S (White et al. 1990). Vizualizarea produsului amplificării a fost efectuată prin electroforeză în gel de agaroză de 1,5 %.

Purificarea produsului PCR a fost efectuată cu ajutorul setului de reagenți Mini Elute PCR Purification Kit (QIAGEN).

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

2.2.4 Metode statistice și bioinformaționale

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 dispersională unifactorială (ANOVA). Pentru efectuarea calculelor matematice și interpretarea grafică a rezultatelor obținute au fost utilizate aplicațiile Microsoft Office Excel și Power Point. Pentru analiza succesiunilor nucleotidice a fost aplicat programul de căutare BLAST (Altschul et al. 1990) din baza de date GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Reconstruirea arborelui filogenetic a fost efectuată cu ajutorul metodelor matricelor-distanțate (algoritmele [Neighbour-joining] și [UPGMA]), utilizând programele de calcul TreePuzzle, PhyML și MEGA (Kumar, Stecher, Tamura 2016).

2.3 Concluzii la capitolul 2

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

3. MICROFLORA FUNGICĂ A SPECIILOR DE COLEOPTERE CURCULIONOIDE INVESTIGATE

Capitolul prezintă rezultatele cercetărilor privind izolarea, identificarea și caracterizarea comunităților fungice din microflora speciilor *Sitona lineatus*, *Hypera postica* și *Protapion apricans* utilizând metode clasice și molecular-genetice.

3.1 Identificarea tulpinilor fungice cu utilizarea metodelor molecular-genetice

În rezultatul studiului întreprins au fost identificate folosind metodele molecular-genetice 42 tulpini fungice, 38 dintre ele aparținând încregăturii Ascomycota, 2 tulpini fiind din încregătură Basidiomycota și două din încregătura 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 identificați 17 reprezentanți 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.

În rezultatul analizei filogenetice în baza succesiunii nucleotidice a regiunii ITS, din cele 42 tulpini fungice incluse în studiu, 40 au fost identificate la nivel de specie și 2 tulpini au fost identificate la nivel de gen, din cauza lipsei secvențelor nucleotidice cu un grad de similaritate de 99-100% în baza de date Genbank.

3.2 Identificarea tulpinilor fungice în baza caracterelor morfologice

În rezultatul izolării tulpinilor fungice din corpul speciilor *Sitona lineatus* și *Hypera postica* cu semne vizibile de micoză au fost evidențiate 13 tulpini morfologic similare cu *Beauveria bassiana* și *Isaria fumosorosea*. Dintre acestea tulpini, 12 au identificate, folosind chei dihotoamice de determinare, ca *Beauveria* spp și o tulpină ca *Isaria* sp. folosind pentru comparație tulpinile izolate anterior, apartenența specifică a cărora a fost determinată folosind metode molecular-genetice (Humber 2012).

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 (figura 3.1).

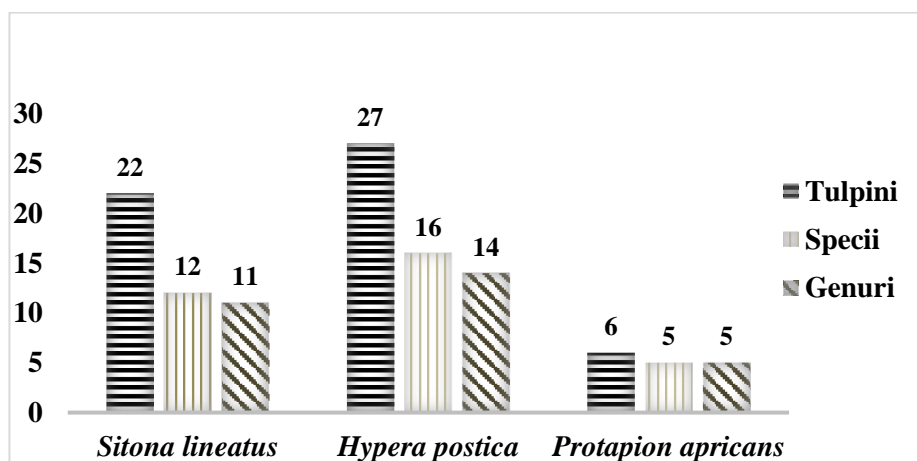


Fig. 3.1. Numărul de tulpini, specii și genuri de fungi identificate în microflora fungică a dăunătorilor

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 curculionide, *H. postica* și *P. apricans*. Nici una dintre speciile identificate nu a fost comună pentru toate cele 3 specii de insecte investigate.

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. Un exemplu de fișă este prezentat mai jos:

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 secvența nucleotidică a regiunii ITS (figura 3.2.a).

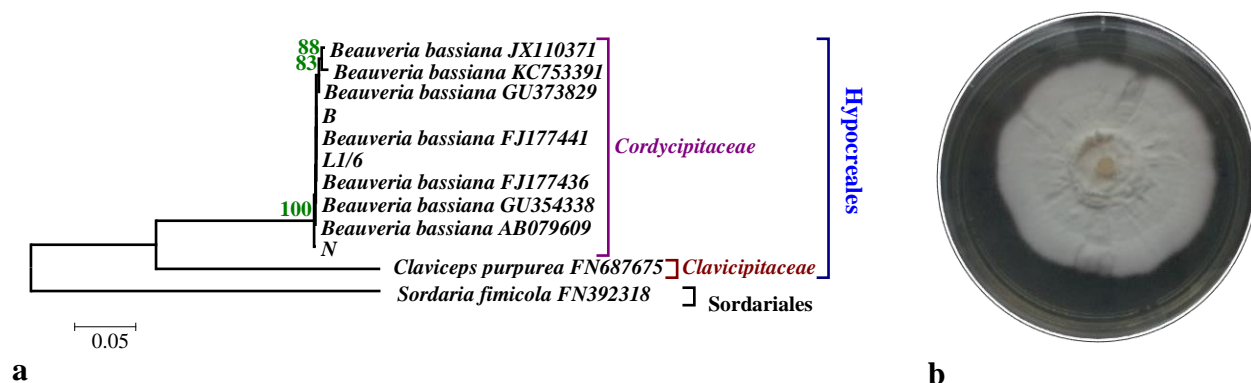


Fig. 3.2. Relațiile filogenetice și aspectul morfologic ale tulpinilor B, N și L1/6 (*B. bassiana*) (orig.)

a – arborele filogenetic reconstruit, **b** – aspect morfologic tulpina L1/6.

Particularități morfologice: micromicetă cosmopolită entomopatogenă, răspândită în mod natural în sol. Coloniile au creștere moderată până la rapidă, au aspect catifelat, de praf, la început sunt albe, devenind mai târziu galben-deschise (figura 3.2.b). Conidioforii sunt abundenți, apar din hifele vegetative și au 1-2 μm lungime. Celulele, ce formează conidiile, 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. (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, sporiile 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). Specia *B. bassiana* produce un șir de substanțe biologice active, cu ajutorul cărora penetrează integumentele, alcaloizi și toxine cu efect antibacterian (Patocka 2016). De asemenea specia posedă efect antagonist împotriva fungilor fitopatogeni (Yun et al. 2017).

