

REZUMAT

« STUDIUL PRIVIND FACTORII CARE DETERMINĂ EFICACITATEA CIUPERCII ENTOMOPATOGENE *BEAUVERIA BRONGNIARTII* ÎN COMBATEREA DĂUNĂTORILOR EDAFICI »

elaborată de drd. GONȚEA (FĂTU) ANA-CRISTINA

sub îndrumarea Prof.univ.dr. IOAN ROȘCA

Cuvinte cheie: *Beauveria brongniartii*, *Melolontha melolontha*, entomopatogen, bioinsecticid, pepiniere

Cărăbușii (Coleoptera: Scarabeidae) sunt considerați dăunători foarte importanți pentru culturile agricole, horticole și silvice din România. Larvele acestora trăiesc în sol, iar adulții pe coronamentul arborilor. Larvele atacă rădăcinile plantelor determinând pierderi substanțiale calitative și cantitative. În pepinierele și plantațiile silvice, dăunătorii de rădăcină reprezintă principalul factor biotic de stres. În ultimele două decenii, *Melolontha melolontha* L. (cărăbușul de mai), dar și alte specii de cărăbuși (*Polyphylla fullo*, *Anoxia pilosa*, *A. orientalis*, *Anomala dubia*, *A. solida*, *Amphimallon solstitiale*, *A. caucasicum*, *Rhizotrogus aestivus*, *R. aequinoctialis*, *Anisoplia* sp.) au înregistrat înmulțiri în masă și au produs pagube însemnate în culturile din pepinierele silvice. Dintre cărăbuși, specia cea mai frecventă și care poate produce pagube de importanță economică în culturile de puiți din pepiniere este cărăbușul de mai care, în perioada 2012-2013 s-a aflat în faza de erupție în majoritatea zonelor țării. Cele mai păgubitoare sunt larvele (viermii albi) aflate în ultimul stadiu larvar, înainte de împupare. Limitarea utilizării insecticidelor chimice în combaterea acestei categorii de dăunători a impus acordarea unei atenții deosebite măsurilor alternative de combatere. Dintre acestea, utilizarea fungului entomopatogen *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch (Hypocreales: Clavicipitaceae) prezintă un real interes, dovedindu-se a fi cel mai eficient agent de combatere biologică a cărăbușului de mai.

Teza de doctorat cu titlul „Studiu privind factorii care determină eficacitatea ciupercii entomopatogene *Beauveria brongniartii* în combaterea dăunătorilor edafici” prezintă o serie de cercetări care urmează etapele dezvoltării unui bioinsecticid.

Prima etapă a constat în colectarea și izolarea patogenilor fungici din focare naturale de infecție reprezentate de larve de *M. melolontha* prelevate din pepiniere silvice care prezentau infestări puternice. Identificarea pe criterii morfologice a izolatelor fungice a fost urmată de caracterizarea genetică a acestora pe baza unor markeri moleculari separați (ITS , EF-1 α , 18s și 28s). S-a utilizat comparativ și o tulpină de *B. brongniartii* dintr-o colecție internațională de microorganisme. S-au efectuat analize de secvențiere și reconstrucție filogenetică realizându-se comparații cu alte tulpini existente în baza de date, înregistrându-se un grad mare de înrudire a izolatelor românești chiar la nivel intraspecific, formând o subcladă compactă din clada *Beauveria brongniartii*.

S-a studiat efectul temperaturii și umidității relative asupra germinației conidiilor de *B. brongniartii*, cei mai importanți factori pentru inițierea procesului de infecție. Germinația a fost examinată la temperaturi cuprinse între 4° și 33 °C, pe mediu de cultură solid. Efectul umidității relative a fost testat utilizând soluții saturate. Rezultatele au arătat că germinația a avut loc la temperaturi cuprinse între 15,5 și 25°C. Nicio tulpină fungică din cele trei tulpini testate (ICDPP #2, ICDPP#3 și ICDPP#4) nu a geminat la temperaturi joase (4° și 10°C). O singură tulpină (ICDPP#3) a germinat la temperaturi înalte (30° și 33°C). Incubarea conidiilor la un nivel redus al umidității relative (29% UR) a inhibat germinarea acestora la tulpinile testate. Rezultatele obținute au arătat că umiditatea relativă cu valori cuprinse între 52,6% și 100% nu reprezintă un factor limitativ pentru germinația conidiilor.

