

**CONTROLUL BIOLOGIC AL COLEOPTERELOR CURCULIONIDE
(COLEOPTERA, CURCULIONOIDEA): PROBLEME,
REALIZĂRI ȘI PERSPECTIVE**

^{1,2}Moldovan Anna

¹Institutul de Zoologie, str. Academiei 1, Chișinău, Republica Moldova

²Universitatea de Stat din Moldova, str. Kogălniceanu 65A, Chișinău,
Republica Moldova

Rezumat

Prezenta lucrare are drept scop de a trece în revistă metodele existente de control biologic al coleopterelor curculionide dăunători ai culturilor agricole și pomilor fructiferi. În rezultatul cercetărilor efectuate a fost caracterizată microflora bacteriană și fungică a speciilor *Phyllobius oblongus*, *Sciaphobus squalidus*, *Tatianaerhynchites aequatus*, *Neocoenorhinidius pauxillus*, *Byctiscus betulae*, *Sitona lineatus*, *Hypera postica* și

Protapion apricans fiind evidențiate tulpini cu activitate insecticidă sporită, care prezintă potențial de a fi utilizate în calitate de agenți de control biologic.

Cuvinte cheie: control biologic, coleoptere curculionide, bacterii, fungi, Republica Moldova

Depus la redacție 25 aprilie 2019

Adresa pentru corespondență: Anna Moldovan, Institutul de Zoologie, str. Academiei, 1, MD-2028 Chișinău, Republica Moldova; Email: anna.moldovan@yahoo.com; tel. +373 67181990

Introducere

Productivitatea culturilor agricole este compromisă de un număr mare de factori, inclusiv organismele dăunătoare. Printre acestea insectele provoacă daune considerabile, distrugând anual aproximativ 20% din producția agricolă mondială cu aplicarea măsurilor de protecție a plantelor [18, 49].

Reprezentanții suprafamiliei Curculionoidea (Coleoptera), sunt unii dintre cei mai periculoși dăunători ai plantelor de cultură [11, 25, 35, 51, 70]. În Republica Moldova speciile *Sciaphobus squalidus* (Gyll.), *Neocoenorhinidius pauxillus* (Germ.), *Tatianaerhynchites aequatus* (L.) *Phyllobius oblongus* (L.) și *Byctiscus betulae* (L.) sunt unii dintre cei mai periculoși dăunători ai pomilor fructiferi [45, 81], iar speciile *Sitona lineatus* L., *Hypera postica* (Gyll.) și *Protapion apricans* (Hbst.) sunt dăunători semnificativi ai culturilor de Fabaceae [80, 83].

Utilizarea insecticidelor chimice rămâne a fi cea mai practică metodă de combatere a insectelor dăunătoare, fiind avantajoasă datorită costurilor reduse și spectrului larg de dăunători afectați. Insecticidele chimice se utilizează extensiv, chiar dacă majoritatea posedă un nivel înalt de toxicitate. Acestea prezintă un risc considerabil pentru sănătatea omului, în urma contactului direct în timpul aplicării și prezenței reziduurilor de pesticide în produsele alimentare și sursele de apă potabilă. De asemenea, pesticidele au un impact negativ asupra mediului, cât și asupra biodiversității [8, 15, 40, 52, 71, 77]. De multe ori aplicarea insecticidelor chimice are efect invers celui scontat prin distrugerea populațiilor speciilor benefice, precum inamicii naturali ai dăunătorilor sau polenizatorii, și creșterea probabilității de dezvoltare a rezistenței dăunătorilor la produsul utilizat [15].

Drept consecință, în legislația unor țări au fost introduse prevederi ce țin de excluderea din uz sau reducerea utilizării substanțelor toxice pentru om și biodiversitate (Regulamentul 1107/2009 privind introducerea pe piață a produselor fitosanitare, Directiva 2009/127/CE privind echipamentele tehnice de aplicare a pesticidelor și Directiva 2009/128/CE privind utilizarea durabilă a pesticidelor). În rezultat au apărut noi tipuri de pesticide chimice, mai specifice și mai puțin persistente. În plan global, însă, se constată o tendință de creștere a cantităților de pesticide chimice utilizate, inclusiv cele interzise [37].

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

Insectele, ca și celelalte organisme vii, prezintă un număr larg de inamici naturali, care pot fi utilizați în calitate de agenți de control biologic. Conform unor estimări, coleopterele carabide pot reduce populațiile speciei *Sitona lineatus* cu aproximativ 30%, adulții fiind mai susceptibili la atac decât larvele [26]. Astfel, printre speciile de carabide cu potențial în controlul dăunătorului *S. lineatus* au fost evidențiate *Pterostichus madidus*, *P. melanarius*, *Harpalus rufipes*, *Agonum dorsale* [26] și *Bembidion properans* [31]. În Republica Moldova în câmpurile de lucernă, populate de către specia *Sitona lineatus*, au fost atestate densități crescute ale prădătorilor *Harpalus distinguendus* și *H. rufipes* [46].

