

4. Кудрявцева Т.А., Леонова Н.Е. Подбор бактериальных заквасок для сметаны, стабильно обеспечивающих высокое качество продукта. //Сб. научных трудов «Научное обеспечение молочной промышленности (ВНИМИ 75 лет)», Москва, 2004, стр.157-169.
5. Потемьска О., Кігель Н., Тарадії Г. Заквашувальна культура для ряженки.//Харчова і переробна промисловість, 2002, № 9, с. 25-27.
6. Приданникова И.А. Стартерные культуры для кисломолочных продуктов.//Молочная промышленность, 2001, № 12, с. 29-30.
7. Серебренников В.М., Ворошина Л.Н., Глазунов А.В. Изучение синтеза  $\alpha$  – ацетолактата, предшественника диацетила, периодической культурой *Lactococcus lactis*.//Биотехнология, 2005, № 3, с. 13-21.
8. Соколова О.М. Можно ли избежать «крупинчатости» сметаны путем правильного подбора заквасок. //Переработка молока, 2005, № 8, с. 34.
9. Соловьева Е., Ларагодина В. Новые заквасочные культуры для кисломолочных продуктов и сыров. //Молочная промышленность, 2005, № 9, с. 14-15.
10. Степанова Л.И. Факторы, влияющие на качество сметанных продуктов.//Молочная промышленность, 2006, № 10, с. 65.
11. GOST 9225 Методы микробиологического анализа.
12. GOST 3624 Методы определения кислотности.
13. Kosikowska M., Jakubczyk E. Napoje mleczne z udziałem tradycyjnych i nowych mikroorganizmów. //Przem. spoz., 1997, vol. 51, nr. 8, p.12-15.
14. Laudoni A. Obținerea și utilizarea culturilor pentru fabricarea diferitelor sortimente de brânzeturi. //Institutul de Chimie Alimentară, 1995, p.20.
15. Monnet C., Aymes F., Carrien G. Diacetyl and  $\alpha$  – acetolactate overproduction by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* mutants that are deficient in  $\alpha$  – acetolactate decarboxylase and have a low lactate dehydrogenase activity. //Appl. and Environ. Microbiol, 2000, vol. 66, № 12, p. 418-423.
16. Rondags E., Halliday E., Marc I. Diacetyl production mechanism by a strain of *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* bv. *Diacetylactis*: study of  $\alpha$  – acetolactic acid extracellular accumulation under anaerobiosis. //Appl. Biochem. and Biotechnol. A., 1998, № 2, p. 203-212.

## **PROBLEMELE IDENTIFICĂRII ȘI AMELIORĂRII BACULOVIRUSURILOR**

**Voloșciuc L. T.**

*Institutul de Protecție a Plantelor și Agricultură Ecologică al  
Academiei de Științe a Moldovei*

### **Introducere**

Intensificarea cercetărilor în domeniul identificării și geneticii baculovirusurilor a fost determinată de necesitatea elaborării și aplicării preparatelor baculovirale în sistemele de protecție integrată a plantelor [3, 7] și în agricultura ecologică [9, 27]. Deja au fost înregistrate succese remarcabile în cercetarea particularităților biologice ale virusurilor entomopatogene, cât și în folosirea preparatelor virale entomopatogene pentru combaterea biologică a insectelor dăunătoare [17, 19, 25].

Deși în scopul identificării baculovirusurilor au fost propuse diverse metode, care se referă la toate criteriile speciei, începând cu cel morfologic și terminând cu cel geografic și ecologic, totuși problema identificării baculovirusurilor, îndeosebi a Virusului Poliedrozei Nucleare (VPN) rămâne nesoluționată [2, 5]. Aceasta condiționează un

șir de probleme atât în realizarea proceselor tehnologice de producere a mijloacelor biologice [17], cât și în lucrările de aplicare a baculovirusurilor în calitate de vectori ai informației genetice la translarea ei pentru obținerea substanțelor biologic active deosebit de prețioase [1, 4].

Un rol deosebit în identificarea baculovirusurilor au avut și continuă să aibă metodele morfometrice de identificare a VPN, care permit de a diferenția baculovirusurile nu în funcție de insecta-gazdă, ci după numărul de nucleocapsizi incluși în componența poliviriocapsizilor [9, 23, 28].

Pornind de la importanța crescândă a baculovirusurilor în calitate de agenți eficienți în protecția biologică a plantelor și ținând cont de succesele înregistrate deja în folosirea modelelor baculovirale pentru soluționarea unui șir de probleme fundamentale ale biologiei moleculare și geneticii, în identificarea baculovirusurilor au fost aplicate numeroase varietăți a metodelor serologice – ELISA [16], metodelor radioimunologice [2] și altor metode [13, 15], care deși sunt costisitoare și prezintă mari dificultăți la executare, totuși nu permit depistarea varietăților de baculovirusuri din cadrul unea și aceleași specie.

În scopul identificării baculovirusurilor actualmente tot mai des se aplică metodele biochimice și ale biologiei moleculare, care permit diferențierea specifică a baculovirusurilor și evidențierea componentilor din interiorul speciei [20, 23]. Ele mai permit de asemenea identificarea izolatelor intraspecifice și depistarea infecțiilor mixte la insectele gazdă, dar aceste metode deocamdată rămân slab explorate.

