

VIRIN – ABB-3 – O PÂRGHIE EFICIENTĂ A AGRICULTURII ECOLOGICE**Aurelia STÎNGACI***Institutul Protecția Plantelor și Agriculturii Ecologice al AȘM*

Advancement of strategies of ecological agriculture it is lost in thought without application of biological preparations occupy a separate place among the other biological means for plant protection. One important element in the technological process of insecticide virus production is an elaboration of a new preparation form of the virus insecticides as well as their commercialization. This work contains testing of biological preparation Virin – ABB-3 – for elimination of *Hyphantria cunea Drury* in laboratory and field conditions. The preparation is based on viruses of nuclear polyhedrosis and granules with cumulative and synergetic action. Presently the investigation are being carried out the elaboration of other virus insecticide for control in the systems of integrated plant protection of different agricultural, ornamental and forest crops.

Artificializarea interrelațiilor din cadrul biocenozelor agricole și silvice, influența negativă a unor factori climatici produc dereglări în lanțurile trofice, care favorizează înmulțirea populațională a insectelor dăunătoare. Reducerea densității dăunătorilor nu se poate realiza fără utilizarea unei game largi de preparate biologice.

De aceea, știința și practica în ultimii ani manifestă un interes tot mai mare față de metoda biologică de combatere a unui mare număr de organisme nocive. Lărgirea volumului de cercetări științifice și de aplicare în practică a metodelor biologice de protecție a plantelor se observă în toată lumea. Aplicarea metodelor biologice de protecție biologică a plantelor și a produselor biotehnologice se confruntă cu absența sortimentului necesar de mijloace biologice [1].

Un rol important în combaterea biologică îl au produsele microbiologice care au progresat substanțial. Aplicarea baculovirusilor entomopatogeni reprezintă un vast și variat număr de agenți patogeni care produc în natură epizootii pe suprafețe mari. Baculovirusii sunt propuși ca un mijloc biologic în combaterea insectelor nocive. Aplicarea pe scară largă a virusilor, care și-au demonstrat avantajele lor economice față de alte metode microbiologice de protecție biologică a plantelor, poate deveni o realitate în producerea insecticidelor virotice [2-7].

Baculovirusii sunt cunoscuți la mai bine de 600 de reprezentanți ai diferitelor ordine și familii de insecte [8] și aproximativ la 90% din 34 familii diferite de Lepidoptere [9].

Cercetările au demonstrat că larvele *Hyphantria cunea* se infectează cu două feluri de virusi din familia *Baculoviridae*: Nucleopolyhedrovirus (NPV) și Granulovirus (GV) [10-12]. Nucleopolyhedrovirusul formează supraviriocapsizi (SPVC) cu dimensiunile $1,2 \times 0,5$ mkm (în interiorul cărora virioni cu dimensiunile 220×37 nm) SPV GV au o formă ovală-alungită $0,3 \times 0,5$ mkm (în interiorul cărora virioni cu dimensiunile 272×26 nm). SPVC uneori formează agregate mari [13-15]. Baculovirusii sunt vibrioni asamblați în formațiuni proteice SPVC, pătrund în corpul insectelor prin ingestie, ajung în intestinul mediu și, sub acțiunea enzimelor, se proteinizează și eliberează vibrionii, care se dezvoltă în celulele epiteliale și pe care le distrug [16].

Nu mai puțin importantă este și soluționarea problemelor ce apar la folosirea biopreparatelor pe bază de microorganisme în protecția biologică a plantelor. Rezultate interesante se obțin la aplicarea biopreparatelor pe bază de virusi ai insectelor dăunătoare, care provoacă epizootii pe arealuri mari cu unele legități de manifestare a efectului de postacțiune [17].

Un element important al procesului tehnologic de producere a insecticidelor virotice este elaborarea formei preparative. Pentru aceasta este necesară determinarea calității ingredientelor presupuse ale insecticidelor virotice, care trebuie să asigure o stabilitate înaltă la acțiunea razelor ultraviolete, dispersitatea și stabilitatea suspensiei formate, lipirea pe frunze și menținerea biologică activă a preparatului [18].

