

REZUMAT

al tezei de doctorat intitulată:

EXPLORAREA POTENȚIALULUI BIOTEHNOLOGIC AL UNOR FUNGI ENTOMOPATOGENI ÎN VEDEREA UTILIZĂRII ACESTORA ÎN CONTROLUL BIOLOGIC

Doctorand: **DINU Mihaela Monica**

Conducător științific: **Prof. univ. Dr. Narcisa Băbeanu**

CUVINTE-CHEIE: fungi entomopatogeni, control biologic, biotehnologii agricole

Controlul biologic este o alternativă ecologică la protecția chimică a culturilor iar unele specii de fungi entomopatogeni sunt utilizate cu succes în controlul biologic al unor artropode dăunătoare.

Scopul acestei teze de doctorat a fost *obținerea sursei de material biologic pentru bioproduse pe bază de tulpini fungice entomopatogene, în vederea utilizării în controlul biologic al dăunătorilor.*

În vederea realizării scopului propus, cercetările întreprinse în realizarea prezentei teze de doctorat au vizat următoarele **obiective generale:**

Obiectiv 1: Izolarea fungilor entomopatogeni;

Obiectiv 2: Evaluarea cerințelor specifice de cultivare în masă și a activității insecticide a izolatelor fungice obținute;

Obiectiv 3: Selectarea izolatelor în vederea producerii de micoinsecticide;

Obiectiv 4: Caracterizarea genetică a izolatelor selectate.

Teza este structurată în șapte capitole. În Capitolele I și II sunt prezentate informații despre domeniul controlului biologic, fungii entomopatogeni, producerea și formularea de produse bioinsecticide. Capitolele III-VI prezintă cercetările proprii iar în capitolul VII sunt prezentate concluziile generale, elementele de noutate și recomandări privind direcțiile viitoare de cercetare.

În vederea identificării fungilor entomopatogeni, au fost analizate 198 de probe biologice: adulți și larve de insecte, probe de sol din diferite locații și fragmente vegetale. S-au utilizat metode clasice microbiologice de izolare, purificare și cultivare a acestor tipuri de fungi și au fost obținute 26 izolate: 2 prin izolare endofită, 5 prin

metoda spălării solului, 5 prin metoda insectelor capcană și 14 prin izolare directă de pe insecte moarte. Acestea au fost identificate pe baza caracteristicilor morfologice ca aparținând Ordinului Hypocreales, respectiv genurilor *Beauveria*, *Metarhizium*, *Lecanicillium* și *Purpureocillium* și Ordinului Entomophthorales, respectiv genurilor *Pandora* și *Entomophthora*.

În urma evaluării, 12 izolate fungice entomopatogene au fost selectate pentru următoarea etapă: nouă izolate monosporale din Ordinul Hypocreales, cu o creștere bună pe mediu solid și a căror conidii nu au germinat la 37°C, precum și trei izolate din Ordinul Entomophthorales. Acestea au fost evaluate din punct de vedere al creșterii vegetative, al capacității de sporulare pe medii de cultură și al activității insecticide față de insecte crescute în laborator, prin metode microbiologice clasice, în funcție de cerințele grupei taxonomice. Pentru izolatele identificate ca aparținând Ordinului Hypocreales activitatea insectcidă a fost evaluată asupra larvelor de *Plodia interpunctella* (Hubner) (Lepidoptera: Pyralidae), iar pentru izolatele aparținând Ordinului Entomophthorales activitatea insectcidă a fost evaluată asupra adulților și larvelor de *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). Cele mai mari procente de mortalitate au fost înregistrate la insectele infectate cu fungi aparținând Ord. Entomophthorales, dar creșterea vegetativă pe mediul de cultură selectat a fost redus, confirmând cercetările din domeniu. Având în vedere rezultatele acestui screening, pentru următoarele studii au fost selectate trei izolate aparținând genului *Beauveria*, respectiv ICDPP22-1 (izolat direct de pe un lepidopter neidentificat), ICDPP22-2 (izolat din plante de cartof *Solanum tuberosum* L. – creștere endofită) și ICDPP23-2 (izolat direct de pe un adult de *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae).