Luând în considerație creșterea rolului baculovirusurilor în legătură cu aplicarea lor în calitate de vectori ai informației genetice în metodele geno-inginerice, actualmente crește considerabil rolul metodelor și sistemelor de identificare a baculovirusurilor, îndeosebi a celor ultrastructurale și molecular-biologice [8, 10, 21].

### **Material și metode de cercetare**

Cercetările au fost efectuate pe larve de Buha-fructificațiilor (*Helioverpa armigera* Hubh), Buha-verzei (*Mamestra brassicae* L), Omida-păroasă-a-dudului (*Hyphantria cunea* Drury), Albilița-varzei (*Pieris brassicae* L.), Albilița-turnepsului (*Pieris rapae* L), Omida-păroasă-a-stejarului (*Lymantria dispar* L.), Viermele-merelor (*Cydia pomonella* L), Omida-salciei (*Leucoma salicis* L.), Buha-sămănăturilor (*Agrotis segetum* Schiff) și diverse tulpini de baculovirusuri ale acestora și ale altor specii de insecte. Pentru infectarea liniilor de laborator a fost folosită hrănirea dozată a insectelor cu mediu nutritiv care conținea de la 100 până la 1 mil poliedre pentru o larvă. Observațiile asupra populației de laborator de insecte și evidența larvelor, menținute în camere climatice cu dirijarea condițiilor principale de creștere, și moarte din cauza infecției virale se efectuau zilnic, începând cu ziua a treia după infectare. Eficiența virusului s-a determinat după formula Abbot, care prevede și mortalitatea naturală a insectelor în control [20].

Mostrele de țesuturi infectate, obținute la diferite faze a procesului de patogeneză, au fost fixate cu soluție de 2,5% de aldehydă glutarică, postfixate cu 1% de OsO<sub>4</sub>, dehidratate în serii de acetona și turnate în amestec de Epon [30]. Secțiunile ultrafine obținute la ultramicrotomul Reihard după contrastarea dublă cu uranil-acetat și citrat de plumb au fost cercetate la microscopul electronic EM-200 și EMV-100L. Purificarea baculovirusurilor, deproteinizarea matricei proteice, eliberarea virionilor și obținerea

acizilor nucleici a fost efectuată printr-o adaptare a tehnicilor de laborator elaborate la Stațiunea de Patologie Comparată Saint-Cristol-Lez-Ales (Franța) și Universitatea din California (Davis, SUA) în conformitate cu indicațiile metodice elaborate anterior [2, 31].

Aplicarea endonucleazelor de restricție, electroforeza în agaroză și obținerea profilurilor restricționale a fost efectuată conform protocoalelor internaționale cu contribuția colegilor din Franța și SUA. Titrarea VPN a fost efectuată la microscopul optic, iar a VG - la microscopul electronic cu aplicarea unor tehnici elaborate în laboratorul nostru [31], care ameliorează considerabil activitățile de acest gen.

Determinarea calității insecticidelor virale a fost efectuată în conformitate cu cerințele Standardului de Stat, elaborat de către [30, 31] și care consideră în calitate de indiciu principal al calității nu numărul de poliedre, ci totalitatea de suprapoliviriocapsizi (SPVC) incluși în matricea proteică a incluziunilor virale.

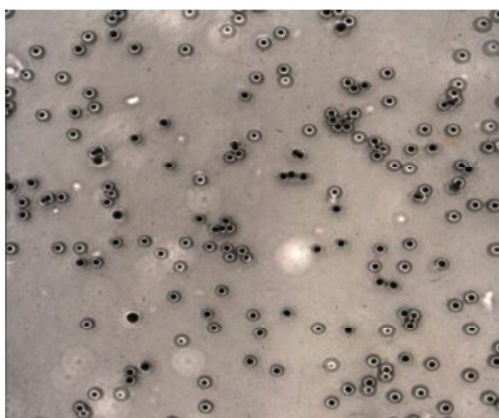
Testarea VPN și a preparatelor virale în prealabil tratate cu raze ultraviolete și la diferite temperaturi a fost efectuată după [15, 30].

### **Rezultate și discuții**

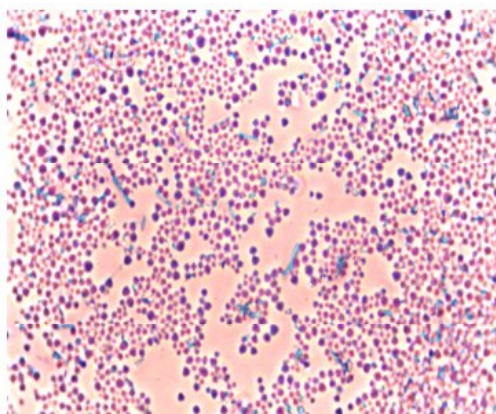
**Identificarea baculovirusurilor.** Aplicarea îndelungată a diferitor metode de identificare și cercetarea posibilităților de folosire a lor în procesele tehnologice de producere și aplicare a preparatelor baculovirale ne-au permis să constatăm că identificarea baculovirusurilor prezintă deficiențe serioase atât pe parcursul producerii insecticidelor virale, cât și pe parcursul cercetării multilaterale a baculovirusurilor. Anume din aceste considerente pentru ameliorarea activității de identificare a baculovirusurilor au fost editate mai multe indicații metodice și îndrumare [5, 14, 28]. În sistemul de metode elaborat de Ciuhrii M., și colab., [31] este prezentată o trecere în revistă a metodelor de identificare a baculovirusurilor și se fac recomandări referitor la aplicarea celor mai raționale metode de cercetare în anumite condiții. Cele mai raționale și accesibile metode de identificare a baculovirusurilor sunt metodele morfologice, care, grație diverselor tehnici de aplicare, permit nu numai determinarea particularităților morfologice (microscopia cu contrast de fază, colorarea, fig.1-2; contrastarea pozitivă și negativă, metalizarea), ci și a celor ultrastructurale (cercetarea secțiunilor ultrafine, fig.3-4), precum și determinarea relațiilor dintre diferite specii și subdiviziuni intraspecifice (microscopia imuno-electronică) și determinarea stării incluziunilor virale și a potențialului de infecție a virusului (microscopia electronică cu baleiaj, fig.5-7).

