

FUNGII ENTOMOPATOGENI



Moldovan Anna
Munteanu-Molotievskiy Natalia
Toderaș Ion

MINISTERUL EDUCAȚIEI ȘI CERCETĂRII AL REPUBLICII MOLDOVA
INSTITUTUL DE ZOOLOGIE

Anna Moldovan
Natalia Munteanu-Molotievskiy
Ion Toderăș

FUNGII ENTOMOPATOGENI

CHIȘINĂU • 2022

CZU 595.7

M 87

DOI: <https://doi.org/10.53937/9785885541619>

Lucrarea a fost examinată și aprobată pentru publicare
de Consiliul Științific al Institutului de Zoologie

Recenzenți:

Leonid Voloșciuc dr. hab. șt. biol., prof. cercet., Institutul de Genetică,
Fiziologie și Protecție a Plantelor

Livia Calestru dr. șt. biol., conf. cercet., Institutul de Zoologie

Lucrarea dedicată fungilor entomopatogeni include o caracteristică generală a grupului de cercetare, aspecte generale legate de clasificare și relațiile filogenetice, biologia și ecologia fungilor entomopatogeni. Un capitol aparte este destinat metodelor de bază de izolare, identificare și caracterizare a fungilor entomopatogeni; În capitolele 3 și 4 sunt discutate premisele utilizării agenților fungici în controlul biologic al coleopternelor curculionoide și rezultatele cercetărilor proprii privind dezvoltarea agenților fungici de control biologic al coleopternelor dăunătoare.

Cartea este destinată atât specialiștilor în domeniile zoologiei, entomologiei aplicate, protecției plantelor, studenților care își fac studiile în domeniile biologiei, ecologiei, silviculturii, cât și tinerilor studioși pasionați de științele biologice.

Lucrarea a fost elaborată în cadrul proiectului 20.80009.7007.12,
Program de Stat 2020-2023, realizat la Institutul de Zoologie

Descrierea CIP a Camerei Naționale a Cărții din Republica Moldova **Moldovan, Anna.**

Fungii entomopatogeni / Moldovan Anna, Munteanu-Molotievskiy Natalia, Toderăș Ion; Ministerul Educației și Cercetării, Institutul de Zoologie. – Chișinău: S. n., 2022 (F.E.-P. „Tipografia Centrală”). – 151 p.: fig., tab.

Bibliogr.: p. 113-147 (506 tit.). – 200 ex.

ISBN 978-5-88554-161-9.

CUPRINS

INTRODUCERE	5
1. CARACTERISTICA GENERALĂ A FUNGILOR ENTOMOPATOGENI	7
1.1. Clasificare și relații filogenetice	8
1.2. Biologia fungilor entomopatogeni	10
1.3. Patogenitatea și procesul de infecție	13
1.4. Ecologia fungilor entomopatogeni	15
2. METODE DE CERCETARE A FUNGILOR ENTOMOPATOGENI	19
2.1. Metode de cercetare a insectelor	19
2.2. Metode de izolare a fungilor entomopatogeni	32
2.3. Identificarea tulpinilor fungice	37
2.4. Caracterizarea tulpinilor fungice	48
3. PREMISE DE UTILIZARE A AGENȚILOR FUNGICI ÎN CONTROLUL BIOLOGIC AL COLEOPTERELOR	54
3.1. Coleopterele curculionoide, dăunători ai culturilor agricole	54
3.2. Metode utilizate în combaterea coleopterelor curculionoide dăunătoare	60
3.3. Istoricul cercetărilor privind controlul biologic al dăunătorilor	64
3.4. Biotehnologia producerii și aplicării preparatelor entomopatogene fungice	73
4. CERCETĂRI PRIVIND DEZVOLTAREA AGENȚILOR FUNGICI DE CONTROL BIOLOGIC AL COLEOPTERELOR DĂUNĂTOARE	80
4.1. Izolarea și identificarea noilor tulpini fungice	80
4.2. Caracteristica și importanța practică ale tulpinilor entomopatogene identificate	83

4.3. Evaluarea activității insecticide a tulpinilor fungice entomopatogene	88
4.4. Proprietățile fiziologice ale tulpinii de funghi <i>Beauveria bassiana</i> CNMN-FE-01	93
4.5. Dezvoltarea preparatelor insecticide pe baza tulpinilor autohtone de funghi entomopatogeni	103
CONCLUZII	112
BIBLIOGRAFIE	113
ANEXE	148

INTRODUCERE

Insectele sunt cele mai numeroase dintre toate clasele de animale multicelulare, atât în ceea ce privește numărul de specii descrise, cât și numărul de indivizi. Insectele reprezintă trei sferturi din toate speciile de animale din lume, fiind răspândite atât în mediul acvatic, cât și terestru (Daly *et al.*, 1998). Peste 99% din cele aproximativ un milion de specii de insecte descrise (Grimaldi, Engel, 2005) sunt fie inofensive, fie benefice pentru oameni, cum ar fi viermii de mătase (*Bombyx mori* L.), polenizatorii, unii parazitoizi și prădătorii (Gullan, Cranston, 2005; Pedigo, Rice, 2009). Diversitatea imensă a insectelor determină diversitatea enormă a biologiei lor, semnificația lor pentru natură și, în plus, beneficiile sau daunele aduse oamenilor. Din cele mai vechi timpuri, oamenii s-au confruntat cu daunele provocate de către insecte culturilor agricole. Uneori, această distrugere a căpătat un caracter extins (de exemplu, defolierea masivă a arborilor de către omizi) sau chiar amploarea unui dezastru natural (invaziile lăcustelor). Mai târziu, a fost dezvăluit rolul insectelor ca agenți cauzali ai diferitelor boli ale animalelor domestice, ale plantelor de cultură și ale omului și în calitate de vectori ai patogenilor virali, bacterieni, helmintici etc.

Printre toți factorii care afectează culturile agricole, insectele le revine un rol important, distrugând anual aproximativ 20% din producția agricolă mondială cu aplicarea măsurilor de protecție a plantelor (Oerke, 2006; Dhaliwal, Jindal, Mohindru, 2015). Practicile agricole curente, în special creșterea în masă a cerealelor în monocultură extensivă, pe suprafețe geografice extinse, precum și transportul rapid al bunurilor pe scară globală, au facilitat introducerea și migrația insectelor dăunătoare invazive în agroecosisteme, pe întreg globul Pământesc (Pimentel, 2002). Potențialul expansiv al acestor dăunători a crescut remarcabil.

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 atât asupra mediului, cât și asupra biodiversității (Pimentel, 2005; Maroni, Fanetti, Metruccio, 2006; Berny, 2007; Damalas, Eleftherohorinos, 2011). 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 (Damalas, Eleftherohorinos, 2011). 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). Ca 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 (Lamberth, Jeanmart, Luksch, 2013; Nishimoto, 2019).

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 etc.

Insectele, ca și celelalte organisme vii, prezintă un număr mare de inamici naturali, care pot fi utilizați în calitate de agenți de control biologic. La fel ca celelalte organisme, insectele sunt susceptibile la infecția cu microorganisme patogene, printre care evidențiem micromicetele. Unele tulpini de microorganisme entomopatogene sunt deja utilizate pentru a controla populațiile de insecte dăunătoare, activitatea insecticidă a altora este încă în proces de investigare. Insecticidele microbiene, inclusiv pe bază de micromicete, combină 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, tulpinile fungice sunt selective, respectiv, impactul negativ asupra mediului este minim. Recent a fost aprobat Programul 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. Studiarea în complex a microflorei fungice a insectelor dăunătoare și caracterizarea tulpinilor cu activitate insecticidă sporită vor permite de a oferi noi agenți de control biologic și de a produce în Republica Moldova biopesticide accesibile pentru producătorii agricoli.