În microbiota speciilor investigate 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 sunt asociate cu patologiiile 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 biologice active. Astfel sunt necesare studii suplimentare în scopul caracterizării și valorificării potențialului biotehnologic al tulpinilor fungice evidențiate.

Dintre tulpinile izolate 19 prezintă 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*), vătămător al speciilor de ficus (Dhiman, Pooja 2005). 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). Tulpinile identificate ca *A. flavipes* și *P. brevicompactum* necesită investigații suplimentare detaliate privind proprietățile insecticide. În rezultatul cercetărilor efectuate în microbiota insectelor *Sitona lineatus* și *Hypera postica* au fost evidențiate speciile *Beauveria bassiana*, *Beauveria* spp., *Isaria fumosorosea* și *Isaria* sp., agenți potențiali de control biologic al diferitor specii de insecte. Studiile ulterioare trebuie să vizeze virulența tulpinilor izolate și acțiunea lor asupra speciilor dăunătoare și asupra artropodelor nevizate.

3.4 Concluzii la capitolul 3

În rezultatul cercetărilor efectuate, utilizând metode clasice și molecular-genetice de identificare, în microflora speciilor investigate au fost identificate 55 tulpini fungice ce aparțin la 23 specii și 3 încrângături (Ascomycota, Basidiomycota și Mucormycota). Pentru prima dată, în Republica Moldova, în microflora dăunătorilor *Sitona lineatus* și *Hypera postica* au fost identificate speciile *Beauveria bassiana*, *Beauveria* spp., *Isaria fumosorosea* și *Isaria* sp. cu potențial în controlul biologic al acestor specii de insecte. De asemenea în premieră au fost evidențiate speciile fungice din microflora dăunătorului *Protapion apricans*. În baza rezultatelor obținute speciile de insecte studiate au fost atestate ca potențiali vectori ai ciupercilor fitopatogene.

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 *Beauveria bassiana*.

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 și Biotehnologie, în baza ei fiind obținut brevet de invenție (Moldovan, Munteanu-Molotievskiy, Toderaș 2018);
- a fost evidențiată influența temperaturii asupra creșterii și 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, salinității, 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 $\sim 10^9$ 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. Cele mai înalte valori ale mortalității au fost înregistrate pentru tulpina L1/6, care a fost selectată pentru studiile ulterioare. 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, %		
				<i>Sitona lineatus</i>	<i>Hypera postica</i>	<i>Protapion apricans</i>
1.	<i>Beauveria bassiana</i> , L1/6	94,0±4,50	1,064	100	70	40
2.	<i>Beauveria bassiana</i> , B	90,0±3,97	1,111	70	30	0
3.	<i>Beauveria bassiana</i> , N	86,0±1,50	1,163	60	10	10
4.	<i>Beauveria sp.</i> , Cg7	90,0±3,12	1,111	70	50	0
5.	<i>Beauveria sp.</i> , Cg10	87,0±2,00	1,149	80	30	0
6.	<i>Beauveria sp.</i> , Cg11	82,0±1,80	1,220	60	30	0
7.	<i>Beauveria sp.</i> , Cg12	87,0±3,12	1,149	90	50	20
8.	<i>Beauveria sp.</i> , Cg13	93,0±2,18	1,075	50	20	0
9.	<i>Isaria fumosorosea</i> , L5/6	91,5±4,82	1,093	40	0	0
10.	Martor, H ₂ O _{dist.} sterilă		1	0	0	0

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

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 spori ciupercii. După inoculare, insectele au fost incubate câte 10 în cuști cu lucernă proaspătă, în condiții controlate, la temperatura camerei de 25±1 °C și durata zilei de 14h, datele privind mortalitatea fiind înregistrate fiecare 24h. 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.

Cea mai efektivă dintre concentrațiile testate ale tulpinii L1/6, pentru *Sitona lineatus* L., a fost $0,969 \times 10^6$ spori/ml cauzând o mortalitate de 100% la a 5-a zi de la tratament (figura 4.1).

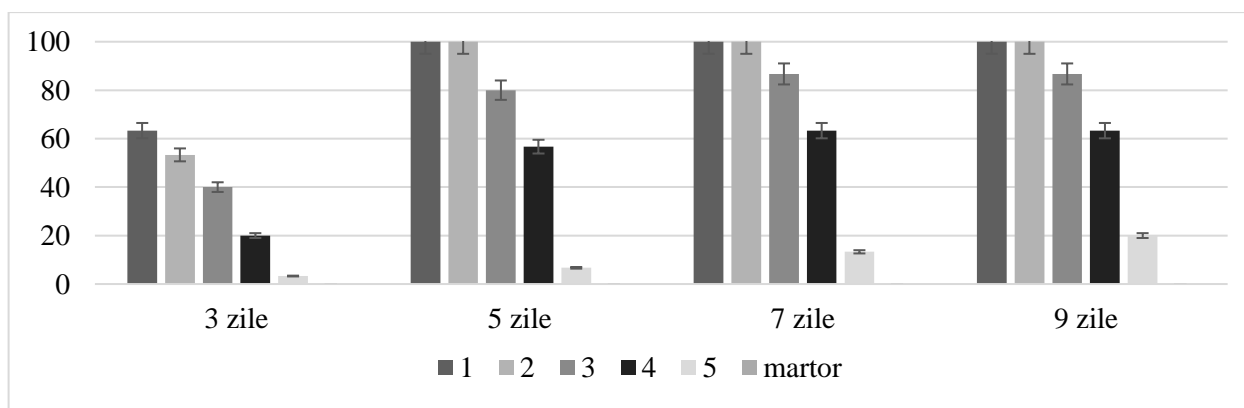


Fig. 4.1. Rata medie a mortalității indivizilor din specia *S. lineatus* după aplicarea suspensiei din conidii ale tulpinii L1/6

1 - $0,969 \times 10^7$ conidii/ml, 2 - $0,969 \times 10^6$ conidii/ml, 3 - $0,969 \times 10^5$ conidii/ml, 4 - $0,969 \times 10^4$ conidii/ml, 5 - $0,969 \times 10^4$ conidii/ml, **martor** – apă distilată sterilă

Activitatea biologică a tulpinii exprimată în valorile LC_{50} , calculată după formula lui Spearman-Kärber, a constituit $1,127 \times 10^4$ spori/ml. 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. 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, Toderăș 2018).

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). 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.

Influența temperaturii asupra creșterii și dezvoltării tulpinii de fungi *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01. În rezultatul analizei datelor obținute în prezenta lucrare a fost stabilit faptul că începând cu ziua a 4-a de cultivare creșterea radială a tulpinii *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01 urmează un model liniar. Viteza de creștere radială a tulpinii de fungi diferă semnificativ din punct de vedere statistic la temperaturile testate ($F(3,52) = 6,073$, $p = 0,001$). În rezultatul analizei datelor privind viteza medie de creșterea radială a fost determinat faptul că temperatura optimă de creștere este de 25 °C, similar datelor din literatura de specialitate (Fargues et al. 1997). Creșterea tulpinii se stopează la temperatura de 35°C (figura 4.2).