Perspective mari au fost deschise în identificarea baculovirusurilor odată cu elaborarea metodelor de determinare a potențialului de infecție și a numărului mediu (N) al fiecărui virus. Pentru aceasta au fost elaborate hărțile morfometrice, care permit determinarea frecvenței poliviriocapsizilor, ce conțin un anumit număr de nucleocapsizi. Practica aplicării acestor indici precum și a altor caracteristici morfologice a demonstrat justetea metodelor propuse și posibilitatea aplicării lor în identificarea baculovirusurilor [5, 17].

În scopul identificării morfometrice a baculovirusurilor studiate la aplicarea hărților morfometrice, se propune o nouă cale de cercetare a virusurilor în baza algoritmului de determinare a deosebirilor semnificative dintre două repartiții.



**Fig.1. Particularitățile VPN cercetate la microscopul cu contrast de fază**



**Fig.2. Aspectul incluziunilor de VPN colorate cu fuxină**

Compararea repartițiilor empirice a numărului de nucleocapsizi incluși în componența poliviriocapsizilor a două sușe virotice reprezentate în hărțile morfologice se efectuează în conformitate cu metoda de determinare a  $\chi^2$  după formula:

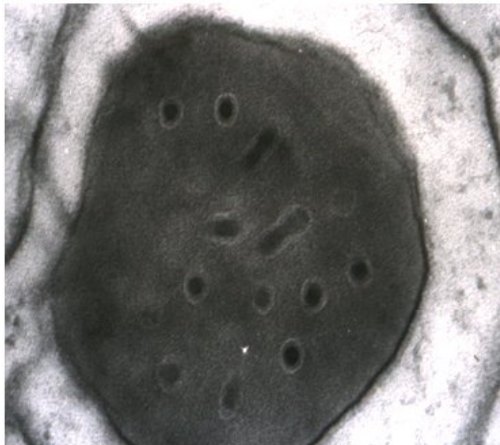
$$\chi^2 = \sum_{i=1}^k \frac{(n'i - n''i)^2}{(n'i + n''i)}$$

unde  $n'i$ ,  $n''i$  - reprezintă frecvențele corespunzătoare de clasă  $i$  a repartiției întâia ( $n'i$ ) și a repartiției a doua ( $n''i$ ),  $i = 1, 2, 3, \dots$ ,

$K$  - numărul de clase, ce indică la numărul maximal de nucleocapsizi, care se întâlnesc într-un poliviriocapsid.

Pentru aceasta dintr-o mulțime de date obținute în rezultatul analizei morfometrice inițial se determină numărul minimal de secțiuni ultrafine ale poliviriocapsizilor, care este suficient pentru a demonstra că la un anumit grad de încredere (95%) această totalitate face parte din specia etalon, în mod experimental s-a demonstrat că pentru caracterizarea speciei de VPN sunt necesare 150 de poliviriocapsizi. Altfel fiind spus, cu probabilitatea de 95% oricare submulțime întâmplătoare a masivului inițial de informație păstrează indicii statistici caracteristici speciei date de VPN.

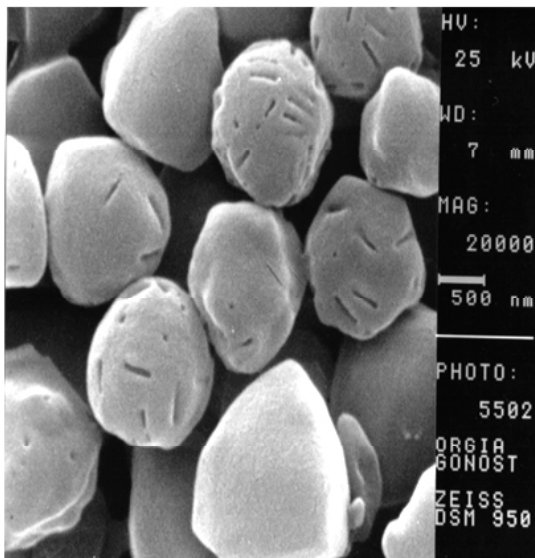
Dacă mărimea  $\chi^2$  determinată este mai mare decât  $\chi^2_{\alpha}(f)$  din tabelele standard, unde  $f=k-1$ , ce indică la numărul gradelor de libertate, iar  $\alpha$ - gradul de probabilitate ( $\alpha = 0,05=5\%$ ), apoi cu probabilitatea  $P > 1-\alpha$  repartițiile pot fi considerate diferite. Deci, aceste două mulțimi comparate au fost luate din hărțile morfometrice ale VPN ce fac parte din specii diferite. În caz contrar, când  $\chi^2 \leq \chi^2_{\alpha}(f)$ , ipoteza zero despre identitatea virusurilor din care au fost extrase mulțimile nu poate fi respinsă și, deci, virusurile comparate sunt identice.