Un alt grup de agenți de control biologic sunt parazitoizii, precum viespile din ordinul Hymenoptera, speciile din genul *Trichogramma* fiind cel mai bine studiate [36]. Printre parazitoizii dăunătorului *S. lineatus* au fost evidențiate speciile *Allurus muricatus*, *Microctonus aethioides*, *Perilitus rutilus*, *Pygostolus falcatus* (Braconidae) [1] și *Anaphes diana* (Mymaridae) [59]. Specia *Hypera postica* este parazitată de *Microctonus aethioides*, *Bathyplectes anurus* (Ichneumonidae), *B. curculionis*, și *Oomyzus incertus* (Eulophidae) [22]. În Republica Moldova pentru adulții speciilor *Byctiscus betulae*, *Hypera postica* au fost evidențiați parazitoizi din următoarele familii: Ichneumonidae (19 genuri), Eulophidae (16), Braconidae (10), Pteromalidae (5), Eupelmidae (2), Tachinidae (2) și câte o specie din familiile Eurytomidae, Encyrtidae, Torymidae și Mymaridae. Adulții dăunătorului *Sitona lineatus* sunt paraziți de speciile *Pygostolus falcatus*, *Perilitus rutilus* (Braconidae), iar ouăle acestuia sunt parazitare de *Anaphes diana* (Mymaridae) [81].

Nematozii (Nematoda, Rhabditida: Steinernematidae și Heterorhabditidae) au capacitatea de a infesta rapid gazda, sunt persistenți și cauzează efecte pe termen lung asupra populațiilor de insecte dăunătoare. Aceștia pot fi cultivați cu ușurință și au un potențial ridicat de reproducere. Studiile au evidențiat, că speciile *Steinernema carpocapsae*, *S. feltiae* (Steinernematidae) și *Heterorhabditis bacteriophora* (Heterorhabditidae), sunt eficienți în controlul biologic al dăunătorului *Sitona lineatus* [30], iar *S. carpocapsae* și *Heterorhabditis indica* sunt eficiente în cazul speciei *Hypera postica* [63].

Programele de control biologic, bazate pe utilizarea inamicilor naturali precum prădătorii, parazitoizii sau nematozii, sunt limitate de condițiile abiotice, de aceea, mai mulți factori precum umiditatea relativă a aerului, umiditatea solului și tipul de sol, trebuie luați în considerație pentru un program de control biologic eficient [9, 24]. Alți factori limitativi în utilizarea acestor inamici naturali sunt producerea și distribuția mai dificilă, perioada de depozitare fiind limitată la doar câteva săptămâni. Un alt obstacol este cel comercial, și anume lipsa posibilității de a fi brevetate [5].

Insecticidele microbiene, sau biopesticidele pe bază de virusuri, bacterii sau ciuperci sunt o alternativă utilizării inamicilor naturali prezentați mai sus, combinând avantajele atât a metodelor de control biologic, cât și a celor chimice. Asemănător pesticidelor chimice acestea sunt ușor de produs la un preț redus, ușor de formulat și au o perioadă de valabilitate lungă. De asemenea acestea pot fi aplicate cu ușurință, folosind echipamentul standard. Contrar insecticidelor chimice, care posedă un spectru larg de acțiune, virusurile, tulpinile bacteriene și fungice sunt selective, respectiv, impactul negativ asupra mediului este minim [72]. Printre virusurile cel mai frecvent utilizate ca

agenți pentru combaterea insectelor evidențiem Virusul Poliedrozei Nucleare (VPN) [20]. Majoritatea VPN infectează lepidopterele, dar au fost, de asemenea, izolate din reprezentanții ordinilor Diptera, Trichoptera, Thysanura, Hymenoptera, Coleoptera și Siphonaptera. Utilizarea biopesticidelor virale este limitată de acțiunea lentă, lipsa semnelor externe ale larvelor în primele etape de propagare ale virusului și costul ridicat al preparatelor, deoarece acestea se înmulțesc numai în celulele vii. În Republica Moldova a fost elaborată biotehnologia producerii și aplicării preparatului baculoviral *Virin-HSP* pentru combaterea dăunătorului *Helicoverpa armigera* [73].

Cu toate acestea, cel mai utilizat patogen în controlul biologic al insectelor dăunătoare este bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt). Activitatea insecticidă a acestei bacterii se datorează proteinelor produse în timpul sporulației în corpul parasporal cristalin. Toxinele prezintă activitate specifică insecticidă față de reprezentanții ordinilor Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Hemiptera, Isoptera, Orthoptera, Siphonaptera și Thysanoptera [3, 12, 13, 17, 53]. De asemenea și unele nematode prezintă susceptibilitate la acțiunea toxinelor Bt [33]. La moment sunt descrise, 812 proteine Cry, 40 proteine Cyt, și 147 proteine Vip implicate în procesul de patogeneză [84]. Conform unor studii proteina Cry6B (BGSC-4D8) manifestă activitate insecticidă semnificativă (LC_{50} 280 ng/l și LC_{90} 630 ng/l) împotriva dăunătorului *Hypera postica*. Vătămrile minore, atestate pe frunzele tratate cu soluție de toxină Cry6B, indică faptul că larvele încep hrănirea pe frunze, dar pier în scurt timp de la ingerare [64].

Rezultate promițătoare au fost înregistrate în cazul evaluării activității insecticide a preparatelor microbiene *Lepidocide P* și *SP Bankole* împotriva speciei *Protapion apricans* [78]. Pe lângă o serie de avantaje obținute prin folosirea biopesticidelor microbiene, există și unele dezavantaje, precum lipsa acțiunii asupra insectelor care au un mod de viață criptic și lipsa persistenței cristalelor proteice la acțiunea factorilor climatici. Un alt grup de microorganisme entomopatogene, utilizate sub forma unor insecticide biologice, sunt fungii. Mai mult de 100 de genuri de fungi cu aproximativ 750 de specii sunt cunoscute a fi patogene pentru insecte. Fungii prezintă specificitate față de gazdă și produc patologii severe după infectare. De exemplu, specia *Zoophthora phytonomi* este cunoscută ca agent patogen al coleopterelor din genul *Hypera* [27]. *Beauveria bassiana* (Bb) este un agent patogen fungic, utilizat împotriva mai multor grupuri de insecte dăunătoare [41]. Cutoate acestea, tulpinile individuale de Bb, izolate de pe anumite specii de insecte și testate împotriva unei game mai largi de specii, manifestă un spectru îngust de acțiune [19, 21]. Pentru controlul populațiilor speciei *Sitona lineatus* un anumit potențial prezintă *Beauveria bassiana*, *Metarhizium flavoviride*, *M. anisopliae*, *Paecilomyces farinosus* și *P. fumosoroseus* [44, 54].