În următoarea etapă, cele trei tulpini de *B. brongniartii* au fost testate *in vivo* pe larve de *M. melolontha*, *A. villosa* și *A. solstitiale* în scopul selectării unei tulpini virulente care să poată fi folosită în investigații ulterioare. Evaluarea patogenității *B. brongniartii* s-a făcut în paralel cu un izolat autohton de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Larve de vârstă a treia au fost tratate prin imersare în suspensii conidiene cu titrul de 1×10^7 conidii /ml. Rezultatele au arătat că cea mai mare rată a mortalității s-a datorat infecției cu *B. brongniartii* (100% în cazul larvelor de *M. melolontha* și 60% în cazul larvelor de *A. villosa*), după 60 de zile de incubare. *M. anisopliae* a determinat o rată scăzută a mortalității (sub 35%) pentru toate cele trei specii de insecte testate. Tulpinile de *B. brongniartii* au manifestat același grad de virulență față de larvele de *M. melolontha*.

Etapă de prelucrare biotehnologică a tulpinii de *B. brongniartii* în vederea obținerii de biopreparate granulate a vizat selectarea mediului de cultură care să asigure obținerea unui inocul fungic corespunzător din punct de vedere cantitativ și calitativ. Folosind tulpina ICDPP #2, s-a evaluat influența compoziției a patru medii de cultura lichide (Catroux, Paris, Goral și Kondryatiev) asupra producerii de propagule, biomasă miceliană și asupra formei și dimensiunii propagulelor

fungice. În mediul Catroux s-a obținut cea mai mare concentrație de propagule ($5,7 \pm 4,4 \times 10^9$ propagule /ml) după 96 de ore, precum și cea mai mare cantitate de biomasă miceliană ($9,41 \pm 3,53$ mg/ ml) după 120 de ore de incubare în condiții de agitare (150 rpm), la o temperatură de 25° C. De asemenea, s-a verificat dacă patogenitatea biopreparatului insecticid este influențată de compoziția mediului de cultură în care s-au format propagulele folosite ulterior ca inocul pentru produsul final. În acest scop, larve de *M. melolontha* au fost tratate cu suspensii conidiene (1×10^7 conidii/ml) obținute din biopreparatul insecticid. Evaluarea mortalității larvare pe parcursul a 52 de zile a arătat că nu există diferențe semnificative din punct de vedere statistic privind timpul mediu de supraviețuire (log-rank 0,39); cel mai mic timp de supraviețuire (27 de zile) s-a înregistrat în urma tratamentului cu biopreparat inoculat cu cultura fungică obținută pe mediu Catroux.

Pe baza însușirilor biotehnologice și de patogenitate, tulpina de *B. brongniartii* ICDPP#2 a fost selectată pentru aplicare în teren sub forma unui biopreparat fungic formulat pe boabe de orz colonizate de miceliu fungic sporulat (BioMelCon) pentru combaterea larvelor de *M. melolontha* din sol, sau formulat ca suspensie conidiană pentru aplicații foliare împotriva adulților de *M. melolontha*, în pepiniere și plantații silvice.