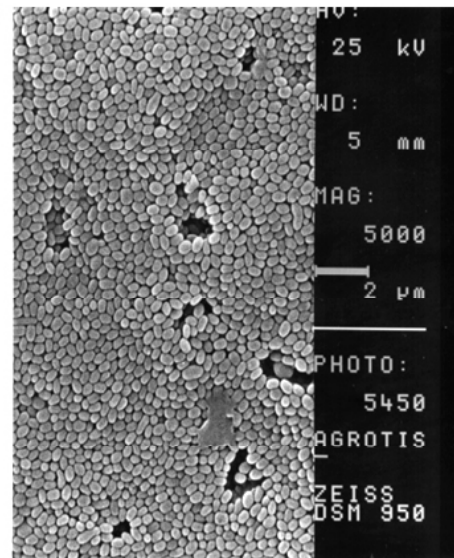
**Fig.3. Particularitățile ultrastructurale ale VPV *H.armigera* cu monovirioni**



**Fig. 4. Ultrastructura VPV *L.dispar* cu polivirioni**



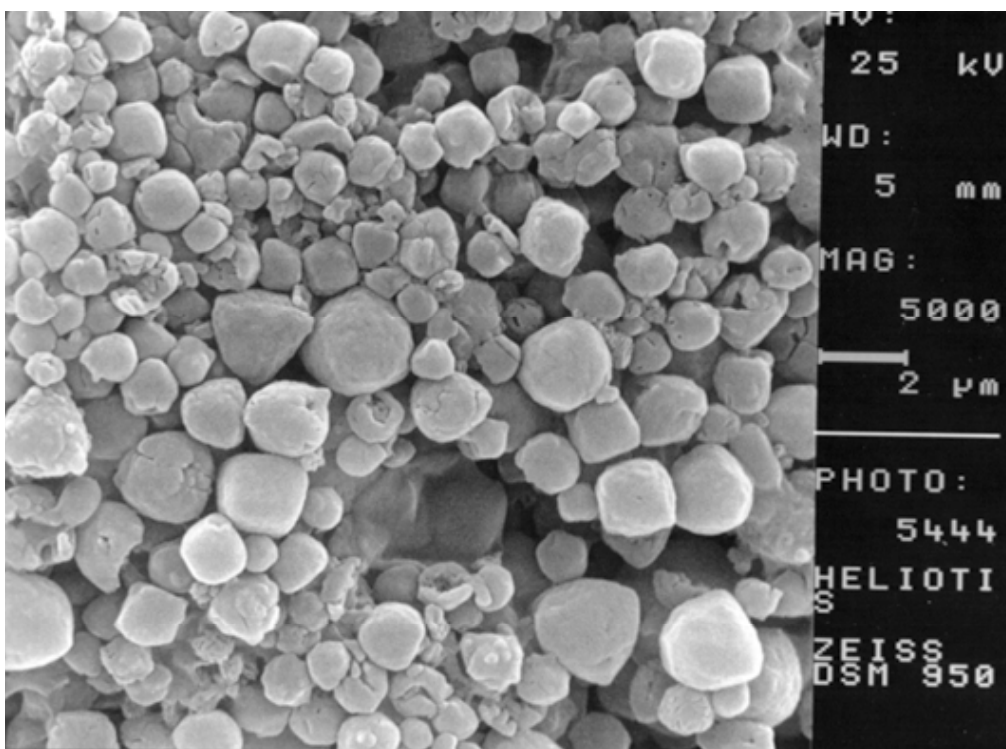
**Fig. 5. Aspectul VPV la microscopia electronică cu baleiaj**



**Fig. 6. Identificarea *A.segetum* la microscopul electronic cu baleiaj**

Cercetările efectuate pe parcursul mai multor ani au demonstrat că aplicarea metodelor morfometrice permite de a identifica atât baculovirusurile ce conțin doar numai virioni (VPV *H.armigera*, *O.brumata*, *E.defoliaria*), numai polivirioni (VPV *L.salicis*), precum și a celor ce conțin amestecul lor (VPV *M.brassicae*, *A.segetum*, *L.dispar*). A fost demonstrată stabilitatea repartiției virionilor în structura poliviriocapsizilor pe parcursul mai multor ani, precum și a diferitor populații de baculovirusuri din cadrul unei specii. Elaborarea metodei propuse și îndeosebi aplicarea variantei computerizate a ei deschide perspective mari atât pentru determinarea speciilor din cadrul genului VPV, cât și a variațiilor interpopulaționale din cadrul speciilor de baculovirusuri.