Controlul biologic este un compartiment important al strategiilor de Gestionare Integrată al Organismelor Dăunătoare, care poate asigura sustenabilitatea agriculturii, siguranța economică și alimentară [67, 73]. Recent a fost aprobat Programului 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 sunt puține date privind microflora speciilor de coleoptere curculionoide dăunători ai culturilor agricole, inclusiv microorganismele, care ar

putea fi utilizate în controlul biologic al acestora. Astfel, studierea complexă a microflorei insectelor prezintă un interes deosebit, deoarece oferă posibilitatea de a evidenția noi tulpini bacteriene și fungice, care pot fi utilizate în calitate de agenți de control biologic.

Materiale și metode

Colectarea materialului biologic

Speciile *Phyllobius oblongus*, *Sciaphobus squalidus*, *Tatianaerhynchites aequatus*, *Neocoenorhinidius pauxillus* și *Byctiscus betulae* au fost colectate în perioada anilor 2007-2008, iar speciile *Sitona lineatus*, *Hypera postica* și *Protapion apricans*, în perioada anului 2010, în diferite localități din Republica Moldova. Insectele au fost colectate manual, prin scuturarea insectelor pe bucăți de pânză și prin cosire cu fileul entomologic [4]. Identificarea apartenenței specifice a insectelor a fost efectuată cu utilizarea lupei binoculare MBC-10 și surselor disponibile de literatură [79].

Izolarea microorganismelor

Izolarea bacteriilor din corpurile insectelor *S. squalidus*, *T. aequatus*, *N. pauxillus* și *B. betulae* a fost realizată conform metodelor descrise anterior [48, 68]. Pentru izolarea selectivă a tulpinilor genului *Bacillus* din corpul insectelor *P. oblongus* și *N. pauxillus* a fost folosit mediul T3 [69]. Culturile pure au fost păstrate în glicerol (15%) la temperatura de -80°C .

Izolarea ciupercilor din corpurile insectelor *S. lineatus*, *H. postica* și *P. apricans*, a fost realizată folosind mediile nutritive PDA și SAPF (Merck) [43]. Culturile pure au fost obținute prin repicarea coloniilor individuale, fiind păstrate ulterior în glicerol (10%) la temperatura de -80°C .

Izolarea ADN, amplificarea și secvențierea fragmentelor de ADN

ADN genomic bacterian a fost extras prin metoda standard fenol-cloroform [58]. Porțiunea genei ARNr 16S a fost amplificată cu utilizarea primerilor universali UNI 16S-L și UNI 16S-R [76] și programului standardizat [48]. Porțiunea 16S-23S ITS (Internal Transcribed Spacer) a fost amplificată folosind perechea de primeri universali G1 și L1 [32], iar porțiunile de genă *Cry1* și *Cry3* cu utilizarea perechilor de primeri *Lep1A*, *Lep1B* [23] și *Col1A*, *Col1B* [29]. Secvențierea produselor de amplificare a fost realizată de către MacroGen Inc. (Olanda, <http://www.macrogen.com>).

ADN genomic fungic a fost extras cu ajutorul DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN). Regiunile ITS (Internal Transcribed Spacer) și gena 5,8 S ARNr au fost amplificate cu utilizarea perechii de primeri ITS4 și ITS5 [75] conform protocolului descris anterior [43]. Produsul amplificării a fost purificat cu Mini Elute PCR Purification Kit (QIAGEN). Secvențierea produselor amplificării a fost realizată de către SeqLab GmbH (Germania, <http://www.seqlab.de/>).

Metode statistice și bioinformaționale

Editarea și alinierea succesiunilor nucleotidice ale sectoarelor de ADN secvențiat au fost efectuate cu ajutorul softurilor BioEdit 4.0 și Mega 6.0. Similaritatea succesiunilor nucleotidice obținute cu cele din baza de date GenBank a fost verificată utilizând programul de căutare BLAST [2]. Criteriile utilizate pentru identificare au fost: gradul de suprapunere a secvențelor $> 80\%$, similaritatea la nivel de specie 99-100% și similaritatea la nivel de gen 94-98%.

Evaluarea activității insecticide a tulpinilor izolate

Activitatea insecticidă a tulpinilor bacteriene și fungice a fost testată pe dăunătorii pomilor fructiferi *Phyllobius oblongus*, *Sciaphobus squalidus*, *Tatianaerhynchites aequatus*, *Neocoenorhynchidius pauxillus*, *Byctiscus betulae* și dăunătorii culturilor agricole *Sitona lineatus* și *Hypera postica* [42, 47, 48]. Pentru testare se folosesc cinci concentrații de spori ale tulpinilor incluse în studiu. Pentru fiecare concentrație se utilizează câte 10 insecte. Insectele sunt monitorizate zilnic fiind înregistrat numărul exemplarelor pierite [39]. Mortalitatea insectelor este calculată după formula lui Abbott cu unele modificări [10]. Activitatea biologică a tulpinilor exprimată în LC₅₀ este determinată după formula lui Spearman-Kärber [56].