Calea alternativă de producere a insecticidelor baculovirotice este reprezentată de reproducerea virusilor „*in vitro*” în cultura celulară sau tisulară, care deschide posibilități nelimitate în ceea ce privește dirijarea proceselor de producere, standardizare și aplicare a preparatelor. Au fost obținute diverse culturi tisulare ale diferitelor țesuturi din insectele lepidoptere care se folosesc pe larg în calitate de medii pentru reproducerea baculovirusilor în SUA, Marea Britanie, Germania, Franța, Japonia ș.a. Producerea „*in vitro*” a biomasei

baculovirale, deși are un șir de avantaje, deocamdată nu poate concura cu producerea preparatelor baculovirale în baza preparatelor „*in vivo*”. Preparatele obținute „*in vitro*” nu pot concura cu cele chimice, deoarece sunt destul de costisitoare. Extrem de important este că în acest caz rămân un șir de probleme, care trebuie de rezolvat, și anume: ce țin de elaborarea formelor preparative [19].

Noi propunem metode noi și perfecționarea celor existente de identificare a mijloacelor tehnologice, ceea ce va contribui la avansarea tuturor activităților în acest domeniu important de activitate. Acestea vor fi utile nu doar la elaborarea unor procedee concrete, ci vor îmbunătăți considerabil cunoașterea particularităților mijloacelor tehnologice și vor ameliora starea ecologică din Republica Moldova.

Material și metode

Au fost utilizate larvele de *Hyphantria cunea Drury*, care au fost colectate din diferite regiuni ale orașului Chișinău și din diferite localități ale Moldovei.

Determinarea larvelor bolnave s-a efectuat după simptomele respective, apoi cu ajutorul microscopului.

Infectarea larvelor s-a efectuat cu suspensii virale de doze 10^6 SPVC la un individ. Observațiile le-am început în ziua a treia după infectare. Eficiența preparatului viral s-a determinat după formula Abbot, care prevede mortalitatea naturală a insectelor:

$$E_{ab} = \frac{M_o - M_c}{100 - M_c} \cdot 100,$$

unde: E_{ab} – indicatorul mortalității;

M_o – numărul de larve moarte în experiență;

M_c – numărul de larve în control.

Evidența mortalității larvelor *H.cunea* se va efectua până în ziua a 15-a. Determinarea concentrației VPN se va efectua cu ajutorul camerei Goreaev, după formula:

$$T = \frac{\Sigma \text{ pol. in } 100 \text{ patrate mici } 4 \times 10}{100} \cdot K \text{ sau } T = 10^5 a \times b,$$

unde: T – titrul virușilor;

K – deluarea suspensiei virale.

Pentru determinarea concentrației VG s-a folosit metoda picăturii strivite. Concentrația suspensiei virale s-a determinat după formula:

$$T = \frac{A \times 5,76 \times 10^6 \times K}{S \times 0,01},$$

unde: T – concentrația VG în 1 ml de suspensie,

A – numărul de granule într-un pătrat;

$5,76 \times 10^6$ – suprafața lamelei 24x24 mm;

K – gradul de diluări;

S – suprafața pătratului linzei oculare;

0,01 – volumul suspensiei.

Pentru ocular 100 x formula poate fi:

$$T = 5,76 \times 10^6 \times A \times K$$

Prelucrarea statistică a datelor se va efectua prin metoda lui Strelkov. Testarea sușelor identificate și re-combinate ale insectelor de *Hyphantria cunea Drury* s-a efectuat pe larve specifice ale insectelor de vârstă a doua, crescute pe medii selective de cultură. Pentru aceasta s-a aplicat metoda diluțiilor succesive de la 10 până la 1000 particole virale pentru o larvă.

Larvele au fost hrănite cu mediu infectat, iar ulterior s-au menținut la temperatura 26-28°C. Doza letală s-a determinat până la 200 ore din momentul infectării. Timpul letal s-a determinat la infectarea larvelor cu doză sporită de particole virale (250 poliedre la o larvă). Testarea în condiții de laborator și în câmpul de experiență s-a efectuat în 4 repetiții respectiv randomizate, în conformitate cu cerințele generale de acest gen [20,21].

Rezultate și discuții

În prezent se recomandă preparatul ecologic pur Virin –ABB-3 pentru combaterea *H.cunea* în condiții de laborator și de câmp. Preparatul a fost constituit în baza virusurilor din familia *Baculoviridae* și conține un amestec de baculovirusi nativi izolați și identificați din larvele bolnave ale dăunătorului. Virin – ABB-3 constituie un amestec al virusului granulozei și poliedrozei nucleare și este destinat pentru combaterea larvelor de vârste mici ale Omizii păroase a dudului.

Scopul acestei lucrări este folosirea preparatului ecologic pur Virin – ABB-3 ce se bazează pe cercetările durabile ale proprietăților, cum sunt specificitatea, perioada latentă și virulența virusurilor.