1 | CARACTERISTICA GENERALĂ A FUNGILOR ENTOMOPATOGENI

Timp îndelungat, fungii, datorită particularităților precum prezența peretelui celular, lipsa motilității, generarea sporilor ca mod de reproducere, au fost plasați în regnul vegetal. În anul 1969, cercetătorul Robert Whittaker a propus separarea fungilor într-un regn aparte (Hawksworth, Sutton, Ainsworth, 1983). Membrii regnului Fungi sunt organisme larg răspândite în mediile terestre și acvatice. Speciile terestre au fost raportate ca agenți patogeni sau paraziți ai oamenilor, animalelor și plantelor, ca endofiți ai plantelor, ca simbioți ai artropodelor și plantelor și în calitate de componente ale microbiotei solului (Alexopoulos, Mims, Blackwell, 1996; Watanabe, 2010). Estimările actuale sugerează faptul că ciupercile au evoluat cu aproximativ 0,5-1,5 miliarde de ani în urmă (Wang, Kumar, Blair Hedges, 1999; Heckman *et al.*, 2001; Berbee, Taylor, 2010; Wang, St. Leger, Wang, 2016). Din cele aproximativ 1,5-5,1 milioane de specii de fungi din lume, circa 100 mii au fost descrise (Blackwell, 2011; Vega *et al.*, 2012)). Dintre acestea, aproximativ 750-1000 sunt entomopatogeni fungici plasați în peste 100 de genuri (Roberts, Humber, 1981; McCoy, Samson, Boucias, 1988; St. Leger, Wang, 2010; Vega *et al.*, 2012). Cu toate acestea, pe baza numărului de specii criptice, relevat de studiile de filogenie moleculară (Rehner, 2009), este evident că aceste estimări nu reflectă numărul adevărat de specii. Cercetătorii de Faria și Wraight (2007) au identificat 171 de produse pe bază de micromicete utilizate ca agenți de control biologic al organismelor dăunătoare încă din anii 1960, majoritatea având în calitate de ingredient activ tulpini de *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii*, *Metarhizium anisopliae* și *Isaria fumosorosea* (Hypocreales). Fungii entomogeni includ acele genuri de micete care se asociază cu insecte și alte artropode (de exemplu, păianjeni, acarieni) într-o varietate de moduri. Ele pot avea o asociere saprofită, comensală, parazită sau patogenă cu insecta gazdă. Ciupercile entomogene parazite sunt, de obicei, ectoparaziți care nu pătrund în cuticula gazdei. Sunt neletale, dar pot duce la modificări comportamentale semnificative ale gazdei. Infecțiile endoparazitare care implică penetrarea cuticulei și invazia țesuturilor subiacente sunt de cele mai multe ori letale. Ciupercile entomopatogene se caracterizează prin capacitatea lor de a se atașa și de a pătrunde prin cuticula gazdei, răspândindu-se în interiorul gazdei, de obicei în hemocel. Nutrienții din hemolimfă se epuizează prin creșterea rapidă a micromicetei, iar gazda moare. În plus, microorganismul poate invade și distruge alte țesuturi sau poate elibera substanțe toxice care interferează nu numai cu dezvoltarea normală a gazdei și cu metamorfoza, dar, în unele cazuri, cu sistemul imunitar, blocând mecanismele de apărare necesare gazdei pentru a contracara microorganismele invadatoare. În cele din urmă, agenții patogeni facultativi atacă doar exemplarele rănite sau deja bolnave (Boucias, Pendland, 1998).

1.1. Clasificare și relații filogenetice

Regnul Fungi este recunoscut ca fiind unul dintre cele mai vechi și mai mari grupuri de organisme vii de pe Pământ. Fungii reprezintă un grup monofiletic care s-a separat de un strămoș comun cu animalele cu aproximativ 800 sau 900 de milioane de ani în urmă. La baza sistemului actual de clasificare a ciupercilor stau caracterele morfologice, citologice, fiziologice, filogenetice, precum și particularitățile de înmulțire. Pe parcursul dezvoltării domeniului de cercetare au fost elaborate numeroase sisteme de clasificare. Biologia și ecologia micetelor au fost amplu tratate în literatura de specialitate, iar cercetările efectuate au contribuit important la cunoașterea morfologiei, metabolismului, ciclului vital, relațiilor trofice, distribuției, precum și a influenței factorilor de mediu asupra creșterii și dezvoltării. Progresul științific în domeniul biologiei moleculare a revoluționat cunoștințele comunității umane despre sistematica și filogenia fungilor. Utilizarea tehnicilor moleculare și a analizelor filogenetice a dus la o mai bună înțelegere a relațiilor genetice, care permite legarea stadiilor asexuate (anamorfe) ale micromicetelor de stadiile lor sexuale (teleomorfe). Acest lucru a condus la abandonarea termenilor Deuteromycota, Deuteromicete, Fungi Imperfecti etc. (Taylor 1995, Blackwell *et al.*, 2006), în care au fost plasați în mod tradițional mulți fungi entomopatogeni și reclasificarea lor în Ascomycota, unul dintre cele două filumuri din subregnul Dikarya. Informațiile furnizate de analizele filogenetice și genomice permit cercetătorilor în domeniul micologiei și patologiei insectelor să analizeze caracterele morfologice distinctive utilizate în determinarea genurilor și speciilor (Sung *et al.*, 2007; Humber, 2012), producerea de metaboliți secundari (Geiser *et al.*, 2000; Frisvad *et al.*, 2008), și preferințele față de gazdă sau substrat (Spatafora *et al.*, 2007). Aplicarea genomicii funcționale este, de asemenea, esențială pentru dezvoltarea metodelor eficiente de control biologic al insectelor în baza entomopatogenilor fungici (Vega, Kaya, 2012).

În prezent este adoptată schema de clasificare filogenetică sugerată de Hibbett *et al.* (2007), cu modificările sugerate de McLaughlin *et al.* (2009), Jones *et al.* (2011), Powell, Letcher (2014), Spatafora *et al.* (2016) și McCarthy, Fitzpatrick (2017). În clasificarea propusă, Eumycota (sau ciupercile adevărate) cuprinde zece filumuri: Cryptomycota, Microsporidia, Chytridiomycota, Monoblepharidomycota, Neocallimastigomycota, Blastocladiomycota, Zoopagomycota, Mucormycota, Ascomycota (aproximativ 65 000 de specii din 6400 de genuri) și Basidiomycota, (aproximativ 32 000 de specii din 1600 de genuri). Ultimele două filumuri sunt grupate în subregnul Dikarya (Hibbett *et al.*, 2007). Lucrarea „*The Mycota*” (ediția a II-a), Vol. VII (în două părți A și B) (McLaughlin, Spatafora, 2014, 2015), abordează sistematica și subiectele conexe fungilor și organismelor asemănătoare cu fungii, separându-le în patru supragrupuri eucariote, trei dintre care includ organisme asemănătoare fungilor Amoebozoa, Excavata și SAR (Straminipila, Alveolata și Rhizaria) și ciupercile adevărate din supragrupul Opisthokonta (Moore, Robson, Trinci 2020). Cercetările din ultimii ani determină revizuirea continuă a clasificării și relațiilor filogenetice în cadrul fungilor. Un studiu recent propune clasificarea

fungilor în nouă subregnuri, 18 filumuri, 23 de subfilumuri, 74 de clase, 215 ordine, 731 de familii și 5377 de genuri (Tedersoo *et al.*, 2018).

În continuare vor fi prezentate unele grupuri taxonomice din cadrul fungilor în care găsim micromicete entomopatogene.

Oomicetele

Timp de mulți ani, oomicetele au fost considerate a fi ciuperci pe baza morfologiei lor filamentoase, a nutriției heterotrofe și a habitatelor similare (Dick, 2001). Odată cu avansarea cercetărilor în acest domeniu au fost constatate un șir de particularități în acest grup, cum ar fi prezența celulozei în calitate de component major al peretelui celular, poziția și tipul flagelului, care, alături de datele analizei filogenetice, au demonstrat relațiile apropiate între oomicete și organismele flagelare, inclusiv algele brune, diatomeele și alte organisme care posedă pigmentii clorofila *a* și clorofila *c* (Beakes, Sekimoto, 2009). Deși mucegaiurile de apă (oomicetele saprolegianale) sunt izolate în mod repetat din exoscheletul artropodelor acvatice, puține dintre oomicete sunt agenți patogeni ai insectelor. Cele mai bine studiate sunt speciile *Lagenidium giganteum* și *Aphanomyces laevis* (Kerwin, Petersen, 1997; Patwardhan *et al.*, 2005; Lacey, 2012). Speciile din genurile *Pythium* și *Leptolegnia* au fost, de asemenea, raportate ca agenți patogeni ai larvelor de țânțari (Phillips *et al.*, 2008). Genul *Leptolegnia*, conține două specii entomopatogene (*L. caudata* și *L. chapmani*) care sunt patogene pentru insecte (Vega *et al.*, 2012; Rueda *et al.*, 2019).

Chitridiomicetele

Inițial, filumul Chytridiomycota includea toate ciupercile flagelate. Ulterior speciile respective au fost reclasificate în Blastocladiomycota, Chytridiomycota și Neocallimastigomycota (James *et al.*, 2006a). Listele anterioare ale chitridiomicetelor entomopatogene au inclus în mare parte micromicete care au fost reclasificate în Blastocladiomycota.