Rezultate și discuții

În baza proprietăților fiziologice, biochimice și moleculare în microflora insectei *B. betulae* au fost identificate speciile de bacterii *Pantoea agglomerans* (tulpina Bb3) și *Erwinia* spp. (Bb1, Bb2 și Bb4). Complexul de bacterii al dăunătorului *Sciaphobus squalidus* a fost reprezentat de *Bacillus cereus* (Ss1), *Pseudomonas fluorescens* (Ss2), *Pantoea agglomerans* (Ss3) și *Pseudomonas moraviensis* (Ss4), iar tulpinile izolate din microflora speciei *T. aequatus* au fost identificate ca *Klebsiella pneumoniae* (Ta1, Ta3 și Ta4), *Erwinia billingiae* (Ta2) și *Staphylococcus haemolyticus* (Ta5). Din corpul insectelor *N. pauxillus*, *P. oblongus* și *T. aequatus* au fost izolate trei tulpini de *Bacillus thuringiensis* (Np1, Po4 și Ta16 respectiv). Tulpinile Np1, Po4 și Ta16 au fost depuse în Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie cu numerele CNMN-BB-03, CNMN-BB-04 și CNMN-BB-05 respectiv.

Prezența speciilor de bacterii *Pseudomonas fluorescens*, *Pantoea agglomerans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus* și *Erwinia* spp., a fost atestată anterior în microflora curculionidelor și a altor specii de coleoptere [16, 28, 34, 60, 61, 62]. Cât privește speciile *Staphylococcus haemolyticus*, *Erwinia billingiae* și *Pseudomonas moraviensis*, studiul prezentat a constituit prima mențiune referitor la izolarea acestora din microflora coleoptelor [48]. Dintre bacteriile identificate speciile *Pantoea agglomerans*, *Erwinia* spp. sunt patogene pentru plante [14, 65], iar speciile *Klebsiella pneumoniae* și *Staphylococcus haemolyticus* sunt cunoscute ca patogeni umani [7, 66], ceea ce implică investigarea rolului insectelor incluse în acest studiu în vectorizarea agenților patogeni.

Tulpina autohtonă de *Bacillus cereus* a prezentat activitate insecticidă sporită, cauzând o mortalitate de 93%, fiind testată pe specia *S. squalidus*, 90% pentru *B. betulae* și 83% pentru *T. aequatus*, după 5 zile de la aplicare. Tulpina autohtonă de bacterii *Bacillus thuringiensis*, CNMN-BB03, posedă o activitate insecticidă pronunțată asupra coleoptelor curculionide *Neocoenorhynchidius pauxillus*, *Phyllobius oblongus* și *Sitona lineatus* cauzând o mortalitate de 80,0 %, 73,3% și 66,6% respectiv (Brevet de Invenție Nr.4196) [47].

Bacteria *Bacillus cereus* este întâlnită de obicei în sol și a fost atestată ca patogen al insectelor, fiind izolată din mai multe specii de coleoptere [60, 61]. Tulpina de *Bacillus cereus* izolată din *Amphimallon solstitiale* [61], fiind testată împotriva larvelor, a cauzat mortalitate de 90%. Se efectuează cercetări ample privind activitatea insecticidă a tulpinilor de Bt contra diferitor dăunători, inclusiv

specii de curculionide [55, 74, 82], însă datele privind activitatea insecticidă a tulpinilor native de Bt, asupra speciilor incluse în studiul de față, sunt limitate.

În rezultatul analizei morfologice și molecular genetice tulpinile fungice, izolate din corpul insectei *S. lineatus*, au fost identificate ca: *Aspergillus* sp. (S11/4), *Cryptococcus tephrensensis* (S11/5), *Beauveria bassiana* (S11/6, S11/9 și S11/11), *Torula herbarum* (S11/7), *Fusarium* sp. (S11/8), *Penicillium brevicompactum* (S11/10), *Penicillium polonicum* (S12/5), *Torula caligans* (L3/5), *Aureobasidium pullulans* (S12/6, S15/4), *Paecilomyces fumosoroseus* (L5/6) și *Rhizopus stolonifer* (L6/4). Tulpinile fungice, izolate din corpul dăunătorului *H. postica*, au fost identificate ca *Candida* spp. (Hp1/4 și Hp1/6), *Phialophora cyclaminis* (Hp2/2), *Torula caligans* (Hp3/2 și Hp4/2), *Torula herbarum* (Hp3/4), *Dendryphion nanum* (Hp3/3), *Acremonium strictum* (Hp3/5 și Hp5/12), *Cladosporium* spp. (Hp3/9, Hp4/3, Hp5/41 și Hp 6/1), *Mucor racemosus* (Hp3/13), *Aureobasidium pullulans* (Hp5/4), *Alternaria alternata* (Hp5/5 și Hp6/3), *Fusarium* sp. (Hp5/7) și *Arthrimum arundinis* (Hp5/13). Cele 5 tulpini fungice izolate din corpul insectei *P. apricans* au fost identificate ca *Cladosporium* sp. (Pa1), *Penicillium polonicum* (Pa2 și Pa3), *Debaryomyces hansenii* (Pa4) și *Trichothecium roseum* (Pa8).