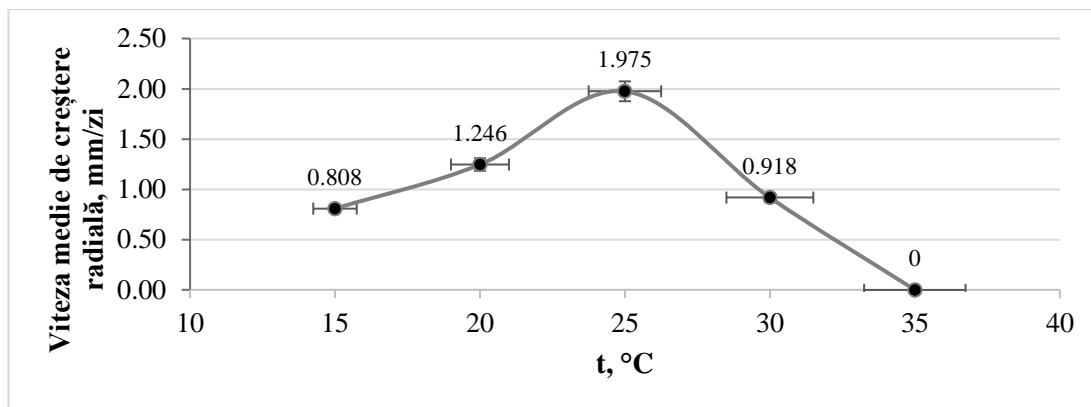


Fig. 4.2. Viteza medie de creștere radială a tulpinii de fungi *B. bassiana* CNMN-FE-01 pe mediul nutritiv PDA la diferite temperaturi, mm/zi

Sporularea și rata de germinare sunt de asemenea maxime în cazul cultivării la temperatura de 25 °C. A fost stabilit, că la temperatura 25 °C timp de 90 de zile tulpina fungică își menține viabilitatea sporilor în proporție de 86%. Temperaturile mai mari de 25 °C reduc semnificativ viabilitatea sporilor. Lipsa creșterii și germinării la temperaturi apropiate de temperatura corpului uman prezintă un avantaj semnificativ pentru înregistrarea preparatelor entomopatogene fungice (Butt 2002).

Influența radiațiilor UV asupra creșterii și dezvoltării tulpinii de fungi *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01. Radiațiile UV sunt un factor limitativ pentru creșterea și dezvoltarea tulpinilor fungice în condiții de câmp, conidiile fiind extrem de sensibile la radiațiile UVB (Vega et al. 2012). În rezultatul cercetărilor efectuate a fost stabilit faptul, că expunerea de scurtă durată la razele UV cu $\lambda=312$ nm inhibă puternic germinarea sporilor (figura 4.3). 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.

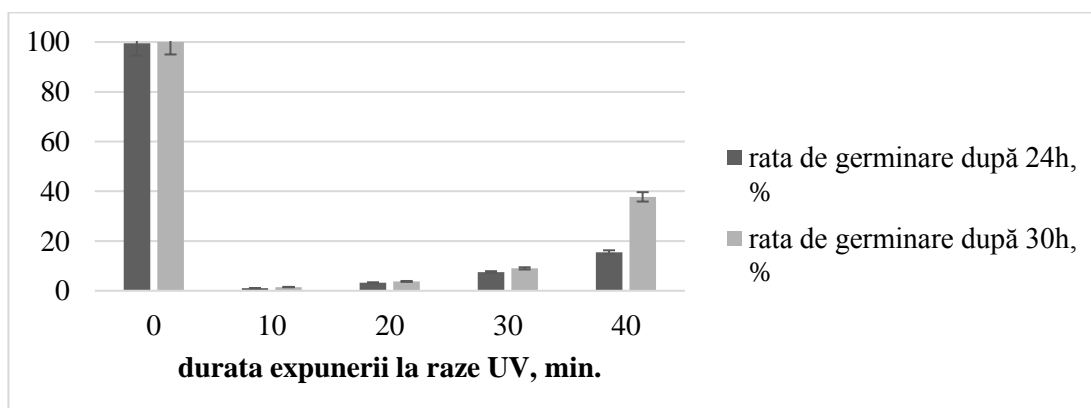


Fig. 4.3. Germinarea conidiilor tulpinii *B. bassiana* CNMN-FE-01 după iradierea cu raze UV timp de 10, 20, 30, 40 min.

Viteza de creștere radială nu este afectată semnificativ de expunerea la raze UV ($\lambda = 312$ nm) ($F(4,65) = 0,037, p = 0,827$). 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 absorbantți 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). Stresul la nivel subletal (nutrițional, osmotic, etc.) poate stimula toleranța conidiilor față de radiațiile UV (Vega et al. 2012).

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). 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, Dias et al. 2008). În linii generale tulpinile de *Beauveria 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 4.4).

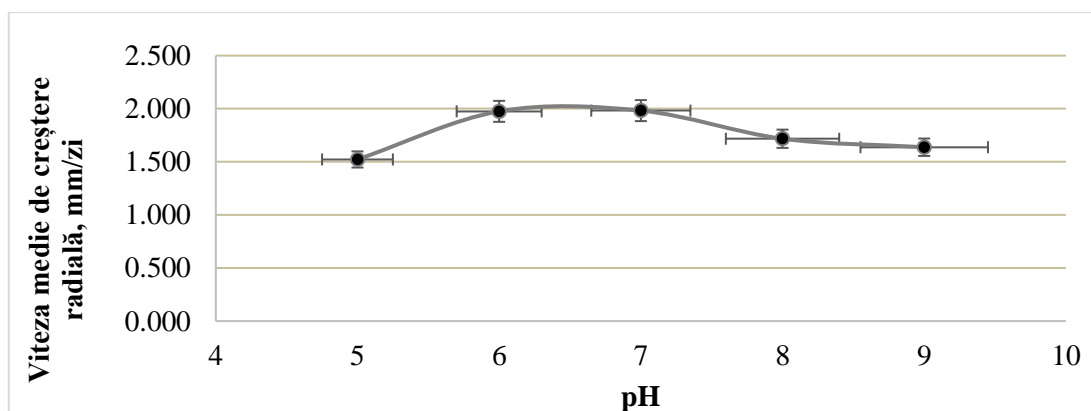


Fig. 4.4. Viteza medie de creștere radială a tulpinii de fungi *B. bassiana* CNMN-FE-01 pe mediu nutritiv PDA cu diferit pH, mm/zi

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 valori 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.

A fost constatat că la valori ale pH mai mari de 6 se reduce în timp cantitatea de spori produsă și viabilitatea sporilor. 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. 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.