Blastocladiomicetele sunt deosebite față de toate celelalte ciuperci, deoarece ciclul lor vital este caracterizat de prezența meiozei în timpul formării sporilor în meiosporangiile cu pereți groși, rezultând o alternanță între generațiile haploide și diploide, un tip de ciclu vital caracteristic plantelor (James *et al.*, 2006b). Exemple de genuri incluse în Blastocladiales sunt *Coelomycidium*, *Catenaria* și *Coelomyces*. Speciile din genul *Catenaria* sunt cunoscute în primul rând ca agenți patogeni ai nematodelor, dar unele specii infectează și unele diptere mici. Reprezentanții genului *Coelomycidium* sunt patogeni ai coleopternelor și dipternelor (Tanada, Kaya, 1993). Speciile din genul *Coelomyces* sunt agenți patogeni obligați care necesită, în ciclul lor vital, două gazde acvatice, larve de țânțari și crustacee (Kerwin, Petersen, 1997). Zoosporii sunt produși în meiosporangiile cu pereți groși din sporotalul diploid din gazda țânțarului, iar gameții sunt produși de gametotalul haploid din gazda copepodă. În lipsa crustaceului, micromiceta nu este capabilă de a forma mitosporangii (numite și sporangi cu pereți subțiri) pentru a propaga sporofitul (Gleason *et al.*, 2010; Vega *et al.*, 2012).

Zigomicetele

Studiile de filogenie moleculară (White *et al.*, 2006a; Hibbett *et al.*, 2007) plasează foștii membri ai Zygomycetes în patru subfilumuri neafiliate (Mucoromycota

tina, Zoopagomycotina, Kickxellomycotina și Entomophthoromycotina). Studiile mai recente ridică sublimfurile la rang de filum, majoritatea fostelor zigomicete regăsindu-se în filumurile Mucormycota și Zoopagomycota (Spatafora *et al.*, 2016). Detalii privind unele din reclasificările operate și înaintate, particularitățile distinctive ale acestor grupuri pot fi găsite în lucrările autorilor Vega *et al.* (2012), Spatafora *et al.* (2016) ș.a.

Ascomicetele

Ascomycota sunt clasificate în trei subfilumuri: Pezizomycotina, Saccharomycotina și Taphrinomycotina. Dintre acestea subfilumul Pezizomycotina întrunește reprezentanți patogeni pentru insecte (Benjamin *et al.*, 2004; Humber, 2008; Vega *et al.*, 2012).

Conidiile care se formează pe cadavrele insectelor pot fi produse direct pe conidiofori (de exemplu la reprezentanții genului *Metarhizium*). La unele specii, conidiile se formează pe structuri speciale formate din fuziunea conidioforilor (synnemata, ex. reprezentanții genurilor *Isaria* și *Akanthomyces*). Unul din cele mai bine studiate ordine care include reprezentanți entomopatogeni este ordinul Hypocreales. Anamorful și teleomorful la majoritatea reprezentanților acestui ordin există ca stadii separate în ciclul lor vital, deși există unele specii la care ambele forme se întâlnesc pe aceeași insectă simultan (Luangsa-ard *et al.*, 2010).

Basidiomicetele

Basidiomicetele sunt adesea strâns asociate cu insectele ca singura lor resursă nutritivă și ca habitat. Filumul este divizat în 3 subfilumuri: Pucciniomycotina, Ustilaginomycotina și Agaricomycotina. Specii entomopatogene sunt întâlnite în ordinul Septobasidiales (Pucciniomycetes) (Aime *et al.*, 2006). Speciile entomopatogene rar duc la moartea gazdei sale (Humber, 2008).

Microsporidiile sunt în prezent clasificate ca ciuperci (Corradi, Keeling, 2009). Primele descrieri ale microsporidiilor le găsim în lucrarea lui Louis Pasteur (1870). Microsporidia *Nosema apis* a fost descrisă la albinele melifere de către cercetătorul Enoch Zander (1909). O trecere în revistă a cercetărilor poate fi găsită în lucrările autorilor R. Kudo (1924), O. Jirovec (1936) și J. Weiser (2005). Taxonomia microsporidiilor a suferit multe schimbări de-a lungul anilor, inițial acest grup fiind integrat în protozoare, apoi Archezoa. Folosind metode biochimice și molecular-genetice, ulterior, a fost demonstrată relația filogenetică a microsporidiilor cu fungii (Edlind *et al.*, 1996; Tanabe, Watanabe, Sugiyama, 2002; Davidson, 2012). Microsporidiile nu vor fi discutate în această lucrare.

1.2. Biologia fungilor entomopatogeni

Fungii sunt microorganisme heterotrofe, eucariote, incapabile de a fixa carbonul, fiind nevoite să obțină carbonul din compuși organici produși de alte organisme. Acest lucru poate fi realizat saprofit sau ducând un mod de viață parazitar. De asemenea, fungii pot avea asocieri mutualiste cu algele, sub formă de licheni, sau cu rădăcinile plantelor sub formă de endomicorize sau ectomicorize. Prezența

ciupercilor ca endofiti ai plantelor este studiată ca o posibilă strategie de control biologic împotriva insectelor. În funcție de condițiile de mediu, mulți entomopato-gei fungici formează miceliu, scleroți (o structură dură, frecvent sferică, constând dintr-o masă de hife sterile considerate a fi rezistente la condițiile de mediu nefavorabile), iar unele specii există în stare unicelulară similar drojdiilor (Alexopoulos *et al.*, 1996; Boucias, Pendland, 1998; Vega *et al.*, 2012). Prezența scleroților a fost observată la specii din genurile *Cordyceps*, *Hirsutella* și *Synnematium* (Evans, Samson, 1982; Vega *et al.*, 2012). Formarea microscleroțiilor a fost constatată la specia *Metharizium anisopliae*, crescută în cultură lichidă. Microscleroțiile au fost definite ca „grupări de hife nediferențiate, melanizate, compacte” care, la rehidratare, produc mase de conidii direct pe suprafață. Testele biologice de laborator au arătat că microscleroțiile încorporate în sol pot provoca mortalitatea dăunătorilor țintă (Jackson, Jaronski, 2009).

Ciupercile sunt organisme cu o capacitate foarte mare de înmulțire, care se realizează vegetativ, asexuat și sexuat.

Înmulțirea vegetativă. Înmulțirea vegetativă este o formă nespecializată care se realizează prin fragmentarea hifelor miceliene în celule aparte sau în grupuri de celule, iar aceste fragmente sunt capabile să regenereze miceliul ciupercii. Înmulțirea asexuată la micromicete este frecvent răspândită în natură și se întâlnește cu preponderență în faza haploidă. De aceea, ea este tipică pentru ciupercile la care toate stadiile parcurg în faza haploidă.

Înmulțirea asexuată. La ciupercile superioare se formează spori exogeni, numiți conidii, plasați pe niște suporturi speciale, numite conidiofori. Pe un singur conidiofor se poate forma o singură conidie sau mai multe. Conidiile sunt diferite ca formă, ornamentație și număr de celule. La maturitate, conidiile se desprind de pe aceste suporturi, dând naștere la filamente ce vor dezvolta o nouă micromicetă. Fructificația asexuată de tip exogen a ciupercilor superioare prezintă o variație mai mare. Conidiile diferă ca formă, culoare, ornamentație și ca număr de celule. De exemplu, se întâlnesc: conidii unicelulare, bicelulare, multicelulare. Formațiuni diferite prezintă și conidioforii, aceștia putând fi simpli sau ramificați, solitari sau asociați în grupuri de tipul coremie, acerv, picnidă. Conidiile reprezintă un criteriu taxonomic important, deși în ultimii ani dovezile moleculare arată că multe specii acceptate în mod tradițional reprezintă taxoni criptici (Vega *et al.*, 2012).

Înmulțirea sexuată. Aceasta cuprinde procesele de fecundare (F) și de reducere cromatică (R). Prin efectuarea fecundației (contopirea gameților sau a gametangio-ilor), ciupercile trec de la haplofază (fază cu n cromozomi în nucleu) la diplofază (fază cu $2n$ cromozomi în nucleu). Contrar cu procesul de fecundație, se întâlnește și la ciuperci reducerea cromatică (R), prin care aceste organisme revin de la diplo-fază la haplofază. În esență, procesul de fecundație constă în unirea a două celule cu rol de gameți, în cursul a două etape importante: plasmogamia sau fuzionarea celor două mase de citoplasmă ale gameților (P) și kariogamia, contopirea celor două nuclee ale gameților (K), când în celula-ou se formează un nucleu diploid (cu $2n$ cromozomi). Datorită celor două procese importante (fecundația și reducerea cro-

matică), în ciclul de viață al ciupercilor se realizează alternanța a două faze distincte: faza haploidă și faza diploidă.