Comunitățile fungice ale speciilor de insecte investigate au fost constituite din patogeni ai plantelor (*Alternaria alternata*, *Cladosporium* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium polonicum*, *Phialophora cyclaminis*, *Rhizopus stolonifer*, *Sarocladium strictum* și *Trichothecium roseum*), care cauzează pierderi semnificative în culturile agricole [6, 38, 50]. Aceste date sugerează că *S. lineatus*, *H. postica* și *P. apricans* sunt potențiali vectori ai ciupercilor fitopatogene și necesită o atenție deosebită. Tulpina *Beauveria bassiana* S11/6 și *Paecilomyces fumosoroseus* S15/6 au fost depozitate în Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie cu numerele CNMN-FE-01 și CNMN-FE-02. Tulpina *B. bassiana* CNMN-FE-01 prezintă o activitate insecticidă sporită împotriva speciei *S. lineatus*, o concentrație de $0,969 \times 10^5$ conidii/individ cauzează mortalitate de 100% la a 5-a zi de la aplicare (Brevet de invenție 4560) [42].

Cercetările privind aplicarea *B. bassiana* pentru controlul populațiilor de *S. lineatus* sunt fragmentare [44, 54]. Un studiu mai recent menționează tulpina *Beauveria bassiana* 238, activă împotriva speciei *S. lineatus* [57]. Această tulpină posedă o activitate insecticidă mai redusă și un timp de acțiune mai lent comparativ cu tulpina autohtonă *B. bassiana* CNMN-FE-01. Pentru a atinge o mortalitate de 85% este necesar de a aplica 1×10^7 conidii/individ ale tulpinii *B. bassiana* 238, ceea ce este de 100 ori mai mult decât în cazul aplicării tulpinii *B. bassiana* CNMN-FE-01.

Astfel tulpinile autohtone *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* și *Beauveria bassiana* posedă caracteristici promițătoare pentru a fi utilizate în calitate de agenți de control biologic al curculionidelor dăunătoare.

Concluzii

Investigarea microflorei coleopterelor curculionide în intenția de a oferi tulpini autohtone pentru a fi utilizate în calitate de agenți ai controlului biologic reprezintă o necesitate, în contextul dezvoltării sustenabile a agriculturii în Republica Moldova. Tulpinile autohtone bacteriene și fungice, obținute din mediul natural, ar putea reduce semnificativ costurile pentru obținerea bioinsecticidelor și ar asigura micșorarea

gradului de poluare al mediului ambiant. De asemenea, utilizarea tulpinilor autohtone va contribui la reducerea riscurilor ecologice, asociate cu introducerea unor organisme străine în ecosisteme și dereglarea funcționării acestora. Astfel, izolarea tulpinilor locale de *Bacillus thuringiensis* și *Beauveria bassiana* este o etapă importantă în dezvoltarea programelor de control biologic în Republica Moldova.

Din punct de vedere al costurilor, producția locală de biopesticide este semnificativ mai eficientă pentru fermieri, decât importul de preparate, deoarece prețurile de pe piața internațională depășesc capacitatea de cumpărare a acestora.

Ulterior se cere de a evalua virulența tulpinilor izolate asupra unei game mai largi de artropode, în special cele nevizate. De asemenea, urmează a fi studiate caracteristicile biotehnologice ale tulpinilor pentru elaborarea formulei biopreparatelor și testarea acestora în condiții de câmp. Pentru a evita epuizarea resurselor naturale este necesar de a investiga aplicarea concomitentă a mai multor metode și agenți de control al dăunătorilor ceea ce va oferi strategii de management integrat viabile și eficiente.

Bibliografia

1. Aeschlimann J.P. The Sitona [Col.: Curculionidae] species occurring on *Medicago* and their natural enemies in the Mediterranean region. //Entomophaga, 1980: 25. P. 139-153.
2. Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. //Nucleic Acids Research, 1997: 25. P. 3389-3402.
3. Aranda E., Peferoen M., Guereca L., Bravo A. Interactions of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with the midgut epithelial cell of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). //Journal of Invertebrate Pathology, 1996: 68. P. 203-212.
4. Bacal S., Cocîrță P., Munteanu N. Metode și echipament de colectare a artropodelor. Ghid științifico-practic. Chișinău 2014, Tipografia AȘM. 52 p.
5. Bale J.S., van Lenteren J.C., Bigler F. Biocontrol and sustainable food production. //Philosophical Transactions of the Royal Society B, 2008: 363. P. 761-776.
6. Bandyopadhyay R., Mughogho L.K., Satyanarayana M.V. Systemic infection of sorghum by *Acremonium strictum* and its transmission through seed. //Plant Disease, 1987: 71(7). P. 647-650.
7. Barros E.M., Ceotto H., Bastos M.C.F., dos Santos K.R.N., Giambiagi-de Marvalva M. *Staphylococcus haemolyticus* as an important hospital pathogen and carrier of methicillin resistance genes. //Journal of Clinical Microbiology, 2011. P. 166-168.
8. Berny P. Pesticides and the intoxication of wild animals. //Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 2007: 30. P. 93-100.
9. Bilgrami A.L., Gaugler R. Effects of various stress factors on heat tolerance by *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae*. //Nematology, 2007: 9. P. 161-167.
10. Busvine J.R. Recommended methods for measurement of pest resistance to pesticide. Section 8. (Eds. Semple R.L., Hicks P.A., Lozare J.V., Castermans A.). Towards integrated commodity and pest management in grain storage. A Training Manual for application in humid tropical storage systems. FAO, Viale delle Terme di Caracalla, 1992. 526 p.
11. Carcamo H.A., Herle C.E., Lupwayi N.Z. *Sitona lineatus* (Coleoptera: Curculionidae) Larval feeding on *Pisum sativum* L. affects soil and plant nitrogen. //Journal of Insect Science, 2015: 15(1): 74.
12. Castilhos-Fortes R., Matsumura A.T., Diehl E., Fiuza L.M. Susceptibility of *Nasutitermes ehrhardti* (Isoptera: Termitidae) to *Bacillus thuringiensis* subspecies. //Brazilian Journal of Microbiology, 2002: 33. P. 219-222.
13. Cavados C.F., Fonseca R.N., Chaves J.Q., Rabinovitch L., Araujo-Coutinho C.J. Identification

of entomopathogenic *Bacillus* isolated from *Simulium* (Diptera, Simuliidae) larvae and adults. //Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, 2001: 96(7). P. 1017-1021.