În următoarea etapă, a fost evaluată influența factorilor abiotici asupra numărului de propagule, germinației sporilor și activității insecticide asupra insectei *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae). În vederea evaluării influenței mediului de cultură asupra producerii de propagule, au fost testate opt surse de carbon (melasă, glucoză, fructoză, maltoză, amidon, arabinoză, celuloză) și cinci surse de azot (peptonă, tarâte de grâu, extract de porumb, extract de drojdie și șrot de in). Mediul cu melasă s-a dovedit a fi cel mai eficient ca sursă de carbon pentru izolatele analizate iar utilizarea diferitelor surse de azot nu a modificat semnificativ concentrația de propagule a izolatelor testate. Odată cu dezvoltarea coloniilor fungice, influența mediului a devenit mai pronunțată.

Pentru a evalua impactul pH-ului inițial al mediului asupra producției de propagule, pH-ul a fost ajustat în intervalul 4,0 - 6,5, menținând temperatura constantă la 24°C. Studiul a evidențiat faptul că pH-ul optim pentru producția de propagule, pentru cele trei izolate analizate a fost cuprins între 5,0 și 5,5. Intervalul optim al valorilor pH-ului pentru producția de propagule a fost similar pentru toate cele trei izolate, situându-se între 5,0 și 6,5, fără a se înregistra diferențe semnificative între acestea. Germinația sporilor a fost evaluată la temperaturi cuprinse între 5°C și 35°C și la următoarele valori ale umidității relative 29,8%, 52,6%, 75,3%, 84,7%, 92,7% și 100%. Intervalul de temperatură optimă pentru germinare, pentru toate izolatele

studiate, a fost cuprins între 20°C și 22°C, înregistrându-se rate de germinare maxime (>99%). Izolatul ICDPP21-1 a demonstrat o adaptare la temperaturi ridicate (28°C, 30°C) iar izolatele ICDPP22-2 și ICDPP23-2 o capacitate sporită de germinare la 15°C. Conidiile izolatelor fungice nu au germinat la 5°C, 10°C și 35°C. Germinația conidiilor a debutat la o umiditate relativă egală sau mai mare de 52,6%. Analiza activității insecticide a izolatelor fungice cultivate în diferite medii lichide a evidențiat un impact semnificativ al sursei de carbon asupra mortalității insectelor dar analiza statistică nu a evidențiat variații semnificative între cele trei tulpini fungice.

Analizele moleculare au confirmat apartenența celor trei izolate entomopatogene, inițial identificate pe baza caracteristicilor morfologice, la genul *Beauveria*. Rezultatele secvențierii regiunilor ITS ale izolatului ICDPP22-1 au dus la identificarea acestuia ca aparținând speciei *Beauveria pseudobassiana* S.A. Rehner & Humber, iar secvențierea regiunilor ITS și a domeniului D1/D2 al subunității mari (26S) din ARN-ul ribozomal (ARNr) al izolatelor ICDPP22-2 și ICDPP23-2, a condus la concluzia că izolatele sunt foarte asemănătoare din punct de vedere genetic și că acestea ar putea fi clone ale aceleiași tulpini de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Izolatul endofit a fost obținut din plante de cartof tinere, în perioada în care nu exista infestare cu *L. decemlineata* în cultura respectivă.

Elementele de noutate ale tezei de doctorat cu titlul „Explorarea potențialului biotehnologic al unor fungi entomopatogeni în vederea utilizării acestora în controlul biologic” sunt: (1) Izolarea, identificarea și caracterizarea a trei noi tulpini fungice entomopatogene autohtone, cu potențial biotehnologic pentru dezvoltarea de bioinsecticide; (2) Caracterizarea din punct de vedere al potențialului biotehnologic a unei tulpini fungice entomopatogene care colonizează plantele de cartofi, identificată pentru prima oară în România; (3) Acesta este primul studiu din România care prezintă etapizat izolarea, identificarea și selecția de tulpini fungice entomopatogene cu potențial biotehnologic pentru utilizarea acestora în controlul biologic al dăunătorilor.