**Genetica baculovirusurilor.** Dintre factorii care au determinat interesul crescând față de baculovirusuri, pe lângă faptul că ele reprezintă o sursă eficientă de protecție biologică a plantelor, sunt schimbările condiționate de aplicarea a două metode avansate a biologiei moleculare și ingineriei genetice în domeniul virusologiei. Pe de o parte, aceasta este analiza restricțională, care a permis examinarea multilaterală și completă a genomului viral, iar pe de altă parte – practica clonării baculovirusurilor, care a permis analiza genetică a populațiilor virale și efectuarea manipulărilor genetice îndreptate spre ameliorarea sușelor de baculovirusuri, precum și aplicarea lor în operațiile geno-inginerice de obținere a diferitor substanțe biologice active deosebit de prețioase [6, 8, 18].



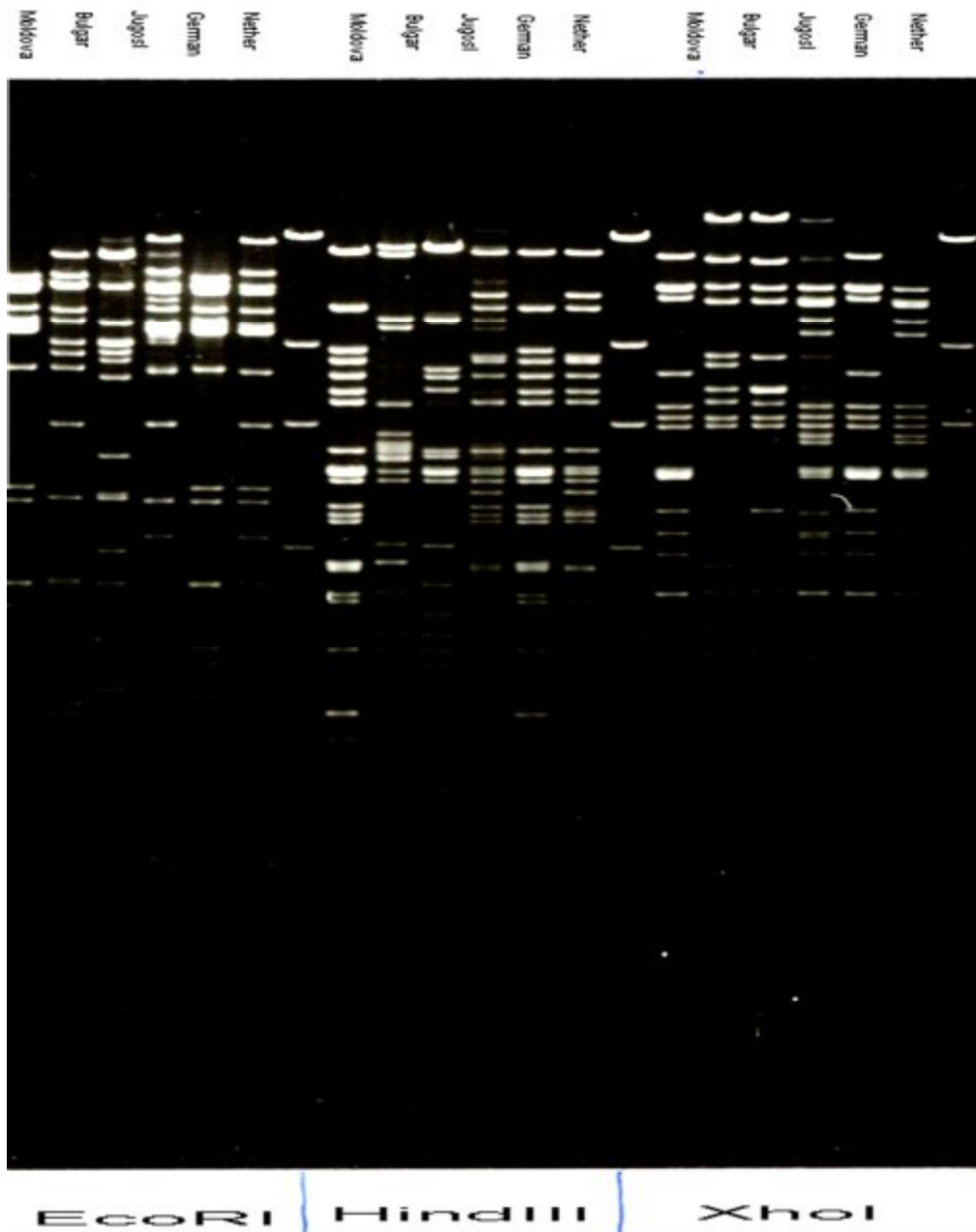
**Fig.7. Particularitățile morfologice ale VPN *H.armigera* la microscopul electronic cu baleiaj**

Deși mecanismele de acțiune a endonucleazelor de restricție au fost investigate din anii 70 ai secolului trecut, totuși încercările de aplicare a lor în problemele de identificare a baculovirusurilor au fost înregistrate mai recent [2, 3, 10, 26].

Necesitatea abordării cercetărilor genetice în virusologia insectelor este determinată de un șir de probleme teoretice și practice, printre care pot fi enumerate: care este stabilitatea populațiilor virale în timpul pasajărilor multiple și care pot fi schimbările în structura populațiilor naturale după aplicarea exogenă a preparatelor baculovirale; care este baza genetică a virulenței și agresivității baculovirusurilor și cum se poate dirija cu acești indici; care sunt mecanismele moleculare ce determina perioada latentă de reproducere a baculovirusurilor și care pot fi căile de reducere sau depășire a ei; care sunt mecanismele genetice de recombinare la baculovirusuri și care sunt căile de



sporire a activității lor biologice; care sunt mecanismele ce determină specificitatea baculovirală și cum ea poate fi depășită pentru obținerea preparatelor mixte; care sunt hărțile restricționale ale baculovirusurilor și cum ele pot fi utilizate la identificarea nu numai a speciilor de baculovirusuri, ci și a sușelor și subdiviziunilor intraspecifice [17, 22, 29].