Testele din teren au fost efectuate în decursul anilor 2010-2013, în pepiniere din județele Botoșani, Neamț și Suceava, aflate în condiții staționale diferite, care prezentau un nivel de infestare naturală cu *M. melolontha* foarte mare ($>1L_3/m.p.$). Tratamentele au fost aplicate doi ani consecutivi cu doze care au variat de la 100 la 200 kg/ha, suprafețele tratate acumulând concentrații de 2 până la 5×10^{15} conidii /ha. Tratamentele efectuate pe larvele de *M. melolontha* au determinat reducerea densității populațiilor de cărăbuși cu 66,7 -100%, nivelul mortalității produse de ciupercă având tendința de a crește odată cu creșterea dozei de biopreparat administrat în sol. Rezultatele privind efectul tratamentelor aplicate la sol doi ani consecutiv nu au demonstrat în mod constant o corelație pozitivă între doza de biopreparat și mortalitatea larvară indusă de acesta. Astfel, la doza cumulată în cei doi ani, de 200 kg/ha mortalitatea a variat de la 43,8% la 100%, la doza de 300 kg/ha de la 50 la 69,7% iar la doza de 40 kg/ha mortalitatea a fost cuprinsă între 75% și 100%. Rezultatele observațiilor efectuate în terenurile experimentale privind densitatea populațiilor de *M. melolontha* precum și gradul de colonizare fungică a solului, înainte și după aplicarea tratamentelor confirmă faptul că reducerea populațiilor de cărăbuși s-a datorat tratamentelor cu *B. brongniartii*.

Prezența zborului de cărăbuși în primăvara anului 2012 în unele zone din nordul Moldovei a permis experimentarea unor procedee de combatere a adulților și anume prin tratarea hranei reprezentată de plantele gazdă precum și prin aplicarea directă a conidiilor de *B. brongniartii* pe adulți capturați la capcane luminoase; s-a aplicat procedura îmbăierii adulților de *M. melolontha*

urmata de eliberarea acestora în teren. Scopul acestui studiu a fost de a evalua posibilitatea utilizării adulților ca vector al entomopatogenului în ariile de înmulțire a dăunătorului. Efectul aplicării directe a biopreparatului pe adulți s-a manifestat după un an înregistrându-se o eficacitate de 100%. În cazul aplicării tratamentelor foliare în pepiniere infestate cu adulți de *M melolontha*, s-a înregistrat în toamna aceluiași an eficacitate de 100%, măsurată prin evaluarea densității larvelor din sol.

S-a evaluat de asemenea efectul pe care l-au avut tratamentele cu *B. brongniartii* asupra mezofaunei edafice într-un interval de doi ani. Rezultatele analizei cantitative a faunei edafice au arătat că densitatea microartropodelor edafice a fost de circa 2 ori mai scăzută la un an după tratament, comparativ cu martorul, în cazul pepinierele testate; după doi ani, s-a constatat o refacere evidentă a efectivelor populaționale. Din punct de vedere calitativ, s-a observat atât în probele martor, cât și în cele provenite din perimetrele aflate sub tratament, dominarea numerică a acarienilor față de insecte, cu procente cuprinse între 61,77-99,48% din totalul mezofaunei.

Insectele au fost reprezentate în special de colebole (peste 70%), care însă, au lipsit în variantele analizate la un an după aplicarea tratamentelor, iar în rest, au avut densități foarte scăzute, în ansamblul mezofaunei, având valori procentuale mici, doar de 0,78-3,73%. Absența colebolelor în variantele cu tratament aplicat în 2012 au arătat că acestea sunt unul dintre grupele afectate, efectul fiind maxim la un an de la tratamentul biologic, ca și în cazul altor grupe de microartropode, de exemplu oribatidele. S-a constatat, de asemenea, că în cel de-al doilea an de la aplicare parametrii structurali ai cenzelor de oribatide au avut tendința de a reveni la valori comparabile cu martorul, așadar impactul tratamentelor nu a fost unul sever, de durată.

Rezultatele analizei principalilor indicatori de calitate și fertilitate a resurselor de sol pe care au fost amplasate experiențele au relevat faptul ca tratamentele cu bioinsecticid au determinat o ușoară creștere a conținutului de humus și a gradului de saturație cu baze, comparativ cu varianta martor. De asemenea, s-a mai constatat o creștere a metabolismului microflorei. Bioinsecticidul pe bază de *B. brongniartii* a avut un efect pozitiv asupra respirației solului, activității dehidrogenazei și asupra indicatorului sintetic biologic în pepinierele testate. Efectele pozitive cele mai relevante s-au observat în perioada imediat următoare aplicării bioinsecticidului.