Pentru reprezentanții ordinului Hypocreales este caracteristic faptul că după moartea unei gazde infectate, ciuperca microscopică produce conidii asexuate pe exteriorul cadavrului (figura 1.1). În ciclul de dezvoltare o mare însemnătate are stadiul conidian, care uneori înlocuiește complet stadiul de ască. Conidiile sunt eliberate pasiv în mediu pentru a infecta noi gazde.

Ocazional, cadavrele infectate produc corpuri de fructificație, care prin meioză produc asce cu ascospori care sunt dispersați activ pentru a infecta noi gazde, probabil după producerea conidiilor. Conidiile unor taxoni pot infecta și țesuturile vii ale plantelor în care ciuperca se poate stabili și crește ca endofit. Conidiile din sol pot coloniza rădăcinile plantelor, proces urmat de proliferare în rizosferă, dar rămâne să fie clar documentat faptul că propagulele fungice produse rizosferic sau endofitic pot infecta insectele care se hrănesc cu plante (Boomsma *et al.*, 2014).

La reprezentanții ordinelor Entomophthorales și Neozygitales (Entomophthoromycota), ciclurile recurente de infecție apar de obicei prin producerea de conidii, dar multe specii produc, în condiții nefavorabile, prin înmulțire sexuată, spori de repaus cu pereți groși. Totodată, la reprezentanții ordinului Onygenales (Ascomycota) sunt cunoscuți numai sporii produși sexuat, astfel încât sunt necesare infecții duale cu spori de diferite tipuri, pentru ca infecția să ducă la producerea de spori (Boomsma *et al.*, 2014).

Fungii entomopatogeni, în afară de conidii, în calitate de propagule infecțioase pot produce blastospori (Jackson, Dunlap, Jaronski, 2010). Conidiile pot fi de două tipuri: aeriene (produse extern pe insectele infectate sau la cultivarea pe mediu solid) și scufundate (la producerea în mediu lichid limitat), cele din urmă fiind evidențiate la speciile *Beauveria bassiana* (Cho *et al.*, 2006), *Hirsutella thompsonii* (van Winkelhoff, McCoy, 1984), *Metarhizium flavoviride* (Jenkins, Prior, 1993) și *M. anisopliae* (Kassa *et al.*, 2004) (Vega *et al.*, 2012). Blastosporii se formează de obicei la cultivarea într-un mediu lichid bogat în nutrienți (Bidochka, Pfeifer, Khachatourians, 1987). Blastosporii de asemenea se pot forma *in vivo* în corpul gazdei (Boucias, Pendland, 1998; Lewis, Robalino, Keyhani, 2009; Vega *et al.*, 2012). Fungii entomopatogeni din ordinul Entomophthorales produc conidii care



Fig. 1.1. *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera, Chrysomelidae), adult infectat cu semne de sporulare externă (orig. E. Doni)

sunt derivate evolutiv din sporangi. Unii taxoni, de exemplu, reprezentanții genurilor *Neozygites* și *Zoophthora*, produc și capilioconidii alungite care se dezvoltă la vârful capilliconidioforilor lungi și subțiri. Aceste propagule se desprind ușor atunci când sunt atinse de o insectă și aderă la cuticulă printr-o picătură de adeziv care se emană din vârful capilliconidium-ului (Boucias, Pendland, 1991).

1.3. Patogenitatea și procesul de infecție

Pentru realizarea cu succes a procesului de infecție există o succesiune de evenimente care trebuie să decurgă în condiții optime. Acestea sunt:

- 1) atașarea sporului la suprafața cuticulei și germinarea;
- 2) penetrarea cuticulei de către tubul germinativ/apresoriu;
- 3) reproducerea micromicetei în hemocel.

Atașarea sporului la suprafața cuticulei și germinarea

Acest proces are loc în trei faze succesive:

- 1) adsorbția sporilor la suprafața prin recunoașterea receptorilor specifici pentru glicoproteine;
- 2) aderența sau consolidarea interfeței dintre spori pre-germinați și epicuticulă;
- 3) germinarea și dezvoltare până la inițierea fazei de penetrare (Tellez-Jurado *et al.*, 2009; Mora *et al.*, 2017).

Cuticula insectei reprezintă o rețea de polimeri, componentul major fiind chitina, care este încorporată într-o matrice proteică. Ca rezultat al cercetărilor efectuate, a fost constatat că diferite tipuri de propagule infecțioase au diferit grad de aderență la suprafața cuticulei. Conidiile aeriene se leagă bine de suprafețele hidrofobe, dar slab de suprafețele hidrofile. Conidiile scufundate se leagă bine de ambele tipuri de suprafețe, iar blastosporii produși *in vitro* se leagă puternic de suprafețele hidrofile și slab de suprafețele hidrofobe (Holder, Keyhani, 2005). Aceste informații au un rol semnificativ în optimizarea procesului de producere a biopesticidelor pe bază fungică. Studiile ulterioare au relevat faptul că în procesul de aderență la diferite suprafețe sunt implicate diferite proteine, de exemplu, la entomopatogenul *M. anisopliae*, proteina MAD1 este responsabilă la aderența la cuticulă iar MAD2 este implicată în aderența la suprafețele plantelor (Wang, St. Leger, 2007; Pava-Ripoll *et al.*, 2011). S-a demonstrat că carbohidrații de suprafață ai peretelui celular influențează patogeniza printr-un posibil efect asupra recunoașterii sistemului imunitar al insectelor gazdă. Tipul de propagule infecțioase ar putea influența și mortalitatea insectelor (Vega *et al.*, 2012). Proprietățile suprafeței peretelui celular au, de asemenea, un rol critic în aderența sporilor la cuticula insectei gazdă (Boucias, Pendland, 1998; Holder, Keyhani, 2005; Mora *et al.*, 2017). În plus, cunoașterea proprietăților suprafeței celulare este esențială pentru dezvoltarea formulărilor de entomopatogeni fungici. De exemplu, propagulele infecțioase cu suprafețe hidrofile ar fi în mod inerent dificil de formulat în uleiuri.

Dacă sporul s-a atașat de cuticula insectei, următorul eveniment decisiv pentru declanșarea procesului de infecție este germinarea sporului. Acest fenomen este însoțit de formarea unui tub germinativ, cu sau fără formarea ulterioară a unui *apresorium* (pl., *apresorie*). Există mai mulți factori fizici și chimici care influențează

ză acest proces, printre care, temperatura, umiditatea, prezența surselor de azot și carbon (Vega *et al.*, 2012). Unele componente ale cuticulei insectei ar putea avea efecte inhibitoare (Priyatno, Ibrahim, 2002). Germinarea rapidă constituie astfel un avantaj care reduce expunerea nu numai la factorii externi negativi de mediu, ci și la adaptările gazdei care reduc succesul infecției fungice. Aderența conidiilor poate fi influențată și de topografia cuticulară. De exemplu, conidiile se pot colecta în zone care conțin un număr mare de septe și spini (Sosa-Gomez, Boucias, Nation, 1997).

Alți entomopatogeni fungici, de exemplu speciile *M. anisopliae*, *I. farinosa*, *Entomophaga aulicae*, *C. obscurus* ș.a., produc mucilagiul în timpul formării apresoriului și a tubului germinal. Se consideră că acest mucilagiu exocelular contribuie la aderența sporului de cuticula insectei (Boucias, Pendland, 1998).

Penetrarea cuticulei de către tubul germinativ/apresoriu

Pentru pătrunderea în interiorul gazdei asupra cuticulei urmează a fi exercitată o presiune mecanică și ea urmează să fie degradată datorită acțiunii enzimelor. Cercetările realizate au identificat prezența unor proteine speciale implicate în generarea unei presiuni datorită turgescenței celulelor apresoriale (Wang, St. Leger, 2007). Enzimele implicate în degradarea cuticulei includ proteaze, chitinaze și lipaze (Pedrini, Crespo, Juarez, 2007; Franco *et al.*, 2011). Studiile *in vitro* indică faptul că digestia tegumentului este realizată datorită acțiunii succesive a enzimelor lipază-protează-chitinază (Tanada, Kaya, 1993). Proteaza PR1 este considerată un factor important de virulență pentru specia *Metarhizium anisopliae* și supraexpresia acestei enzime sporește eficiența tulpinii (Mora *et al.*, 2017). În mod similar, supraexpresia genei care codifică chitinaza la specia *Beauveria bassiana* accelerează moartea insectelor (Fan *et al.*, 2007; Lovera *et al.*, 2020). Pe lângă porțile de acces clasice cum ar fi cuticula și membranele intersegmentare, entomopatogenii fungici pot să pătrundă în corpul insectei prin organele de simț, spiraculi, și *per os* (St. Leger, 1991).