Producerea preparatelor baculovirale necesită elaborarea formelor preparative care ar asigura păstrarea activității biologice a patogenului, precum și indicii tehnologici necesari la folosirea lor în combaterea *H.cunea*. Rezultatele infectării larvelor de *Hyphantria cunea Drury* cu Virin – ABB-3 folosind diferite forme preparative sunt prezentate în Tabelul 1.

Tabelul 1**Infectarea populațiilor de *Hyphantria cunea Drury* cu baculovirusi folosind diferite forme preparative**

| Variante | Specia de arbore | Numărul de larve | Doza, ml | Vârsta | Mortalitatea după ABOT | |
|--|------------------|------------------|-----------------|--------|------------------------|-------|
| | | | | | Ex. | % |
| 1. Suspensie virală + amestecată cu melasă | Măr | 100 | 10 ⁶ | II-III | 79 | 75,58 |
| | Arțar | 100 | 10 ⁶ | II-III | 69 | 63,95 |
| | Dud | 100 | 10 ⁶ | II-III | 85 | 84,2 |
| 2. Suspensie virală + tărâță de grâu (1:1) | Măr | 100 | 10 ⁶ | II-III | 79 | 73,95 |
| | Arțar | 100 | 10 ⁶ | II-III | 75 | 74,2 |
| | Dud | 100 | 10 ⁶ | II-III | 58 | 52,27 |
| 3. Suspensie virală + făină de semințe de struguri (1:1) | Măr | 100 | 10 ⁶ | II-III | 89 | 87,21 |
| | Arțar | 100 | 10 ⁶ | II-III | 100 | 99,75 |
| | Dud | 100 | 10 ⁶ | II-III | 79 | 76,13 |
| 4. Suspensie virală + extract de porumb (1:10) | Măr | 100 | 10 ⁶ | II-III | 49 | 42,04 |
| | Arțar | 100 | 10 ⁶ | II-III | 64 | 58,13 |
| | Dud | 100 | 10 ⁶ | II-III | 80 | 78,9 |
| 4. Control (apă distilată) | Măr | 100 | 10 ⁶ | II-III | 1 | - |
| | Arțar | 100 | 10 ⁶ | II-III | 2 | - |
| | Dud | 100 | 10 ⁶ | II-III | 2 | - |

De menționat că din diferite variante cele mai optime rezultate a dat suspensia virală + făină de semințe de struguri (1:1), când mortalitatea atingea: la dud – 76,13%; la arțar – 99,75%, la măr – 87,21%.

Utilizarea preparatului are loc prin tratarea pomilor atacați de către larvele Omizii păroase a dudului de toate generațiile. Tratamentul se aplică pe parcursul întregii perioade de vegetație la temperatura aerului nu mai joasă de 20°C.

Cele mai favorabile ore de stropire sunt orele de seară, când este exclusă acțiunea negativă a radiației solare asupra particulelor virale. Tratamentele se efectuează în funcție de densitatea populațiilor dăunătorului, de pragul de dăunare a larvelor din prima sau a doua generație.

Preparatul este compatibil cu alte preparate microbiologice sau pesticide și poate fi utilizat în combinație cu lansări de entomofagi respectând perioada de așteptare, care este de o singură zi.

A fost organizată și efectuată colectarea materialului biologic pe masivele silvice vârsta I-II pentru acumularea masei biologice și eclozarea pontelor pentru colectarea larvelor de diferite vârste. Acestea au fost

puse pe diferite buchete de dud, arțar, nuc, vișin, sorb și au fost reinnoite sușele de VG și VPN. Rezultatele scontate sunt prezentate în Tabelul 2.

Tabelul 2

Infecțarea populațiilor de *Hyphantria cunea Drury* cu Virin – ABB-3 pe diferite specii de plante

| Denumirea plantei | Nr. de omizi | Concentrația | Numărul larvelor moarte după... zile | | | | | Procentul mortalității | | | Eficiența biologică după Abbot, la ziua a 15-a, % |
|-------------------|--------------|-----------------|--------------------------------------|----|----|----|----|------------------------|--------------|--------------|---|
| | | | 3 | 5 | 7 | 10 | 15 | la a 5-a zi | la a 10-a zi | la a 15-a zi | |
| Dud | 40 | 10 ⁶ | 0 | 12 | 19 | 34 | 39 | 30,0 | 85,0 | 97,5 | 97,3 |
| Arțar | 40 | 10 ⁶ | 0 | 8 | 16 | 29 | 38 | 20,0 | 72,0 | 95,5 | 95,2 |
| Nuc | 40 | 10 ⁶ | 0 | 6 | 9 | 28 | 38 | 15,0 | 70,0 | 85,0 | 84,2 |
| Vișin | 40 | 10 ⁶ | 0 | 5 | 10 | 27 | 32 | 12,0 | 65,0 | 80,0 | 78,9 |
| Sorb | 40 | 10 ⁶ | 0 | 2 | 5 | 16 | 30 | 5,0 | 40,0 | 75,0 | 73,8 |
| Control | 40 | 10 ⁶ | 0 | 0 | 2 | 4 | 4 | 0 | 5,0 | 5,0 | - |