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). Există diferențe semnificative din punct de vedere statistic dintre valorile medii ale razei coloniei tulpinii investigate la diferite concentrații inițiale ale NaCl în mediu de cultură ($F(5,78) = 8,823, p = 1,14 \times 10^{-6}$). 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 linear ($y = -0.191x + 2.122, R^2 = 0.983$).

Cultivarea timp de 90 de zile a tulpinii fungice pe medii nutritive solide 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 6,6 ori, și mai mult, la valori ale concentrației de NaCl mai mari de 3% (figura 4.5).

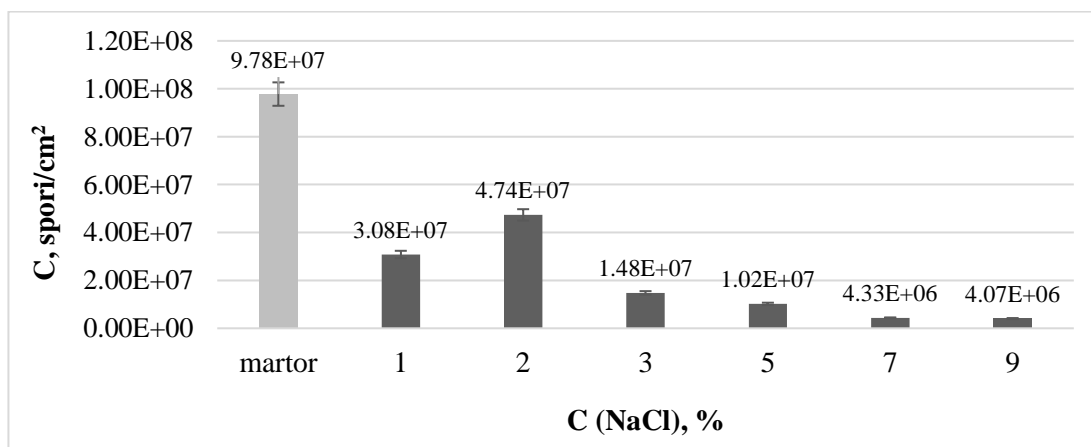


Fig. 4.5. Cantitatea de spori produsă de tulpina de fungi *B. bassiana* CNMN-FE-01 pe mediu nutritiv PDA cu diferite concentrații de NaCl după păstrare îndelungată, spori/cm²

Concentrațiile de 2% și 9% NaCl contribuie la o creștere nesemnificativă față de martor a viabilității conidiilor, însă în contextul reducerii considerabile a cantității de conidii produse acest lucru nu prezintă interes din punct de vedere al optimizării mediului nutritiv. Celelalte concentrații testate reduc considerabil viabilitatea conidiilor.

Influența presiunii osmotice a mediului asupra creșterii și dezvoltării tulpinii de funghi *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). 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. Datele obținute sunt semnificative din punct de vedere statistic ($F(3,52) = 4,547$, $p = 0,007$). Cantitatea de spori produsă crește semnificativ după menținerea conidiilor în soluție de 0,006 M NaCl comparativ cu menținerea în apă distilată sterilă. 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 4.6). 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.

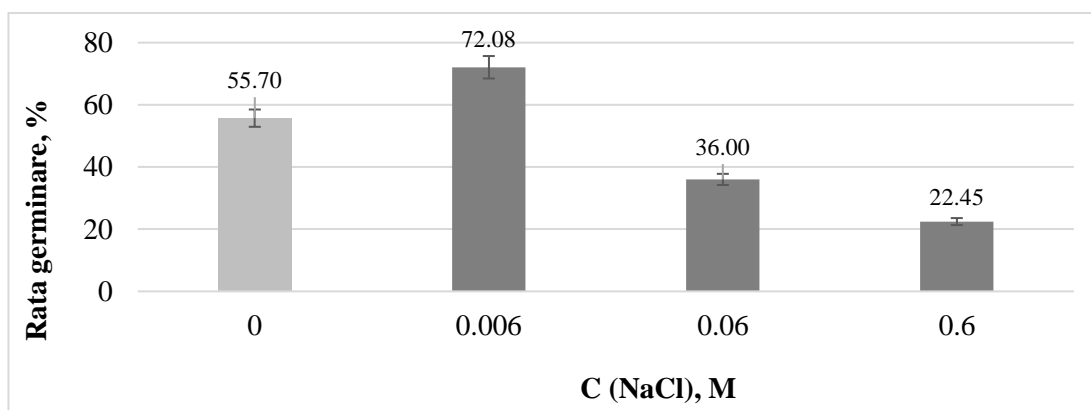


Fig. 4.6. Viabilitatea sporilor produși de tulpina de funghi *B. bassiana* CNMN-FE-01 după păstrare, %

4.4 Elaborarea și aplicarea preparatelor bioinsecticide pe baza tulpinii de funghi *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 4.7) iar al doilea pas a contribuit la elaborarea tehnologiei de producere a preparatului insecticid pe baza tulpinii *B. bassiana* CNMN-FE-01 (figura 4.8).