**Fig.8. Rezultatele analizei restricționale a ADN din 5 populații (Moldova, Bulgaria, Serbia, Germania și Olanda) de *Cydia pomonella* cu 3 endonucleaze de restricție (EcoRI, HindIII, XhoI)**

Anume aplicarea metodelor genetice a permis de a demonstra că multe baculovirusuri, care anterior erau considerate diferite, reprezintă varietăți a speciei de VPN *Autographa californica*. În mod analogic noi am reușit să demonstrăm că Virusul granulozei (VG) *Pieris brassicae* și *Pieris rapae*, datorită capacității de retroinfecție, sunt varietăți ale aceleiași specii. S-a demonstrat că VPN *Mamestra brassicae* infectează larvele de *Helicoverpa armigera* [20, 24].

Cercetarea genomurilor baculovirale cu ajutorul endonucleazelor de restricție a demonstrat că una și aceeași specie de insecte poate fi infectată cu virusuri ce reprezintă diferite specii, lucru ce trebuie să fie luat în considerație atât la producerea preparatelor baculovirotice, cât și la aplicarea largă a lor. Noi considerăm că anume din această cauză au fost semnalate mai multe cazuri de eficiență biologică redusă a preparatelor virale și de obținere a masei baculovirale la care lipseau nucleocapsizii - în calitate de purtători ai informației genetice de asigurare a procesului de infecție.

Actualmente endonucleazele de restricție, alături de analiza morfometrică, pe bună dreptate, ocupă locul de frunte în cercetarea baculovirusurilor. Anume folosind aceste metode a devenit posibil de a lărgi noțiunea de specificitate a baculovirusurilor [23], ceea ce a determinat necesitatea de a schimba definiția teoretică despre specia de virus ca un agent patogen al unei anumite specii de insecte cu noțiunea de populație virotică [17, 20]. Cele menționate reprezintă un interes deosebit pentru specialiștii din domeniul taxonomiei. Această definiție devine indispensabilă atât pentru epidemiologi și specialiștii din protecția plantelor, cât și cei din domeniul biologiei moleculare și ingineriei genice. Ea corespunde cerințelor Comitetului Internațional de Taxonomie a Virusurilor [15].

Anume asemenea abordare a problemei ne-a permis să demonstrăm că specificitatea baculovirusurilor poartă un caracter relativ. A devenit posibilă lărgirea spectrului de acțiune a baculovirusurilor de la nivelul de specie până la nivelul de gen și chiar familie. Din rezultatele înregistrate merită atenție acel fapt că pe parcursul infectării nespecifice se atestă o majorare considerabilă a activității biologice. Aceasta se referă atât la micșorarea dozei letale ( $DL_{50}$ ), cât și la reducerea timpului letal ( $TL_{50}$ ) de la 7-8 zile până la 5-5,5 zile.

Pe lângă faptul că endonucleazele de restricție permit cel mai perfect de a obține informație științifică despre asemănarea sau deosebirea dintre diferite baculovirusuri, precum și contribuie la sporirea activității biologice a baculovirusurilor, ele mai sunt pe larg aplicate și în scopul efectuării diferitor experiențe de obținere a produselor genoinginerice foarte valoroase. Începând cu prima comunicare despre posibilitatea folosirii baculovirusurilor în acest sens, au urmat un șir de cercetări, care ulterior au căpătat caracter de avalanșă, demonstrând avantajele expresării diferitor gene în sistemele baculovirotice. Astfel au fost obținute proteinele structurale ale numeroaselor virusuri, antigeni, diagnosticumuri, hormoni de creștere, substanțe biologice active (interferonuri, insulina), toxine ș.a. Sistemele de expresie a genelor cu ajutorul baculovirusurilor se aplică intens pentru obținerea proteinelor active, codificate de către genele străine baculovirusurilor. Pentru aceasta gena străină se donează în plasmidele bacteriene, care se află sub controlul promotorului poliedric foarte puternic și care este obținut din moleculele de ADN baculoviral. După obținerea unei asemenea sisteme, unde în calitate de vector servește ADN baculoviral, se efectuează cotransfecția celulelor de insecte în



care se produce nu proteina virală, ci cea străină codificată de către gena intercalată cu genomul virusului. În așa mod deja au fost obținute cantități considerabile de proteine deosebit de valoroase: proteinele capsizilor Virusului SIDA,  $\alpha$ -interferonului, hemaglutinina virusului gripei, eritropoetinel omului, proteinele diferitor virusuri oncogene [1, 4, 5, 11, 12, 20, 21].

În scopul identificării baculovirusurilor, care nu pot fi determinate prin metodele morfometrice, noi am efectuat analiza restricțională a 3 reprezentanți ai Virusului Granulozei (VG). În colaborare cu colegii francezi au fost obținute profilurile restricționale a VG *H.cunea*, VG *A.segetum*, precum și analiza comparativă a ADN din 5 populații a VG *C.pomonella* cu aplicarea a 3 endonucleaze de restricție (fig.8).