14. Cruz A.T., Cazacu A.C., Coburn H.A. *Pantoea agglomerans*, a plant pathogen causing human disease. //Journal of Clinical Microbiology, 2007: 45(6). P. 1989-1992.

15. Damalas C.A., Eleftherohorinos I.G. Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. //International Journal of Environmental Research and Public Health, 2011: 8(5). P. 1402-1419.

16. Danismazoglu M., Demir I., Sevim A., Demirbag Z., Nalcacioglu R. An investigation on the bacterial flora of *Agriotes lineatus* (Coleoptera: Elateridae) and pathogenicity of the flora members. //Crop Protection, 2012: 40. P. 1-7.

17. de Maagd R.A., Bravo A., Berry C., Crickmore N., Schnepf H.E. Structure, diversity and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. //Annual Review of Genetics, 2003: 37. P. 409-433.

18. Dhaliwal G.S., Jindal V. Mohindru B. Crop losses due to insect pests: Global and Indian scenario. //Indian Journal of Entomology, 2015: 77(2). P. 165-168.

19. Fargues J. Specificite des champignons pathogenes imparfaits (Hyphomycetes) pour les larves de Coleopteres (Scarabaeidae et Chrysomelidae). //Entomophaga, 1976: 21. P. 313-323.

20. Federici B.A. Viral pathobiology in relation to insect control. P. 81-101. (Eds. Beckage N.E., Thompson S.N., Federici B.A.). Parasites and pathogens of insects. Vol. 2. San Diego (CA), Academic Press, 1993.

21. Ferron P. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. //Annual Review of Entomology, 1978: 23. P. 409-442.

22. Flanders K.L., Radcliffe E.B., Krueger C.A. Natural Enemies of Alfalfa Weevil, *Hypera postica* (Coleoptera: Curculionidae), in Minnesota. //The Great Lakes Entomologist, 1995: 27(1): 2.

23. Geiser M., Schweitzer S., Grimm C. The hypervariable region in the genes coding for entomopathogenic crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*: nucleotide sequence of the kurhdI gene of subsp. *kurstaki* HD-1. //Gene, 1986: 48(1). P. 109-118.

24. Georgis R., Gaugler R. Predictability in biological control using entomopathogenic nematodes. //Journal of Economic Entomology, 1991: 84. P. 713-720.

25. Ghizdavu I., Pasol P., Palagesiu I., Bobirnac B., Filipescu C., Matei I., Georgescu T., Baicu T., Barbulescu A.I. Entomologie agricolă. Editura Didactică și Pedagogică, R.A., București. 1997. 435 p.

26. Hamon N., Bardner R., Allen-Williams L., Lee J.B. Carabid populations in field beans and their effect on the population dynamics of *Sitona lineatus* (L.) //Annals of Applied Biology, 1990: 117. P. 51-62.

27. Harcourt D., Guppy G.M., Macleod D.M., Tyrell D. The fungus *Entomophthora phytonomi* pathogenic to the alfalfa weevil, *Hypera postica* (Coleoptera: Curculionidae). //Canadian Entomologist, 1974: 109. P. 1521-1532

28. Hildebrand M., Dickler E., Geider K. Occurrence of *Erwinia amylovora* on insects in a fire blight orchard. //Journal of Phytopathology, 2000: 148(4). P. 251-256.

29. Hofte H., Seurinck J., Houtven A.V., Vaeck M. Nucleotide sequence of a gene encoding an insecticidal protein of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* toxic against Coleoptera. //Nucleic Acids Research, 1987: 15. P. 7183-7783.

30. Jaworska M. Laboratory preference of annual legumes by pea weevil *Sitona lineatus* L. (Col., Curculionidae) and their effect on susceptibility of weevils to entomogenous nematodes. //Journal of Invertebrate Pathology, 1998: 71. P. 248-250.

31. Jaworska M., Ropek D. Influence of host-plant on the susceptibility of *Sitona lineatus* L. (Col., Curculionidae) to *Steinernema carpocapsae* Welser. //Journal of Invertebrate Pathology, 1994: 64. P. 96-99.

32. Jensen M.A., Webster J.A., Straus N. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. //Applied and Environmental Microbiology, 1993: 59. P. 945-952.