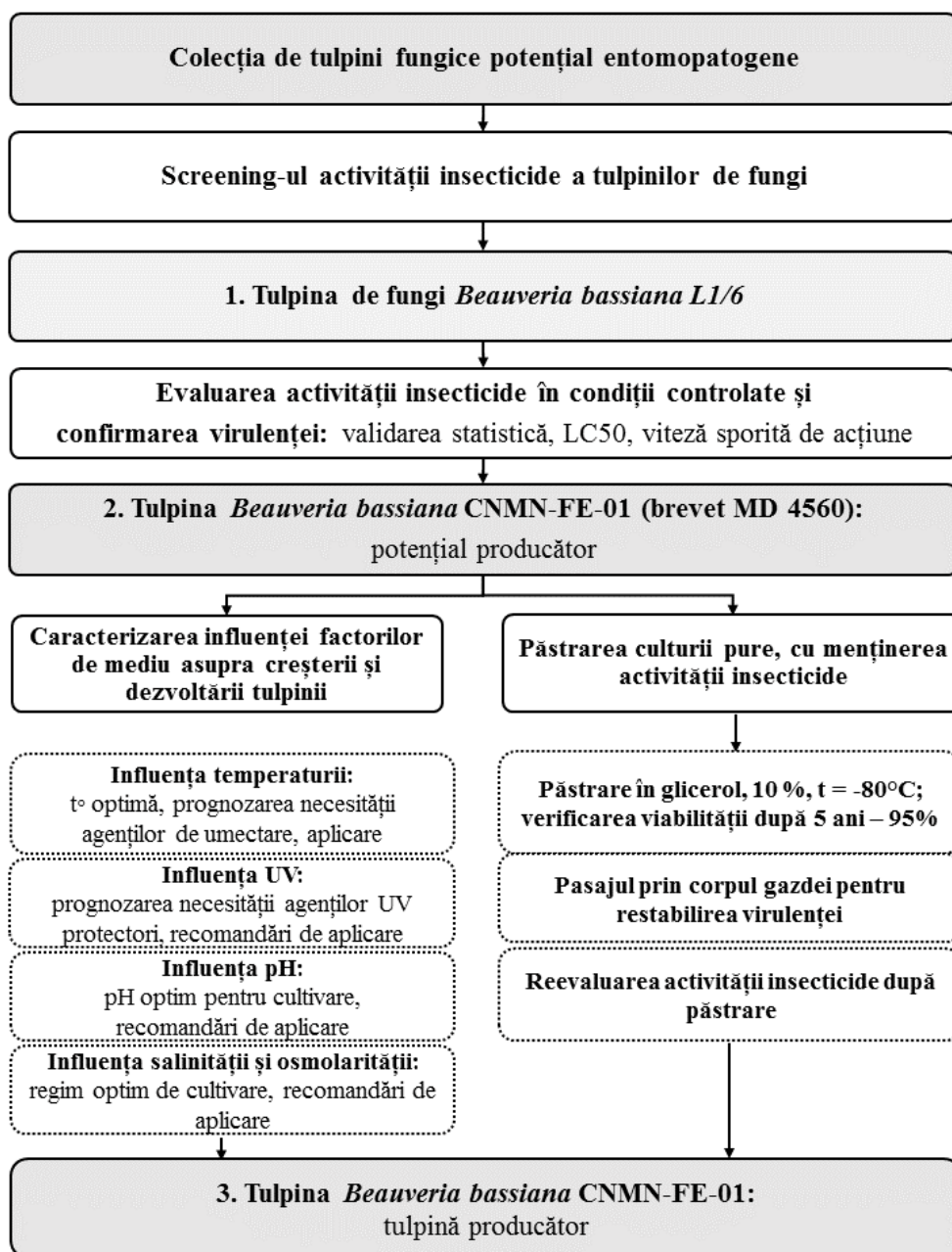


Fig. 4.7. Etapele procesului de selectare a tulpinii producător

În rezultatul investigațiilor au fost elucidate caracteristica producătorului, caracteristica mediului nutritiv și condițiile de cultivare, condițiile de păstrare și menținere a virulenței. Fluxul tehnologic de producere a preparatelor insecticide naturale pe baza tulpinilor autohtone de fungi poate fi rezumat la 5 etape (figura 4.8):

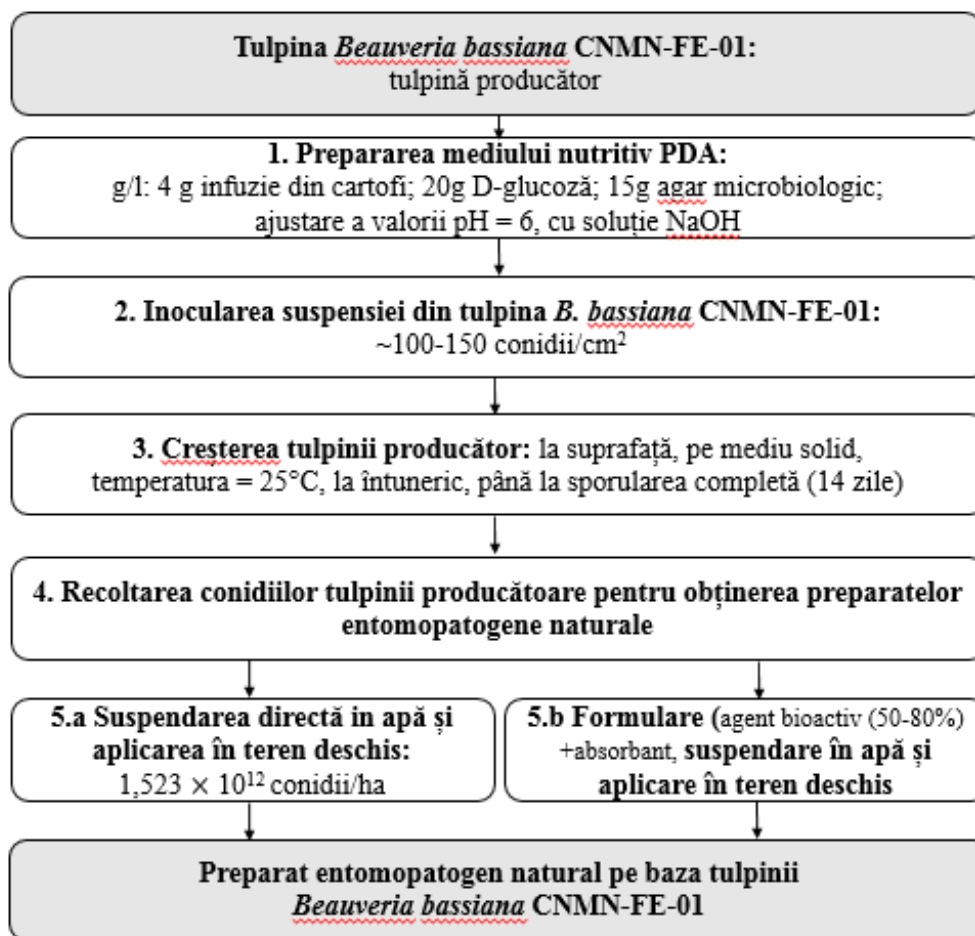


Fig. 4.8. Tehnologia de producere a preparatului insecticid pe baza tulpinii *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01

Au fost evaluate costurile minime asociate producerii conidiilor fungice pentru a fi aplicate pe o suprafață de 1 ha fără a lua în calcul costurile de personal, locațiune, ș.a. 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 ș.a. (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 (Skinner, Parker, Kim 2014). 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 aderenței 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, 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. 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 (Lopes, Faria 2019).

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 micromiceta și condițiile de mediu favorizează supraviețuirea și germinarea acesteia înainte, în timpul și după aplicare. Principalele metode de aplicare a micromicetelor sunt scufundarea plantei sau rădăcinilor, pulverizarea foliară și tratarea solului. 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

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. Tulpina nou izolată *Beauveria bassiana* L1/6 (CNMN-FE-01) posedă o activitate insecticidă sporită asupra speciei *Sitona lineatus* L., concentrația de $0,969 \times 10^6$ conidii/ml cauzează mortalitate de 100% la a 5-a zi de la tratament ($LC_{50} = 1,127 \times 10^4$ conidii/ml). Tulpina de fungi propusă *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01 posedă o activitate insecticidă pronunțată asupra coleoptelor curculionide și poate fi utilizată în calitate de agent bioactiv al preparatelor insecticide. Tulpina a fost extrasă din mediul natural, nu este patogenă pentru plante și 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. În rezultatul

cercetărilor 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. Au fost elucidate condițiile optime de cultivare ($t^{\circ} = 25^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 6$) și păstrare a tulpinii cu menținerea în timp a proprietăților de interes biotehologic (virulență, viabilitate, cantitate de conidii produse). A fost determinat faptul, că viteza de creștere radială nu este afectată semnificativ de expunerea la radiații UV cu $\lambda=312\text{ nm}$. 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. 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 aproximativ 6,6 și mai mult ori la valori ale concentrației de NaCl mai mari de 3%. Concentrația optimă pentru germinarea conidiilor este 0,006 M NaCl, iar concentrațiile de 0,06 și 0,6 M NaCl sunt hipertonică, reducând cantitatea de conidii și viabilitatea acestora. 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 integrarea preparatului în sistemele de producție agricolă.

CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI

Rezultatele obținute în cadrul tezei de doctorat „*Controlul biologic al Coleoptelor 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*, constă din 55 tulpini fungice, ce aparțin la 23 specii și 3 filumuri (Ascomycota, Basidiomycota și Mucormycota), dintre care 8 tulpini sunt fitopatogeni (*Penicillium polonicum*, *Rhizopus stolonifer*, *Fusarium equiseti*, *F. oxysporum*, *F. tricinctum*, *Trichothecium roseum*, *Cladosporium cladosporoides*, *Acremonium strictum* și *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).
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).
 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 $0,969 \times 10^6$ 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, Toderas 2018) (Cap. 4).
 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).
 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 $0,962 \times 10^8$ conidii/cm² la valori optime ale temperaturii (25°C) și pH (6); menținerea virulenței la păstrarea în eprubete de 2-5 ml cu glicerol, 10%, la $t^\circ = -80^\circ\text{C}$, timp de 5 ani, și posibilitatea de menținere în frigider a culturii starter, la $t^\circ = 4^\circ\text{C}$, evitând reinocularea repetată, timp de 1 an, cu păstrarea virulenței și viabilității (Cap. 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 irigației cu apă provenită din pânza freatică.
3. Pentru a evita impactul negativ al temperaturilor $\geq 30^{\circ}\text{C}$ 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 \geq 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 SELECTIVĂ

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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>
5. BURGESS, H.D. 1998. Formulation of mycoinsecticides. In: BURGESS, 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.
6. 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
7. 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*. 47(5): 2120-4. e- ISSN 1520-5118, ISSN: 0021-8561.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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
12. 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>

13. 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>
14. 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.
15. HOOG de, G.S. 2000. *Atlas of clinical fungi* ed. 2. p 523. Amer Society for Microbiology: 1126 p.
16. Hotărârea Guvernului Republicii Moldova nr. 123 din 02.02.2018 cu privire la aprobarea Programului național de protecție integrată a plantelor pentru anii 2018-2027 și Planului de acțiuni 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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-ISSN 978-0-12386-9-005, ISBN 978-0-12386-8-992.
24. 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>
25. 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>

26. 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.
27. **MOLDOVAN, A.** 2012. Studii preliminare privind microflora fungică a speciei *Sitona lineatus* L. (Coleoptera, Curculionidae) pe teritoriul Republicii Moldova. In: *Culegerea Analele Științifice ale Universității de Stat din Moldova, Științe ale naturii și exacte*, pp.15-18. ISSN 1857-3665, ISBN 978-9975-71-284-2
28. **MOLDOVAN, A.** 2014. Studii preliminare privind microflora fungică a speciei *Hypera postica* (Gyll.) (Coleoptera, Curculionidae) pe teritoriul Republicii Moldova. In: *Rezumatelile comunicărilor. Științe ale naturii și exacte. Sesiunea națională de comunicări științifice studențești, 13-14 mai 2014, Chișinău, Republica Moldova*, pp. 13-15. ISBN 978-9975-71-509-6.
29. **MOLDOVAN, A.** 2018. Managementul dăunătorilor, bolilor și 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.
30. **MOLDOVAN, A.** 2019. Controlul biologic al Coleoptelor Curculionoide (Coleoptera, Curculionoidea): probleme, realizări și perspective. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții*, vol. 337, nr. 1, pp.131-142. ISSN 1857-064X.
31. **MOLDOVAN, A., MUNTEANU-MOLOTTIEVSKIY, N.** 2017. Evidențierea microflorei fungice a coleoptelor 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
32. **MOLDOVAN, A., MUNTEANU-MOLOTTIEVSKIY, 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.
33. **MOLDOVAN, A., MUNTEANU-MOLOTTIEVSKIY, N., TODERAȘ, I.** 2018. *Tulpină de fungi Beauveria bassiana – bioinsecticid pentru combaterea coleoptelor 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. Nr. depozit a 2017 0057. Data depozit 23.05.2017. Publicat 30.04.2018. In: *BOPI*, vol. 4, pp. 51-52.
34. **MOLDOVAN, A., TODERAS, I., LECLERQUE, A., MUNTEANU-MOLOTTIEVSKIY, 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.

35. **MOLDOVAN, A.,** TODERAS, I., MUNTEANU-MOLOTIEVSKIY, N. 2018. Virulence of *Beauveria bassiana* against pe leaf weevil *Sitona lineatus* L. (Coleoptera Curculionidae) 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.
36. 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], vol. 5, pp. 193-199 [citat 17.07.2018]. Disponibil: <https://doi.org/10.1080/09583159550039918>
37. 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>
38. OERKE, E.C. 2006. Centenary review, crop losses to pests. In: *The Journal of Agricultural Science*, 144, pp. 31-43. e-ISSN 1469-5146, ISSN 0021-8596.
39. 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.
40. 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.
41. 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. e-ISSN 2353-074X, ISSN 0001-625X (anulat din 2015).
42. 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.
43. 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.
44. 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>
45. 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.

46. 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.
47. 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.
48. 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.
49. 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, pp. 171-220. eBook ISBN 978-0-12384-9-854, ISBN 978-0-12384-9-847.
50. 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.
51. YUCEL, B., GOZUACIK, C., GENCER, D., DEMIR, I., DEMIRBAG, Z. 2018. Determination of fungal pathogens of *Hypera postica* (Gyllenhal) (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>
52. 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.

LISTA PUBLICAȚIILOR LA TEMA TEZEI

Monografii

1. **MOLDOVAN, A.** Managementul dăunătorilor, bolilor și buruienilor. In: CIUBOTARU, V., et al. *Manualul de instruire pentru formatori și fermieri: Sistemul de Agricultură Ecologică*. Chișinău: 2018. pp 56-66. ISBN 978-9975-89-095-3.

Articole în diferite reviste științifice

- *în reviste internaționale cotate ISI și SCOPUS*

2. MUNTEANU, N. V., DANISMAZOGLU, M., **MOLDOVAN A. I.**, TODERAS I. K., NALCACIOGLU, R., DEMIRBAG, Z. The first study on bacterial flora of pest beetles *Sciaphobus squalidus*, *Tatianaerhynchites aequatus* and *Byctiscus betulae* in the Republic of Moldova. In: *Biologia*. 2014, vol. 69, nr. 5, pp. 681-690. ISSN 0006-3088 (IF: 0.728).