Reproducerea micromicetei în hemocel

Odată ce microorganismul a obținut acces la hemocel, acesta începe să utilizeze nutrienții disponibili pentru creștere și reproducere. În hemocel majoritatea entomopatogenilor fungici există sub forma blastosporilor (Mora *et al.*, 2017). În această formă, micromiceta se poate replica fără a fi detectată de către sistemul imunitar al insectei. Odată ce fungul evadează sistemul imunitar al insectei, apare septicemia (Eilenberg, Michelsen, 1999). Insecta poate răspunde la infecție prin mecanisme umorale (fenoloxidaze, lectine, peptide și proteine de apărare), celulare (fagocitoză, încapsulare) sau ambele. Pentru a finaliza procesul de infecție, micromiceta trebuie să învingă mecanismele de protecție ale gazdei inclusiv prin sinteza proteazelor speciale, și, de asemenea, folosind depsiptide ciclice, inclusiv destruxine, care provoacă paralizia insectei datorită capacității lor de a deschide pompele de calciu, precum și alte toxine care dăunează sistemului muscular și tuburilor Malpighi, afectând excreția și împiedicându-le capacitatea de a se hrăni și de a se mișca (Pal, St. Leger, Wu, 2007; Mora *et al.*, 2017). Există un număr considerabil de metaboliți secundari cu greutate moleculară mică care au fost izolați din agenții patogeni ai insectelor cu rol în procesele de patogenează. Metaboliții insecticizi, produși de fungii entomopatogeni, au diverse

moduri de acțiune și deseori sunt cauza directă a morții insectelor (Tellez-Jurado *et al.*, 2009). Atunci când resursele nutritive din corpul gazdei sunt epuizate, micromiceta revine la forma micelială. În momentul sau chiar înainte de pieirea gazdei, corpurile hifelor se transformă în micelii, care cresc și se ramifică în țesuturile gazdă și ies din cadavrul mumificat prin cuticulă. În condiții nefavorabile, miceliul nu poate ieși din gazdă imediat după moarte, dar în schimb poate forma structuri rezistente, cu pereți groși precum clamidosporii. La suprafața corpului insectei se produc propagule infecțioase care sunt ulterior dispersate în mediu pe cale aeriană, cu picăturile de apă, sau prin intermediul altor insecte etc. (Boucias, Pendland 1998; Vega *et al.*, 2012).

Comportamentul insectelor poate influența succesul infecției de către entomopatogenul fungic. În teorie, insectele sociale prezintă un risc mai mare de infectare cu agenți patogeni. Cu toate acestea, insectele sociale au dezvoltat o serie de mecanisme de apărare împotriva agenților patogeni (Cremer, Armitage, Schmid-Hempel, 2007). De exemplu, termitelile (Boucias *et al.*, 1996; Yanagawa, Yokohari, Shimizu, 2008) și furnicile (Jaccoud, Hughes, Jackson, 1999; Vega *et al.*, 2012) prezintă un comportament de îngrijire reciprocă pentru a elimina conidiile. În plus, glandele metapleurale ale furnicilor produc secreții de antibiotice care inactivează entomopatogenii fungici (Yek, Mueller, 2011). S-a demonstrat că unele insecte non-sociale prezintă profilaxie dependentă de densitate, adică o rezistență crescută la agenți patogeni atunci când sunt crescute în condiții de densitate mare (Wilson, Reeson, 1998). *Spodoptera littoralis* (Wilson *et al.*, 2001) și *Tenebrio molitor* (Barnes, Siva-Jothy, 2010) au arătat o rezistență crescută la *B. bassiana* și, respectiv, *M. anisopliae*, atunci când sunt crescute în condiții de aglomerație. Această rezistență crescută pare să fie legată de melanizarea cuticulară, adică de formarea pigmentului melanină prin polimerizarea compușilor fenolici (Jacobson, 2000; Vega *et al.*, 2012). Odată ce entomopatogenul fungic ajunge în hemolimfă, o serie de răspunsuri imune pot fi inițiate. Unele sunt răspunsuri antimicrobiene generale, în timp ce altele vizează în mod specific organismul invadator (Rolff, Reynolds, 2009). *Metarhizium anisopliae* și *B. bassiana* sunt capabile să evite încapsularea în hemocel, iar această adaptare s-a presupus a fi o consecință a faptului că acestea sunt entomopatogeni facultativi în mediile solului unde pot supraviețui încapsulării de către prădătorii amiboizi din sol (Bidochka *et al.*, 2010). Un răspuns fascinant la infecțiile fungice este conceptul de febră comportamentală, prin care insectele infectate (de exemplu, lăcuste, muște) își modifică comportamentul (de exemplu, se expun la soare) pentru a crește temperatura corpului afectând entomopatogenul fungic aflat în hemocel (Kalsbeek *et al.*, 2001; Elliot *et al.*, 2002; Vega *et al.*, 2012).

1.4. Ecologia fungilor entomopatogeni

Spectrul de gazde

Cunoașterea spectrului de gazde a entomopatogenilor fungici este importantă din mai multe motive. Pentru studiile ecologice fundamentale, este relevant să știm care sunt gazdele potențiale ale tulpinii cercetate și gradul de virulență relativ față de acestea. Răspândirea gazdei determină și răspândirea entomopatogenului. În ecolo-

gia aplicată (de exemplu, controlul biologic), este relevant să se determine spectrul de gazde a unui agent de control biologic de natură fungică pentru a putea prognoza efectele vizate și nevizate ale aplicării acestuia în calitate de biopesticid. Fungii entomopatogeni pot avea un spectru îngust (entomopatogeni specializați) și un spectru larg de acțiune (entomopatogeni generalişti). Este imposibil de generalizat care taxoni fungici sunt entomopatogeni specialiști și generalişti. Cu toate acestea, luând în considerare ordinele cu cel mai mare număr de entomopatogeni fungici, Entomophthorales și Hypocreales, primul conține în mare parte fungi cu un spectru larg de acțiune, în timp ce cel din urmă prezintă o varietate de intervale de acțiune de la îngust la foarte larg. Un entomopatogen fungic specializat este de obicei considerat a fi foarte virulent, fiind un patogen obligat. Aceste specii de obicei produc structuri de supraviețuire specializate, cum ar fi spori de repaus pentru a supraviețui perioadelor în care gazda lor nu este prezentă. În condiții de mediu potrivite, ei dezvoltă epizootii. În contrast, entomopatogenii fungici generalişti sunt adesea considerați entomopatogeni facultativi, adică pot supraviețui nutrindu-se saprofit (Vega *et al.*, 2012). Cu toate acestea, entomopatogenii fungici sunt competitori slabi în comparație cu microorganismele oportuniste (Meyling, Eilenberg, 2007). Unii taxoni fungici par să exploateze nutrienții care nu sunt derivați de la artropode și, prin urmare, pot avea și alte roluri ecologice, pe lângă faptul că sunt entomopatogene. Entomopatogenii fungici cu un număr mare de gazde potențiale prezintă în general o virulență relativ scăzută (Goettel, 1995). Pentru supraviețuirea pe termen lung fără o gazdă vie, ei nu produc structuri de supraviețuire specifice, dar propagulele lor infecțioase pot persista perioade prelungite în mediu. În termeni epizootologici, aceste ciuperci persistă în cadrul populațiilor lor gazdă la un nivel endemic (sau enzootic) (Vega *et al.*, 2012).

Pot fi definite două tipuri de spectru de acțiune: ecologic și fiziologic (Hajek, Butler, 2000). Spectrul ecologic este un termen utilizat pentru gazdele care sunt infectate în natură, spre deosebire de spectrul fiziologic, care este utilizat pentru gazdele care pot fi infectate în laborator. Este necesar de ținut cont de faptul că infecțiile induse în laborator nu sunt neapărat reproductibile în teren, în special la determinarea efectelor vizate și nevizate pentru aplicarea unui microorganism fungic în calitate de biopesticid (Hajek, Butler, 2000; Jaronski, Goettel, Lomer, 2003).