Rezultatele obținute indică la diferența procentului mortalității larvelor infectate. Cel mai înalt nivel este la dud (97,5%); cel mai mic – la sorb (75,0%). Eficiența biologică a preparatului în a 15-a zi după Abbot la dud este de 97,3% și la sorb de 73,8%. Mortalitatea în control la a 10-a – a 15-a zi este de 5%.

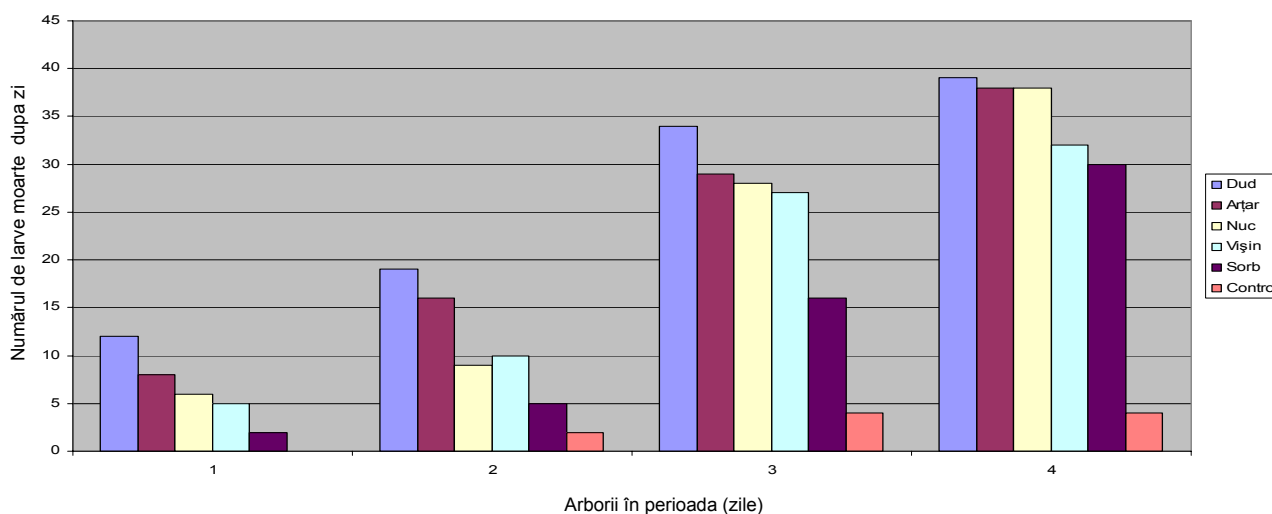


Fig.1. Infecțarea populațiilor de *Hyphantria cunea Drury* Virin – ABB-3 pe diferite specii de plante.

Concluzii

În condițiile agravării crizei ecologice Virin – ABB-3 reprezintă un preparat de perspectivă pentru aplicarea în protecția plantelor. În baza rezultatelor obținute putem constata că baculovirusii în biocenoză își păstrează activitatea și au o sensibilitate înaltă.

Pentru producerea preparatului un rol deosebit are forma preparativă. Din cele patru variante de material prezentate cea mai bună formă preparativă este suspensia virală + făină de semințe de struguri (1:1), când mortalitatea atinge: la dud – 76,13%, la arțar – 99,75%, la măr – 87,21%.

Infecțarea insectelor de *Hyphantria cunea Drury* cu virusii nespecifici este un element important pentru obținerea sușelor înalt virulente cu o activitate biologică sporită de câteva ori. Aceste proprietăți stau la baza ameliorării preparatului Virin – ABB-3, care ne-a dat posibilitatea să combatem cu o cantitate mai mică de masă biologică o cantitate mai mare de dăunători. Este un preparat eficient ecologic de combatere a Omizii păroase a dudului în biocenozele agricole și în cele forestiere.