Este evident că aplicarea metodelor geno-inginerice deschide perspective mari atât în cercetarea multilaterală și identificarea baculovirusurilor, precum și elaborarea procedurilor biotehnologice de producere a insecticidelor baculovirale eficiente și de obținere a substanțelor biologic active valoroase.

### Concluzii

Necesitatea elaborării metodelor eficiente de identificare a baculovirusurilor este determinată atât de problemele ce țin de controlul calității preparatelor virale, cât și de tendințele aprofundării cunoștințelor și aplicării lor în operațiile geno-inginerice de obținere a produselor biotehnologice valoroase.

Dintre diversele metode de identificare a baculovirusurilor, cele mai eficiente sunt metodele microscopiei electronice și analizei restricționale. Aplicarea microscopiei electronice cu baleiaj în mare măsură asigură identificarea corectă a baculovirusurilor și determinarea stării agentului patogen. A fost elaborată o metodă de diferențiere a VPN după numărul nucleocapsizilor incluși în componența poliviriocapsizilor, precum și numărul total al lor în structura poliedrilor.

A fost efectuată, aplicând 3 endonucleaze de restricție (EcoR1, HindIII, XhoI), analiza restricțională a 3 specii de baculovirusuri: VG *H.cunea*, VG *C.pomonella*, VG *A.segetum*, precum și a 5 populații de VG *C.pomonella*.

Aplicarea metodelor genetice de cercetare asigură nu numai determinarea structurii populaționale a baculovirusurilor, ci și sporirea activității biologice a lor. Infectarea larvelor de *H.armigera* cu virusul nespecific de VPN *M.brassicae* a indus sporirea activității biologice de 2-3 ori și reducerea timpului letal cu 2-2,5 zile.

Devine evident că sistemele de expresie a genelor cu ajutorul vectorilor baculovirali reprezintă unul dintre cele mai comode modele pentru obținerea diferitor substanțe biologic active, cum ar fi interferonii, vaccinurile, diagnosticurile valoroase pentru depistarea virusurilor, regulatorilor de creștere, neurotoxinelor, hormonilor juvenili ș.a.

### Bibliografia

1. Beckage N.E., Thomson S.N., Federici B.A. Parasites and Pathogens of Insects. Vol.2., Academic Press, 1993, 356p.
2. Bilimoria S.L. The Biology of Nuclear Polyhedrosis Viruses. //Viruses of Invertebrates. (By E.Kurstak, ed.). New-York, 1991, p. 1-72.
3. Biopesticides: Pest Management and Regulation, by D. Chandler, J Greaves, G Prince, M Tatchell, A Bailey. CABI, 2010, 256p.

4. *Ciuhrii M.* Terapii miraculoase. București: Mirabilis. 2005, 381p.
5. *Chukhrii M., Voloshchuc L., Popushoi L.* Identification of nuclear polyhedrosis viruses according to morphological parameters. *YI Intern. Colloquium on invertebrate pathology and microbial Control.* Montpellier, 1994, V.2, p.250.
6. *Dwight E.L., Jan W.M. van Lent, Monique M. van Oers, Just M.Vlak.* Replication of *Agrotis segetum* granulovirus in continuous insect cell lines. 42 Annual Meeting of the SIP. Utah, 2009, p.55.
7. *Ecologically-Based Integrated Pest Management* Edited by *O Koul, G W Cuperus*, CABI. 2007, 480p.
8. *Genetics, evolution and biological control.* Editors(s): *Ehler, L. E. Sforza, R. Mateille, T.* CABI, 2004, 260p.
9. *Global Development of Organic Agriculture: Challenges and Prospects.* Edited by *N Halberg, H F Alroe, M T Knudsen, E S Kristensen*, CABI, 2006, 384p.
10. *Hee Jin Shim, Jae Young Choi, Yong Wang.* Efficient and eco-friendly recombinant baculovirus insecticide. 42 Annual Meeting of the SIP. Utah, 2009, p.52.
11. *Li J., Heinz K., Flexner J., McCutchen B.* Effects of Recombinant Baculoviruses on Three Nontarget Heliothine Predators. // *Biological Control.* 1999, 21(2), p.293-302.
12. *Kogan M.* Sustainable development and integrated pest management. XXI International Congress of Entomology. Brazil, 2000, p.XXVIII-XXXII.
13. *Lacey L.A., Goettel M.S.* Current developments in microbial control of insect pests and prospects for the early 21st century. // *Entomophaga*, 1995, 40 (1), p. 3-27.
14. *Lacey L., Frutos R., Kaya H., Vail P.* Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future? // *Biological Control.* 2001, 21, p.230-248.
15. *Maeda S.* Expression of foreign genes in insect cells using baculovirus vectors. // *Insect cell Biotechnology.* CRS Press, 1996, p. 1-31.
16. *Moore S.D., Pittaway T., Bouwer G., Fourie J.G.* Evaluation of *Helicoverpa armigera* Nucleopolyhedrovirus (HearNPV) for Control of *armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) on Citrus in South Africa. // *Biocontrol Science and Technology.* 2004, 14(3), p.239-250.
17. *Popușoi L, Voloșciuc L.* *Biotehnologia: realizări și perspective de dezvoltare în Moldova.* // *Buletinul A.Ș.M.*, 1994, 6, p.3-9.
18. *Van Lenteren, J. C.* Quality control and production of biological control agents: theory and testing procedures. CABI, 2003, 340p.
19. *Vincent, M S Goettel, G. Lazarovits.* *Biological Control: A Global Perspective.* CABI, 2007, 464p.
20. *Voloșciuc L.T.* Bazele teoretico-metodologice ale biotehnologiei producerii și aplicării preparatelor baculovirotice în protecția plantelor. Autoreferat al tezei de doctor habilitat în biologie. Chișinău. 2000, 40 p.
21. *Voloșciuc L.T.* Preparatele biologice – mijloc eficient pentru protecția mediului înconjurător. // *Buletinul AȘM. Științe biologice, chimice și agricole.* Nr. 2 (293). Chișinău. 2004, p.8-13.
22. *Voloșciuc L.T.* *Agricultura ecologică și organismele modificate genetic. Mater.Confer.intern. științifico-practice „Agricultura durabilă, inclusiv ecologică – realizări, probleme, perspective”.* Bălți, 2007, p.174-177.
23. *Voloșciuc L.* *Biotehnologia producerii și aplicării mijloacelor biologice de protecție a plantelor în agricultura ecologică. Confer. șt. naț. cu participare internaț. “Probleme actuale ale microbiologiei și biotehnologiei.* Chișinău. *Inst. Microbiol. și Biotehnologie”.* 2009, p. 103-104.
24. *Voloșciuc L.* *Biotehnologia producerii și aplicării preparatelor baculovirale în protecția plantelor.* Chișinău. // *Mediul ambiant.* 2009, 262p.
25. *Williams T., Goulson D., Caballero P., Cisneros J., Martinez A., Chapman J., Roman D., Cave R.* Evaluation of a Baculovirus Bioinsecticide for Small-Scale Maize Growers in Latin America. // *Biological Control.* 1999, 14, p.67-75.
26. *Волощук Л.Ф.* Электронная микроскопия – надежный метод определения качества биопрепаратов. Тезисы докладов XXI Российской конференции по электронной микроскопии. Черноголовка, 2006, с.117.
27. *Волощук Л.Ф.* Достижения и перспективы развития биологической защиты растений в Республике Молдова. // *Информационный бюллетень ВППС МОББ. № 38.* Санкт-Петербург, 2007, с. 69-76.
28. *Волощук Л.Ф.* Перспективы селекции высоковирулентных штаммов энтомопатогенных