Mai multe studii au demonstrat faptul că spectrul de gazde al fungilor entomopatogeni nu se limitează doar la insecte. De exemplu, speciile din genul *Bauveria* se conturează în prezent drept endofiți, promotori ai creșterii plantelor, colonizatori benefici ai rizosferei și, cel mai important, antagoniști anti-fitopatogeni *in vitro* și *in vivo* pentru importanți agenți patogeni ale culturilor agricole de natură fungică, bacteriană, dar și virală (Zimmermann, 2007; Vega *et al.*, 2009; Deb *et al.*, 2017; Jaber, Ownley, 2017; Bamisile *et al.*, 2021). Propagulele supraterane ale speciei *B. bassiana* pot fi izolate din filoplanul diferitor specii de plante. Mai mult, majoritatea plantelor adăpostesc endofiți fungici care există asimptomatic în țesuturile lor. Activitatea endofitică a speciei *B. bassiana* a fost demonstrată pentru prima dată la porumb (*Zea mays*), spectrul de gazde vegetale fiind permanent extins (Vega *et al.*, 2012; Barra-Bucarei, France, Millas, 2019).

Distribuția fungilor entomopatojeni

Fungii entomopatojeni au o distribuție cosmopolită și constituie în mare parte taxoni tereștri, deși există specii care populează habitatele acvatice, fiind răspândiți în regiunile tropicale, subtropicale și temperate (Vega *et al.*, 2012; Lacey, 2012, 2015; Maharachchikumbura *et al.*, 2016). În general, tendința modelelor de distribuție globală indică faptul că entomopatogenii fungici din Entomophthorales apar mai ales în climatele temperate, scăzând în abundență spre subtropice și tropice (Hajek, 1997). Unii dintre cel mai intens studiați în scopuri biotehnologice sunt membrii ordinului Hypocreales (Fungi, Ascomycota). Micromicetele entomopatogene din ordinul Hypocreales, precum speciile din genurile *Beauveria*, *Isaria* și *Metharizium*, sunt distribuite în mod natural într-o gamă largă de habitate, solul fiind considerat rezervorul lor natural. Un număr considerabil de tulpini au fost izolate din insectele gazdă (Quesada-Moraga *et al.*, 2007; Garrido-Jurado *et al.*, 2015; Yousef *et al.*, 2018) (figura 1.2).

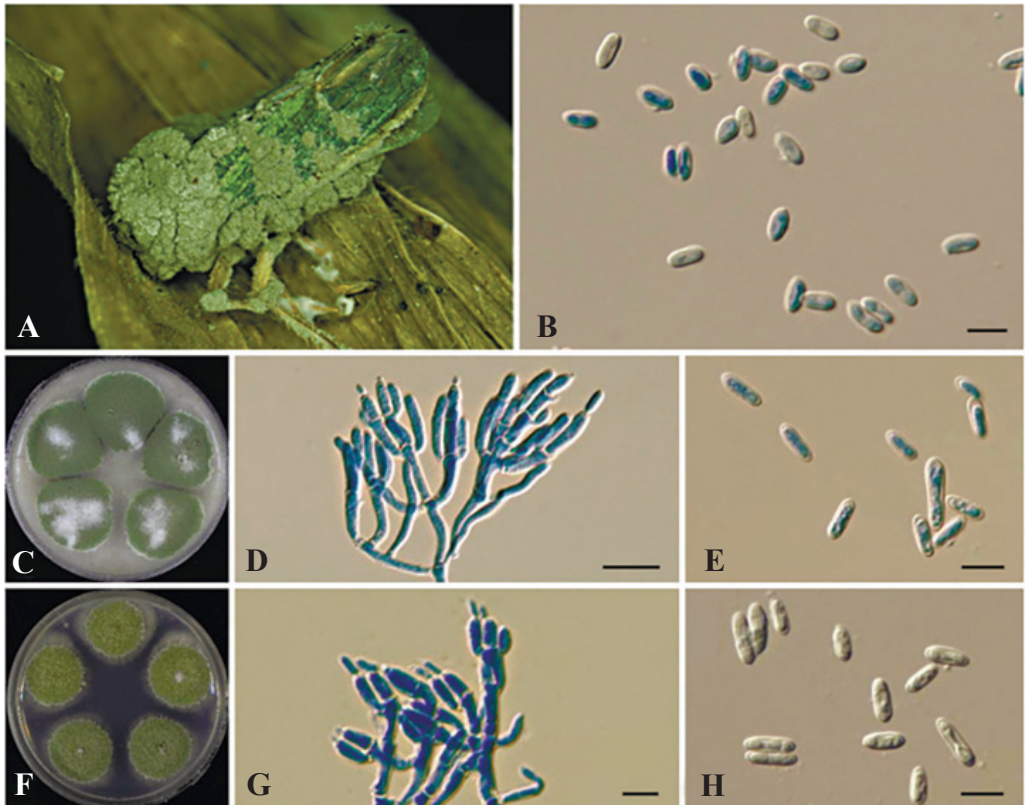


Fig. 1.2. *Metarhizium ellipsoideum* (BBH 30724)
(sursa: Mongkolsamrit *et al.*, 2020)

- A.** Micromiceta pe insecte (Hemiptera). **B.** Conidii pe insecta gazdă.
C. Colonii pe mediul OA. **D.** Conidiofori cu fialide și conidii pe mediul OA.
E. Conidii pe mediul OA. **F.** Colonii pe mediul PDA.
G. Conidiofori cu fialide și conidii pe mediul PDA. **H.** Conidii pe PDA

Speciile din ordinul Hypocreales au dezvoltat diferite stiluri de viață, inclusiv saprofitism, endofitism și parazitism la plante, insecte, nematozi și alte ciuperci (Berbee, 2001; Zhang *et al.*, 2018). Cercetătorii Bidochka și Small (2005) au emis ipoteza că liniile anamorfe ale *Metarhizium* s-au dispersat din Asia de Sud-Est, unde se găsesc, probabil, teleomorfi (*Metacordyceps*). Din acest centru, majoritatea anamorfilor au devenit cosmopoliți, deși cea mai mare diversitate de *Metarhizium* rămâne în regiunea asiatică. În plus, s-a emis ipoteza că anamorfi precum *Metarhizium* (și probabil alte genuri de entomopatogeni fungici din Hypocreales) au colonizat ecosisteme gestionate, cum ar fi terenurile agricole din întreaga lume, ca entomopatogeni generalişti care se reproduc asexuat (Bidochka, Small, 2005). Cu toate acestea, teleomorfi apar în climatele mai reci, deși sunt adesea restricționați la ecosistemele naturale. Entomopatogenii fungici, de obicei, nu sunt vizibili, ceea ce face evaluarea distribuției lor în mediu foarte dificilă (Roy *et al.*, 2006).

Pe lângă insecta gazdă, spori fungici microscopici pot fi localizați în sol, care oferă, în general, un habitat benefic datorită protecției față de factorii abiotici extremi ai mediului. Au fost dezvoltate mai multe metode care permit de a investiga prezența entomopatogenilor fungi în ecosistemele naturale și antropizate. Unele dintre acestea sunt: izolarea prin utilizarea insectelor în calitate de momeală, metoda diluțiilor seriale, metodele molecular genetice independente de cultivare etc. Datele obținute sugerează că există diferențe între comunitățile fungice entomopatogene din habitatele naturale și cele antropizate. În general, *B. bassiana* și *I. fumosorosea* au fost izolate mai frecvent din ecosisteme naturale decât din solurile cultivate. *M. anisopliae* pare să fie cel mai frecvent entomopatogen întâlnit în solurile din habitatele cultivate, sugerând o rezistență mai mare la perturbările antropice (Meyling, Eilenberg, 2007). Totuși tendințele înregistrate nu pot fi considerate universale (Meyling, Thorup-Kristensen, Eilenberg, 2011; Vega *et al.*, 2012).

Variația factorilor de mediu ar putea explica unele dintre modelele de distribuție raportate (Zimmermann, 2007; Scheepmaker, Butt, 2010). Astfel, variațiile tipului de sol și alte caracteristici sunt susceptibile să afecteze modelele de distribuție a entomopatogenilor fungici. În regiunile temperate, selecția genotipurilor este determinată în primul rând de factorii de mediu, în timp ce în regiunile tropicale și subtropicale selecția genotipurilor fungice este asociată cu particularitățile gazdelor (Bidochka, Small, 2005; Vega *et al.*, 2012).