33. Jozani G.S., Seifinejad A., Saeedizadeh A., Nazarian A., Yousefloo M., Soheilvand S., Mousivand M., Jahangiri R., Yazdani M., Amiri R.M., Akbari S. Molecular detection of nematocidal crystalliferous *Bacillus thuringiensis* strains of Iran and evaluation of their toxicity on free-living and plant-parasitic nematodes. //Canadian Journal of Microbiology, 2008: 54. P. 812-822.
34. Kati A., Ugras S., Yilmaz H., Kati H. The first study on the bacterial flora of the *Xyleborus xylographus* Say (Coleoptera: Curculionidae), p. 115. /In: 43th Annual Meeting of the SIP, 10th International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control and The Final Meeting of COST862: Bacterial Toxins for Insect Control, Turkey, 2010.
35. Keskin S., Ozkaya H. Effect of storage and insect infestation on the technological properties of wheat, CyTA. //Journal of Food, 2015: 13(1). P. 134-139.
36. Knutson A. The Trichogramma manual. A guide to the use of *Trichogramma* for biological control with special reference to augmentative releases for control of bollworm and budworm in cotton. Texas Agricultural Extension Center, 2005. 44 p.
37. Lamberth C., Jeanmart S., Luksch T., Plant A. Current Challenges and Trends in the Discovery of Agrochemicals. //Science, 2013: 341(6147). P. 742-746.
38. Levic J., Stankovic S., Krnjaja V., Bocarov-Stancic A., Ivanovic D. Distribution frequency and incidence of seed-borne pathogens of some cereals and industrial crops in Serbia. 2012. //Pesticides and Phytomedicine, 2012: 27(1). P. 33-40.
39. Manual of Techniques in Invertebrate Pathology, 2nd Edition. (Eds. Lacey L.). Academic Press, 2012. 504 p.
40. Maroni M., Fanetti A.C., Metruccio F. Risk assessment and management of occupational exposure to pesticides in agriculture. //La Medicina del Lavoro, 2006: 97. P. 430-437.
41. McCoy C.W., Samson R.A., Boucias D.G. 1988. Entomogenous fungi. P. 151-236. (Eds. Ignoffo C.M., Mandava N.B.). Handbook of natural pesticides. Vol. 5. Microbial pesticides. Part A: entomogenous protozoa and fungi. Boca Raton (FL). CRC Press.
42. Moldovan A., Munteanu-Molotievskiy N., Toderas I. Tulpină de fungi *Beauveria bassiana* – bioinsecticid pentru combaterea coleoptelilor curculionide. Brevet nr. 4560. (13) B1. BOPI, 2018: 4. P. 51-52.
43. Moldovan A., Toderas I., Leclercq A., Munteanu Molotievskiy N. Isolation and identification of fungal community of alfalfa pest weevils (Coleoptera: Curculionidae) in the Republic of Moldova. //IOBC-WPRS Bulletin, 2017: 129. P. 70-73.
44. Müller-Kögler E., Stein W. Greenhouse studies with *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. on the infection of *Sitona lineatus* (L.) (Coleopt., Curcul.) in the soil. //Journal Zeitschrift für Angewandte Entomologie, 1970: 65(1). P. 59-76.
45. Munteanu N. La diversité et l'importance économique des scarabées Rhynchites et Attelabides (Coleoptera: Rhynchitidae, Attelabidae) sur les territoires de la République de Moldova. //Buletin USAMV, 2006: 62. P. 188-191.
46. Munteanu N., Bacal S., Moldovan A., Malevanciu N., Toderas I. Beetle communities of alfalfa (*Medicago sativa* L.) in the Republic of Moldova. //APCBEE Procedia, 2014: 8. P. 21-26.
47. Munteanu N., Toderas I., Moldovan A., Malevanciu N., Toderas L., Railean N. Tulpina *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* – insecticid biologic pentru combaterea coleoptelilor curculionide. Brevet de invenție 4196 (13) B1. BOPI, 2013: 2. P. 19.
48. 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. //Biologia 2014: 69(5). P. 681-690.
49. Oerke E.C. Centenary review, crop losses to pests. //Journal of Agricultural Science, 2006: 144. P. 31-43.
50. Oh S.Y., Nam K.W., Yoon D.H. Identification of *Acremonium acutatum* and *Trichothecium roseum* isolated from grape with white stain symptom in Korea. //Mycobiology, 2014: 42(3). P. 269-273.
51. Perju T. Entomologie agricolă, componentă a protecției integrate a agroecosistemelor. Editura Ceres, București, 1995. 298 p.
52. Pimentel D. Environmental and economic costs of the application of pesticides primarily in the United States. Environment, Development and Sustainability, 2005: 7. P. 229-252.
53. Pinto L.M., Azambuja A.O., Dihel E., Fiuza L.M. Pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* isolates

from two species of *Acromyrmex* (Hymenoptera: Formicidae). //Brazilian Journal of Biology, 2003: 63(2). P. 301-306.

54. Poprawski T.J., Marchal M., Robert P.H. Comparative susceptibility of *Otiorhynchus sulcatus* and *Sitona lineatus* (Coleoptera: Curculionidae) early stages to five entomopathogenic Hyphomycetes. // Environmental Entomology, 1985: 14. P. 247-253.

55. Quinn M.A., Bezdicek D.F. Effect of cryIIIA protein production in nodules on pea-pea leaf weevil (Coleoptera: Curculionidae) interactions. //Journal of Economic Entomology, 1996: 89. P. 550-557.

56. Rath S., Sahu M.C., Dubey D., Debata N.K., Padhy R.N. Which value should be used as the lethal concentration 50 (LC₅₀) with bacteria? //Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences, 2011: 3. P. 138-143.

57. Riedel W., Steenberg T. Adult polyphagous coleopterans overwintering in cereal boundaries: winter mortality and susceptibility to the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. //BioControl, 1998: 43. P. 175-188.

58. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989. 800 p.

59. Schotzko D.J., O'Keefe L.E. Ovipositional rhythms and egg melanization rate of *Sitona lineatus* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). //Environmental Entomology, 1986: 15. P. 601-606.