- вирусов. Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии. Матер. межд. научн. конференции. том.2. Минск, 2008, с. 392-395.
29. Волощук Л.Ф. Экологическое земледелие – надежный путь устойчивого развития сельского хозяйства Молдовы. // Карантин и захист рослин. Киев, 2009, № 6. с. 15-17.
30. Чухрий М.Г. Биология бакуловирусов и вирусов цитоплазматического полиэдроза. Кишинев, 1988, 240с.
31. Чухрий М.Г., Волощук Л.Ф., Катана В.Д., Менчер Э.М. Система методов идентификации вирусов ядерного полиэдроза. Кишинев: Штиинца, 1991, 44с.

## **АНТАГОНИСТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ГРИБА *TRICHODERMA VIRENS* ПО ОТНОШЕНИЮ К ПАТОГЕНАМ *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM* И *FUSARIUM SP***

**Щербакова Татьяна, Попшой Ион, Одобеску Василиса**

*Институт защиты растений и экологического земледелия  
Академии Наук Молдовы*

### **Введение**

Антагонистические взаимодействия грибов широко используют в практике защиты растений. В настоящее время в борьбе с фитопатогенными микроорганизмами применяют грибы рода *Trichoderma* и биопрепараты, созданные на их основе [1, 2, 8]. Проявления антагонизма этих грибов выражаются в виде микопаразитизма, антибиоза, конкуренции за питательные вещества и за пространство, устойчивости к стрессам, инактивации ферментов патогенов и др. [2, 6].

Механизмы антагонистических взаимодействий почвенных микроорганизмов и фитопатогенов различны, но наиболее хорошо изучен и важен с точки зрения практического использования синтез биологически активных веществ [2, 5, 16]. Эти вещества обладают высокой физиологической активностью, угнетают или полностью подавляют жизненные процессы ряда фитопатогенных грибов и бактерий, что и позволяет им достаточно быстро вытеснять из субстратов патогенную микрофлору. [1, 2, 5, 6].

Кроме того, продукты жизнедеятельности грибов, в том числе грибов рода *Trichoderma*, способны усиливать обмен веществ, увеличивать всхожесть семян, ускорять развитие растений, повышать накопление запасных веществ и влиять на характер биохимических процессов. Это объясняет успешное применение микроорганизмов-антагонистов в защите растений [1, 2, 8].

Большое число научных работ показывает, что отдельные штаммы рода *Trichoderma* способны контролировать различные фитопатогены на широком спектре растений. Путем длительной селекции из большого числа активных штаммов отбирают микроорганизмы, которые хорошо приживаются в ризосфере или на корнях растений и способны контролировать рост возбудителей болезней, колонизировать фитопатогены (зона нарастания) и ингибировать их развитие (зона отсутствия роста) [6, 9]. Для многих сельскохозяйственных культур