Fungii din ordinul Entomophthorales dezvoltă epizootii supraterane spectaculoase în populațiile gazdă. Aceste epizootii sunt adesea limitate temporal, deoarece apar atunci când condițiile abiotice sunt favorabile dezvoltării fungice (van Veen *et al.*, 2008; Vega *et al.*, 2012). După cum s-a menționat anterior, majoritatea speciilor din Entomophthorales au un spectru îngust de gazde. Fiind patogeni obligați, ele depind de o gamă limitată de gazde supraterane care sunt disponibile numai în anumite perioade ale anului. Posibil, micromicetele pot supraviețui ca infecții enzootice continue în cadrul populațiilor gazdă, ca corpuri de hife în cadavrele insectelor sau ca infecții latente la speciile care ierneză pe planta gazdă primară (Eilenberg, Pell, 2007).

2 | METODE DE CERCETARE A FUNGILOR ENTOMOPATOGENI

2.1. Metode de cercetare a insectelor

Insectele, atât vii cât și moarte, care sunt evident infectate cu fungi, pot fi găsite în aproape fiecare biotop, inclusiv ecosisteme terestre și acvatice, agroecosisteme, și în populațiile de insecte menționate în condiții de laborator sau colonii comerciale. De multe ori, cercetătorii științifici care colectează insecte sunt primii care remarcă prezența insectelor bolnave.

Astfel, investigarea vizuală a habitatelor de interes sau a coloniilor de insecte menținute în laborator, în scopul identificării indivizilor cu aspect atipic, este un mijloc comun de colectare a exemplarelor bolnave. Mulți agenți patogeni sunt de obicei prezenți la un nivel scăzut în rândul populațiilor de insecte. Acestea sunt cel mai ușor descoperite în timpul epizootiilor, atunci când există o abundență neobișnuită de insecte bolnave.

2.1.1. Speciile de insecte incluse în cercetare

Poziția taxonomică și caracteristica morfologică. Coleopterele curculionoide (Coleoptera, Curculionoidea) sunt gândaci de mărimi mici și mijlocii (1-40 mm), pentru care sunt caracteristice prezența rostrului și antenelor geniculate cu scapul mai îngroșat. Labrumul este absent, iar mandibulele au dimensiuni reduse. Palpii sunt foarte scurți, fiind greu vizibili. Ochii, de obicei, sunt situați pe părțile laterale ale capului și pot fi rotunzi, ovali sau în formă de picătură (Gîdei, Popescu, 2014). Elitrele acoperă complet abdomenul, suprafața elitrelor prezintă, de regulă, linii punctate, strii sau solzi. Majoritatea reprezentanților suprafamiliei Curculionoidea sunt fitofagi îngust specializați trofic, atașați de plantele ierboase. Dezvoltarea este criptică, de obicei în interiorul țesutului vegetal.

***Sitona lineatus*.** Pentru prima dată, specia *Sitona lineatus* (Coleoptera, Curculionoidea) (= *Curculio lineatus* Linnaeus, 1758; *Parasitones lineatus* Sharp, 1896; *Sitones lineatus* Schönherr, 1840) a fost descrisă de Linnaeus în 1758. Actualmente, genul *Sitona* include mai mult de 100 de specii, fiind plasat în tribul *Sitonini*, subfamilia *Entiminae*, familia *Curculionidae* care include majoritatea curculionidelor cu rostrum scurt (Velazquez de Castro, Alonso-Zarazaga, Outerelo, 2007).

Specia *Sitona lineatus* L. este un dăunător al mazării, *Pisum sativum* L. și bobului *Vicia faba* L. (Fabales, Fabaceae), mai fiind numită gărgărița frunzelor de mazăre. Caracterile morfologice ale speciei *S. lineatus* au fost descrise de Jackson în anul 1920. Insectele adulte au 3,6-5,4 mm lungime, corp alungit cu antene, tibia și tarsi roșu-maronii (figura 2.1).

Solzișorii dorsali sunt maro sau gri, intercalați cu perișori plați, fiind dispuși pe elitre în dungi longitudinale, alternante, întunecate și deschise. Solzișorii au tendința

de a forma dungii mediane și sublaterale pe cap și pronotum. Elitrele sunt paralele, cu umeri proeminenți. Rostrumul posedă un șanț central, care se extinde după nivelul marginii posterioare a ochiului. Ochii sunt proeminenți, capul fiind puțin mai îngust decât pronotumul (Petrukha, 1969; Hoebeke, Wheeler, 1985).

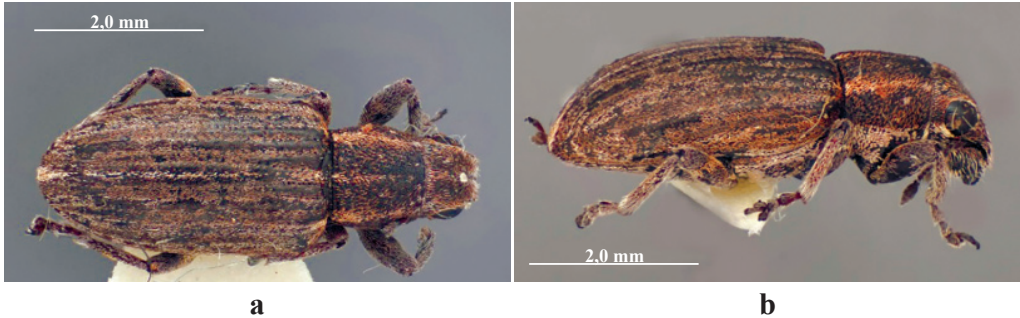


Fig. 2.1. *Sitona lineatus* L., adult (orig. N. Munteanu-Molotievskiy)
a - aspect dorsal, b - aspect lateral

Larvele au corpul cilindric, conic la extremități, 1-1,7 mm lungime, segmentele abdominale sunt de culoare albă cremos, cu perișori brun-roșcați pe fiecare segment, au antene reduse, fălci ușor de distins și nu au ochi. Mandibulele sunt înzestrate cu excrescențe complicate, două mari și una mică. Larvele mature sunt albe, având lungimea de 5-7 mm.

Pupele sunt de culoare albă-crem, cu perișori dorsali. Aspectul extern al pupei amintește insecta adultă, fiind prezente toate organele externe. Ochii sunt semi-proeminenți. Corpul pupei are umflături pielose, cu perechi de perișori pe ele. Segmentele I-VII au câte 6 perechi de perișori, iar al VIII-lea are doar 3 perechi. Segmentul al IX-lea posedă doi țepi mari, lungi, doi țepi intermediari și câte doi țepi mici din ambele părți ale țepilor mari. Segmentul X este puțin vizibil (Alimdzhanov, 1951; Petrukha, 1969). Pupele și insectele adulte se deosebesc după mărimea și forma pigidium-ului (segmentul VIII al scutului abdominal).

***Hypera postica*.** *Hypera (Hypera) postica* (Gyllenhal, 1813) (Coleoptera, Curculionioidea) (= *Rhynchaenus postica* Gyllenhal, 1813; *Curculio haemorrhoidalis* Herbst, 1784; *C. variabilis* Herbst, 1795; *C. bimaculatus* Marsham, 1802; *Phytonomus picipes* Curtis, 1826; *P. sublineatus* Curtis, 1826; *P. villosulus* Curtis, 1826; *P. phaeopus* Stephens, 1831; *P. rufipes* Stephens, 1831; *P. parvus* Gyllenhal, 1834; *P. tibialis* Hochhuth, 1851; *P. sericeus* Capiomont, 1868; *P. siculus* Capiomont, 1868; *P. brevipes* Desbrosher, 1875; *P. austriacus* Petri, 1901; *P. decoratus* Petri, 1901; *P. variabilis* Hbst., *P. posticus* (Gyll.), *P. transsylvanicus* Petri și *P. murina* F.). Actualmente, genul *Hypera* include 5 subgenuri: *Boreohypera* (1 specie), *Dapalinus* (6 sp.), *Eririnomorphus* (7 sp.), *Hypera* (29 sp.) și *Tigrinellus* (2 sp.). Genul *Hypera* face parte din tribul *Hyperini*, subfamilia *Hyperinae*, familia *Curculionidae*.

Lungimea corpului insectelor adulte este de 4,0-5,5 mm. Rostrumul este aproape drept, relativ scurt și gros, fruntea de aproximativ două ori mai lată decât rostrumul. Tulpinile antenelor ating mijlocul ochiului. Ochii – aproape plați. Pronotumul

devine mai lat la mijloc. Colorația pronotumului constă din două benzi întunecate, separate printr-o linie luminoasă îngustă. Elitrele mult mai largi decât pronotumul, umerii puternic proeminenți. Perii sunt puternic înclinați în urmă. Corpul tibiei la mascul este mai îngust și subțire decât la femele, ușor curbat în partea de sus, iar ultimul sternit abdominal la masculi are o adâncitură mică (figura 2.2).