60. Selvakumar G., Mohan M., Sushil S.N., Kundu S., Bhatta J.C., Gupta H.S. Characteristic and phylogenetic analysis of an entomopathogenic *Bacillus cereus* strain WGPSB-2 (MTCC 7182) isolated from white grub, *Anomala dimidiata* (Coleoptera: Scarabaeidae). //Biocontrol Science and Technology, 2007: 17(5). P. 525-534.

61. Sezen K., Demir I., Hatice K., Demirbag Z. Investigations on bacteria as a potential biological control agent of summer chafer, *Amphimallon solstitiale* L. (Coleoptera: Scarabaeidae). //Journal of Microbiology, 2005: 43(5). P. 463-468.

62. Sezen K., Demirbag Z. Isolation and insecticidal activity of some bacteria from the hazelnut beetle (*Balaninus nucum* L.). //Applied Entomology and Zoology, 1999: 34(1). P. 85-99.

63. Shah N.K., Azmi M.I., Tyagi P.K. Pathogenicity of Rhabditid nematodes (Nematoda: Heterorhabditidae and Steinernematidae) to the grubs of alfalfa weevil, *Hypera postica* (Coleoptera: Curculionidae). //Range Management and Agroforestry, 2011: 32. P. 64-67.

64. Sharma A., Kumar S., Bhatnagar R.K. *Bacillus thuringiensis* Protein Cry6B (BGSC ID 4D8) is Toxic to Larvae of *Hypera postica*. //Current Microbiology, 2011: 62. P. 597-605.

65. Starr M.P., Chatterjee A.K. The genus *Erwinia*: enterobacteria pathogenic to plants and animals. //Annual Review of Microbiology, 1972: 26. P. 389-426.

66. Struve C., Krogfelt K.A. Pathogenic potential of environmental *Klebsiella pneumoniae* isolates. //Environmental Microbiology, 2004: 6(6). P. 584-590.

67. Tanada Y., Kaya H.K. Insect Pathology. Academic Press, San Diego, 1993. 666 p.

68. Thiery I., Frachon E. Identification, isolation, culture and preservation of entomopathogenic bacteria. P. 55-73. (Eds. Lacey A.L.). Manual of Techniques in Insect Pathology, Academic Press, London, 1997.

69. Travers R., Martin P., Reichelderfer C. Selective process for efficient isolation of soils *Bacillus* spp. //Applied Environmental Microbiology, 1987: 53(6). P. 1263-1266.

70. Urban J. Occurrence, biology and harmfulness of *Byctiscus betulae* (L.) (Coleoptera, Rhynchitidae). //Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis, 2015: 63(5). P. 1601-1624.

71. Van der Werf H.M. Assessing the impact of pesticides on the environment. //Agriculture, Ecosystems and Environment, 1996: 60. P. 81-96.

72. van Lenteren J.C. Biological control of pests. P. 179-187. (Eds. Zadoks J.C.). Modern crop protection: developments and perspectives pp. Wageningen, The Netherlands, Wageningen Press, 1993.

73. Volosciuc L. Realizări în protecția microbiologică a plantelor. //Akademos, 2015: 3. P. 57-64.

74. Weathersbee A.A., Lapointe S.L., Hatters R.G. Activity of *Bacillus thuringiensis* isolates against *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae). //Florida Entomologist, 2006: 89(4). P. 441-448.

75. White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J.W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. P. 315-322. (Eds. Innis M.A., Gelgard D.H., Sninsky J.J., White T.J.). PCR Protocols: A guide to methods and applications. Academic Press Inc., California, USA, 1990.
76. William G.W., Susan M.B., Dale A.P., David J.L. 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. //Journal of Bacteriology, 1991: 173(2). P. 697-703.
77. Wilson C., Tisdell C. Why farmers continue to use pesticides despite environmental, health and sustainability costs. //Ecological Economics, 2001: 39. P. 449-462.
78. Баландина Е.В. Видовой состав вредителей козлятника восточного и приемы борьбы с ними в Предуралье. Автореферат, докт. дис. Москва, 2007 г.
79. Крыжановский О. Определитель насекомых Европейской части СССР. т. 2, Москва, 1965. 668 с.
80. Мунтяну Н., Малеванчук Н., Годераш Л., Молдован А., Бакал С. Распределение и биологические особенности развития вида *Sitona lineatus* (Coleoptera: Curculionidae) в Республике Молдова. //Buletinul Academiei de Științe. Științele vieții, 2012: 3(318). P. 131-138.
81. Поїрас А.А. Жестоккрылые надсемейства Curculionidae (Insecta, Coleoptera) Республики Молдова их разнообразие и значение. Автореферат, докт. дис. Кишинэу, 2006 г.
82. Прищепя Л., Станкявичене А., Снешкене В. Спектр активности *Bacillus thuringiensis* бактериальных препаратов против вредителей. //Miestu želdynų formavimas, 2016: 1(13). P. 315-322.
83. <http://lex.justice.md>. Programul național de protecție integrată a plantelor pentru anii 2018-2027 și a Planului de acțiuni privind implementarea acestuia (HGO123/2018), Publicat: 09.02.2018 în Monitorul Oficial Nr. 40-47, art Nr 142 (accesat la data de 03.04.2019).
84. <http://www.btnomenclature.info/> Crickmore, N., Baum, J., Bravo, A., Lereclus, D., Narva, K., Sampson, K., Schnepf, E., Sun, M. and Zeigler, D.R. "Bacillus thuringiensis toxin nomenclature", 2018 (accesat la data de 03.04.2019).