- *în reviste din străinătate recunoscute*

3. MUNTEANU, N., BACAL, S., **MOLDOVAN, A.**, MALEVANCIUC, N., TODERAS, I. Beetle Communities of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) in the Republic of Moldova. In: *APCBEE Procedia*. 2014, nr. 8, pp. 21-26. ISSN 2212-6708.

- *în reviste din Registrul Național al revistelor de profil, categoria B*

4. **MOLDOVAN, A.** Controlul biologic al Coleopterelelor Curculionoide (Coleoptera, Curculionoidea): probleme, realizări și perspective. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții*. 2019, vol. 337, nr. 1, pp.131-142. ISSN 1857-064X.
5. МУНТЯНУ, Н., МАЛЕВАНЧУК, Н., ТОДЕРАШ, Л., **МОЛДОВАН, А.**, БАКАЛ, С. Распределение и биологические особенности развития вида *Sitona lineatus* (Coleoptera: Curculionidae) в Республике Молдова. In: *Buletinul Academiei de Științe. Științele vieții*. 2012, vol. 318, nr. 3, pp. 131-138. ISSN 1857-064X.

Articole în culegeri științifice

- *culegeri internaționale*

6. **MOLDOVAN, A.**, TODERAS, I., LECLERQUE, A., MUNTEANU MOLOTIEVSKIY, N. Isolation and identification of fungal community of alfalfa pest weevils (Coleoptera: Curculionidae) in the Republic of Moldova. In: *IOBC-WPRS Bulletin*. 2017, vol. 129, pp. 70-73. ISBN 978-92-9067-314-9.

- *culegeri de lucrări ale conferințelor internaționale*

7. **MOLDOVAN, A.**, MUNTEANU-MOLOTTIEVSKIY, N., TODERAS. I. Studii preliminare privind agenții de control biologic al dăunătorilor tomatelor în Republica Moldova. In: *Materialele Simpozionului Internațional „Ecologia funcțională a animalelor” consacrat aniversării a 70 de ani de la nașterea academicianului Ion Toderaș*, 21 septembrie 2018, Chișinău, Republica Moldova, pp. 287-289. ISBN 978-9975-3159-7-5.
8. **MOLDOVAN, A.**, TODERAS, I., MUNTEANU-MOLOTTIEVSKIY, N. Noi agenți bacterieni de control biologic al insectelor dăunătoare în Republica Moldova. In: *Materialele Simpozionului Internațional „Actual Problems of Zoology and Parasitology: Achievements*

and Prospects”, 13 octombrie 2017, Chisinau, Republica Moldova, pp. 303-309, ISBN 978-9975-66-590-2.

9. **MOLDOVAN A.** Perspective de dezvoltare a agenților bacterieni de control biologic al insectelor dăunătoare în Republica Moldova. In: *Materialele Simpozionului Internațional „Actual Problems of Zoology and Parasitology: Achievements and Prospects”*, 13 octombrie 2017, Chisinau, Republica Moldova, pp. 310-312. ISBN 978-9975-66-590-2.

- ***culegeri naționale***

10. **MOLDOVAN, A.** Studii preliminare privind microflora fungică a speciei *Sitona lineatus* L. (Coleoptera, Curculionidae) pe teritoriul Republicii Moldova. In: *Culegerea Analele Științifice ale Universității de Stat din Moldova, Științe ale naturii și exacte*. 2012, pp.15-18. ISSN 1857-3665. ISBN 978-9975-71-284-2.

- ***culegeri de lucrări ale conferințelor naționale***

11. **MOLDOVAN, A., MUNTEANU-MOLOITIEVSKIY, N.** 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.

12. **MUNTEANU MOLOITIEVSKIY, N., BACAL, S., MOLDOVAN, A.** 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. ISBN 978-9975-53-508-3.

13. **MOLDOVAN, A.** Studii preliminare privind microflora fungică a speciei *Hypera postica* (Gyll.) (Coleoptera, Curculionidae) pe teritoriul Republicii Moldova. In: *Rezumatele comunicărilor. Științe ale naturii și exacte. Sesiunea națională de comunicări științifice studențești*, 13-14 mai 2014, Chișinău, Republica Moldova, pp. 13-15. ISBN 978-9975-71-509-6.

Materiale/ teze la forurile științifice

- ***Conferințe internaționale (peste hotare)***

14. **MOLDOVAN, A., MUNTEANU-MOLOITIEVSKIY, N.** 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.

15. **MOLDOVAN, A., TODERAS, I., LECLERQUE, A., MUNTEANU MOLOITIEVSKIY, N.** Isolation and identification of fungal community of alfalfa pest weevils (Coleoptera: Curculionidae) in the Republic of Moldova. In: *Book of abstracts. The 16th Meeting of the IOBC-WPRS Working Group „Microbial and Nematode Control of Invertebrate Pests”*, June 11-15, 2017, Tbilisi, Georgia, p. 66. ISBN 978-9941-26-018-6.

16. MUNTEANU, N. V., MALEVANCIUC, N. V., **MOLDOVAN, A. I.**, TODERAȘ, I. K. Three new strains of *Bacillus thuringiensis* as potential biocontrol agent against pest weevils in the Republic of Moldova. In: *Book of abstracts. International Congress on Invertebrate Pathology and Microbial Control & 44th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology*, 2011, Nova Scotia, Canada, pp. 24 - 25.

• **Conferințe internaționale în republică**

17. **MOLDOVAN, A.**, TODERAS, I., MUNTEANU-MOLOTTIEVSKIY, N. Virulence of *Beauveria bassiana* against pe leaf weevil *Sitona lineatus* L. (Coleoptera Curculionidae) 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.
18. **MOLDOVAN, A. I.**, MALEVANCIUC, N.V. Date preliminare privind metode de combatere a speciei *Sitona lineatus* L. (Coleoptera, Curculionidae) dăunător al culturilor de *Fabaceae*. In: *Scientific abstracts. International Conference of Young Researchers, IXth edition*, 2011, Chisinau, Republic of Moldova, p. 27. ISBN 978-9975-4224-7-5.

Brevete de invenții, patente, certificate de înregistrare, materiale la saloanele de invenții

• **Brevet de invenție**

19. **MOLDOVAN, A.**, MUNTEANU-MOLOTTIEVSKIY, N., TODERAȘ, I. 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. Nr. depozit a 2017 0057. Data depozit 23.05.2017. Publicat 30.04.2018. In: *BOPI*. 2018, vol. 4, pp. 51-52.
20. MUNTEANU, N., TODERAȘ, Ion, **MOLDOVAN, A.**, MALEVANCIUC, N., TODERAȘ, L., BACAL, S., RAILEAN, N. Tulpină de bacterii *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* – bioinsecticid pentru combaterea lepidopterelor din genul *Lymantria*. Brevet de invenție MD 4304. Int. Cl: C12N 1/20 (2006.01); C12R 1/07 (2006.01); A01N 63/00 (2006.01); A01P 7/04 (2006.01). Institutul de Zoologie al Academiei de Științe a Moldovei. Nr. depozit a 2013 0057 Data depozit 15.03.18. Publicat 30.09.2014. In: *BOPI*. 2014, vol. 9, pp. 25-26.