Referințe:

1. Wittenberg R. An inventory of alien species and their threat to biodiversity and economy in Switzerland // CABI Bioscience Switzerland Centre report to the Swiss Agency for Environment, Forests and Landscape. (ed.), 2005.
2. Beckage N.E., Thomson S.N., Federici B.A. Parasites and Pathogens of Insects // Academic Press, 1993, vol.2.
3. Black B.C., Brennan L.A., Dierks P.M. and Gard I.E. Commercialization of baculoviral insecticides. - In: L.K. Miller (ed.), The baculoviruses. New York: Plenum Press, 1997, p.341-387.
4. Vail P.V., Hostetter D.L. and Hoffmann D.F. Development of the multinucleocapsid nucleopolyhedroviruses (MNPVs) infectious to loopers(Lepidoptera: Noctuidae: Plusiinae)as microbial control agents // Integr. Pest. Manag., 1999, Rev. 4, p.231-257.
5. Copping L.G. and Menn J.J. Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy // Pest Manag, 2000, vol.56, p.65-676.
6. Inceoglu A.B., Kamita S.G. and Hammock B.D. Genetically modified baculoviruses: ahistorical overview and future outlook // Adv. Virus Res, 2006, vol.68, p.323-60.
7. Lacey L. A., Frutos R., Kaya H. K. and Vail P. Insect pathogens as biological control agents: Do they have a future? // Biol. Control, 2001, vol.21, p.230-248.
8. Martigoni M.E. and Iwai P.J. A catalogue of viral diseases of insects, mites, and ticks. Eds.: H. D. Burges, Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980. - London: Academic Press, 1981, p.897-91.
9. Lange M., Wang H., Zhihong H. and Jehle J.A. Towards a molecular identification and classification system of lepidopteran-specific baculoviruses // Virology, 2004, vol.325, p.36-47.
10. Alves F., Ikeda C.M. and Kobayashi M. Characterization of *Hyphantria cunea* nucleopolyhedrovirus gp64 gene and analzsis of elements regulating its earlz promoter activity // J. Insect. Biotehnol. Sericol, 2002b, vol.71, p.141-150.
11. Pang Y., Yu J., Wang L., Hu X., Bao W., Li G., Chen C., Han H., Hu S., and Yang H. Sequence analysis of the *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus genome // Virology, 2001, vol.287, p.391-404.
12. Theilmann D.A., Blissard G.W., Bonning B., Jehle J. O'Reilly D.R., Rohrmann G.F., Thiem S. and Vlak J.M. Family Baculoviridae. - In: Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee of Taxonomy of Viruses. Edited by C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger and L.A. - Ball. San Diego: CA. / Elsevier Academic Press, 2005, p.177-185.
13. Jong J.G., Lauzon H.A., Dominy C., Poloumienko A., Carstens E. B., Arif B.M. and Krell P.J. Analysis of the *Choristoneura fumiferana* nucleopolyhedrovirus genome // J. Gen. Virol., vol.86, p.929-943.
14. Herniou E.A., Olszewski J.A., O'Reilly D.R., Cory J.S. Ancient coevolution of baculoviruses and their insect hosts // Journal of Virology, 2004, vol.78, p.3244-51.
15. Lauzon H.A.M., Jamieson P.B., Krell P.J. and Arif B.M. Gene organization and sequencing of the *Choristoneura fumiferana* defective nucleopolyhedrovirus genome // J.Gen.Virol., 2005, vol.86, p.945-961.
16. Chiukhrii M. Patologia insectelor și lupta biologică. cap. din Ciochia V. și colab., Limitarea populațiilor de dăunători vegetali și animalii din culturile agricole prin mijloace biologice și biotehnice în vederea protejării mediului înconjurător. - Brașov: Disz, 1997, p.491.
17. Ikeda M., Yanagimoto K. and Kobayashi M. Identification and functional analysis of *Hyphantria cunea* nucleopolyhedrovirus iap genes // Virology, vol.321, 2004, p.359-371.
18. Чухрий М.Г. Биология бакуловирусов и вирусов цитоплазматического полиэдроза. - Кишинев: Штиинца, 1988.
19. Mallet J. Efficient transduction of neural cells *in vitro* and *in vivo* by a baculovirus-derived vector // Proc. Natl. Acad Sci. U.S.A, 2000, vol.97, p.14638-14643.
20. Гар К.А. Методы испытания токсичности и эффективности инсектицидов. - Москва, 1963.
21. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. - Москва: Колос, 1979.

Prezentat la 26.11.2010