• **Materiale la saloanele de invenții**

21. **MOLDOVAN, A.**, TODERAȘ, I., MUNTEANU-MOLOTTIEVSKIY, N.. Strains of *Bacillus thuringiensis* and *Beauveria bassiana* as bioinsecticides against pest insects. In: *Catalogul oficial al Expoziției Internaționale de Inventică „INVENTICA 2019”*, Ediția a 23-a, 26-28 iunie, 2019, Iași, România. (*Diplomă de Excelență și Medalie*)
22. **MOLDOVAN, A.**, MUNTEANU-MOLOTTIEVSKIY, N., TODERAȘ, I. Strain of *Beauveria bassiana* fungi as bioinsecticide against weevils. In: *Catalogul oficial al Salonului Internațional al Inovării și Cercetării Științifice Studentești „Cadet INOVA '19”*, Ediția a IV-a, 11-13 aprilie 2019, Sibiu, România, pp. 230-231 ISSN 2501-3157. (*Diploma și Medalia de argint*)
23. **MOLDOVAN, A.**, MUNTEANU-MOLOTTIEVSKIY, N., TODERAȘ, I. Strain of *Beauveria bassiana* fungi as a bioinsecticide against weevils. In: *Catalogul Salonului Internațional de*

- Inventică și Educație Creativă pentru Tineret, ICE-USV (Innovation and Creative Education)* – ediția a II-a, 7-9 iunie 2018, Universitatea „Ștefan cel Mare”, Suceava, România, pp. 24-26. ISBN 978-606-8992-01-3. (*Diploma și Medalia de aur Diploma și Medalia Euroinvent*)
24. **MOLDOVAN, A.**, MUNTEANU-MOLOTTIEVSKIY, N.A, TODERAȘ, I. Tulpină de funghi *Beauveria bassiana* - bioinsecticid pentru combaterea Coleopternelor Curculionide. In: *Catalogul oficial al Expoziției Internaționale Specializate "INFOINVENT"*, ediția a XV-a, 15-18 noiembrie 2017, Chișinău, Republica Moldova, pp. 44-45.
 25. MUNTEANU, N., TODERAȘ, I., MOLDOVAN, A., MALEVANCIUC, N., TODERAȘ, L., BACAL, S., RAILEAN, N. Tulpini de bacterii *Bacillus thuringiensis* - bioinsecticide pentru combaterea coleopternelor și lepidopternelor. In: *Catalogul oficial al Expoziției Internaționale Specializate „INFOINVENT”*, ediția a XIV-a, 25-28 noiembrie 2015, Chișinău, Republica Moldova, pp. 45-46. (*Diplomă și Medalie de Bronz*)
 26. TODERAȘ, I., MOLOTTIEVSKIY MUNTEANU, N., **MOLDOVAN, A.**, SASANELLI, N., ZIHNI, D., BACAL, S., RAILEAN, N. *Bacillus thuringiensis* - bioinsecticide against coleopteran and lepidopteran pests. In: *Catalog of Belgian and International Trade Fair for Technological Innovation „Eureka”*, 19-21 noiembrie 2015, Bruxelles, Belgia. (*Diplomă și Medalie de Aur; Diplomă și premiu, Award of the National Authority for Scientific Research and Innovation, Romania*)
 27. TODERAȘ, I., MUNTEANU, N., MOLDOVAN, A., MALEVANCIUC, N., TODERAȘ, L., BACAL, S., RAILEAN, N. *Bacillus thuringiensis* strains of bacteria – a bioinsecticide for combating coleopters and lepidopters. In: *Catalog of 40th International Invention Show, 11th Invention and Prototype Show and Student bussiness plan competition „Budi Uzor Inova”*, 5-7 november 2015, Croatia, p. 136. (*Diplomă și Medalie de Aur; Diplomă și Medalie de Aur i-ENVEX Gold Medal AWARD*)
 28. MUNTEANU, N., TODERAȘ, I., **MOLDOVAN, A.**, MALEVANCIUC, N., TODERAȘ, L., RAILEAN, N. Bioinsecticide împotriva dăunătorilor din tulpina *Bacillus thuringiensis*. In: *Catalogul Salonului de Invenții și Inovații „Inventika”*, 15 - 18 octombrie 2014, București, România. (*Diplomă și Medalie de Aur*)
 29. TODERAȘ I., GULEA A., MUNTEANU N., **MOLDOVAN A.**, MALEVANCIUC N., TODERAȘ L., RAILEAN N. ȘI DUMBRAVEANU D. *Bacillus thuringiensis* strain bioinsecticide against pests in fruit trees and crops. In: *Catalogul oficial al Salonului de Inventică din Geneva*, ediția a 42-a, 2 - 6 aprilie 2014, Geneva, Elveția. (*Diplomă și Medalie de Aur, Diplomă și medalie oferite de Ministerul Educației Naționale a României*)
 30. MUNTEANU, N., TODERAȘ, I., **MOLDOVAN, A.**, MALEVANCIUC, N., TODERAȘ, L., RAILEAN N. *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide against pest beetles. In: *Catalogul oficial al Salonului de Inventică din Bruxelles Innova „Eureka”*, 14 - 16 noiembrie 2013, Bruxelles, Belgia. (*Diplomă și Medalie de Aur*)
 31. MUNTEANU, N. și **MOLDOVAN, A.** Tulpină de bacterii *Bacillus thuringiensis* bioinsecticid pentru combaterea dăunătorilor pomilor fructiferi și culturilor agricole. In: *Catalogul oficial al Expoziției Internaționale Specializate „INFOINVENT”*, ediția a XIII-a, 19 - 22 noiembrie 2013, Chișinău, Republica Moldova, p.180. (*Diplomă și Medalie de Aur, Diplomă și Medalie de Aur a Organizației Mondiale a Proprietății Intelectuale „Best Young Inventor”*)

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 procedurii de obținere a preparatului insecticid și recomandărilor de aplicare în ecosistemele agricole.

Noutatea și originalitatea științifică: 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* și *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 procedurii 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 куркулионидных 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 куркулионидных 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 куркулионидными 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, 2020.**

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 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 *S. 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.

MOLDOVAN ANNA

**CONTROLUL BIOLOGIC AL COLEOPTERELOR CURCULIONOIDE
DĂUNĂTORI AI CULTURILOR AGRICOLE**

167.01 – BIOTEHNOLOGIE, BIONANOTEHNOLOGIE

Rezumatul tezei de doctor în științe biologice

Aprobat spre tipar: 11.01.2021 Formatul hârtiei 60×84 1/16

Hârtie ofset. Tipar ofset. Tirajul 50 ex.

Coli de tipar: 1,16

Tipografia „REAL PRINT”
str. M. Dosoftei 115A, Chișinău, MD-2004, Republica Moldova