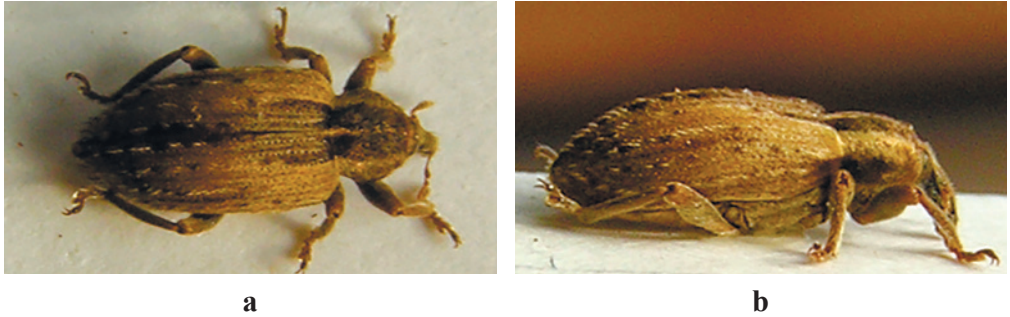


Fig. 2.2. *Hypera postica* (Gyll.), adult (orig. N. Munteanu-Molotievskiy)
a - aspect dorsal, b - aspect lateral

Ouăle sunt inițial de culoare gălbuie, apoi devin maro-deschis, ovale, de $1,0 \times 0,5$ mm.

Larvele prezintă 8 segmente abdominale. Primul stadiu larvar de dezvoltare are o singură setă, al doilea stadiu, are trei, iar al treilea și al patrulea stadiu larvar au cinci sete pe fiecare segment abdominal I-VIII (Skuhrovec, 2006). Pupele au toate particularitățile morfologice ale adulților (figura 2.3).



Fig. 2.3. *Hypera postica*, pupe (orig. N. Munteanu-Molotievskiy)

***Protapion apricans*.** *Protapion apricans* (Herbst, 1797) (Coleoptera, Curculionoidea) (= *Apion apricans*, Herbst, 1797; *Curculio ochropus*, Muller, 1776; *C. ochropus*, Gmelin, 1790; *Apion encaustum*, Wencker, 1864; *A. tubicen*, Wencker, 1864; *A. fuscipes*, Desbrochers, 1891; *A. curvipes*, Desbrochers, 1895). Actualmente, genul *Apion* include 26 de specii, fiind plasat în tribul *Piezotrachelini*, subfamilia *Apioninae*, familia *Apionidae*.

Dimensiunea insectei – 3-3,5 mm, neagră, cu o nuanță metalică, corp în formă de pară, rostrum lung, aproape drept, vârful antenelor negru, la bază – roșu. Lungimea corpului – 2,2-2,7 mm, fără rostrum. Rostrumul la masculi e mai scurt

decât la femele, fiind evident mai mare decât capul și pronotumul. Pronotumul alungit, rareori pătrat. Elitrele mai largi în spate. Primii trei perișori antenali sunt roșii-gălbui, segmentele de culoare maro sau neagră. Corpul și membrele sunt negre. Femurul și tibia pe prim-plan sunt gălbui-roșii, la mijloc și spate maro-închis sau negru (figura 2.4).



Fig. 2.4. *Protapion apricans* (Hbst.)

a - aspect dorsal (U. Schmidt, 2012,

<https://www.flickr.com/photos/coleoptera-us/7261537190/>),

b - aspect lateral (Dave Huges, <https://www.ukbeetles.co.uk/protapion>)

Ouăle au 0,3-0,5 mm, sunt de culoare gălbuie, lungi, netede. Larva atinge 2-2,5 mm, de culoare albă, cu o nuanță crem, curbată, capul maro-închis, maxilarul superior pe fiecare parte cu trei crestături. Pupa de 3-3,5 mm, alb-gălbuie.

Particularitățile ciclului vital. Conform particularităților ciclului vital, curculionioidele pot fi divizate în două grupuri: 1) cele care ierneză în stadiul de insectă adultă și 2) cele care ierneză în stadiul de larvă. Toate speciile incluse în studiu se referă la primul grup.

***Sitona lineatus*.** Insectele adulte din specia *S. lineatus* ierneză în fâșiile forestiere (Jackson 1920) sau în vecinătatea leguminoaselor perene, inclusiv trifoi și specii de mazărice (Schotzko, O’Keeffe, 1988; Murray, Clements, 1992). În perioada nereproductivă, adulții sunt oligofagi și consumă o gama mai largă de plante leguminoase (Landon *et al.*, 1995). Insectele devin active atunci când temperatura aerului atinge 12-14°C, iar la nivelul solului se înregistrează 19-20°C (Petrukha, 1969; Hamon *et al.*, 1987). Se disting două perioade de zbor ale insectei: zborul migrator de primăvară din locurile de iernare spre planta gazdă, mazăre sau fasole și zborul pentru iernare vara târziu sau toamna (Fisher, O’Keeffe, 1979a). Migrarea de primăvară a insectelor din locurile de iernare spre planta gazdă are loc doar dacă temperaturile favorabile se mențin timp de cel puțin 2-3 zile (Petrukha, 1969). În funcție de regiune, insecta adultă migrează spre culturile de leguminoase anuale în lunile martie și aprilie (Jackson, 1920). În regiunile mai reci, de exemplu în apropierea orașului Moscova, zborul insectelor revine începutului lunii mai (Belyaev,

1934). După ce gărgărițele ajung la planta gazdă (mazăre, fasole, bob, lucernă), are loc împerecherea și femelele încep depunerea ouălor. Durata perioadei de ovipoziție variază în funcție de regiune, constituind, în general, un interval de 10 zile (Williams, Schotzko, O’Keeffe, 1995). Depunerea ouălor continuă până la o perioadă scurtă de timp înainte de deces, sau până la sfârșitul lunii iunie - începutul lunii iulie (Jackson, 1920; Petrukha, 1969). Valori maxime ale ovipoziției se înregistrează în intervalul dintre 12-22°C (Hans, 1959). Numărul de ouă pentru o femelă variază de la 354 la 1655 (Jackson, 1920), iar, conform unor date, până la 3500 de ouă (Petrukha, 1969). La începutul perioadei de ovipoziție, femela produce doar 1-5 ouă pe zi, iar mai târziu rata crește până la aproximativ 24 de ouă/femelă pe zi (Jackson, 1920). Ouăle sunt împrăștiate pe suprafața solului de către femelă, concomitent cu hrănirea (Jackson 1920; Hoebeke, Wheeler, 1985).

Stadiul de ou pentru specia *S. lineatus* variază în funcție de temperatură și umiditate. Conform unor autori (Jackson, 1920), ouăle eclozează timp de 20-21 zile, însă perioada de incubație poate fi uneori redusă la 18 zile (Prescott, Reeher, 1961; Hoebeke, Wheeler, 1985). Cercetările efectuate au indicat că ouăle necesită $70 \pm 2,5$ zile pentru a ecloza la temperatura de 8°C și doar $6,2 \pm 0,5$ zile la 29°C. La temperaturi peste 30°C, timpul necesar pentru incubare și rata mortalității crește semnificativ. La temperatura de 33°C nu reușesc să eclozeze 100% din ouă, deși a avut loc dezvoltarea embrionară înaintată (Lerin, 2004). Umiditatea relativă poate afecta, de asemenea, timpul de dezvoltare al ouălor. S-a remarcat faptul că ouăle supuse deshidratării excesive nu eclozează (Jackson, 1920). După incubare, larva pătrunde în sol în căutarea plantei gazdă, produce o gaură aproape nedetectabilă în nodozitățile rădăcinii și pătrunde în interior (Jackson, 1920; Hoebeke, Wheeler, 1985). Larva parcurge toate fazele de dezvoltare timp de 30-60 de zile, în funcție de regiunea geografică și de temperatura solului (Jackson, 1920; Hoebeke, Wheeler, 1985; Landon *et al.*, 1995). După maturizare, larvele formează în sol celule-pupale de formă ovală (Jackson, 1920). Formarea pupei necesită 16-19 zile în Europa (Jackson, 1920) și aproximativ 15 zile în America de Nord (Prescott, Reeher, 1961; Hoebeke, Wheeler, 1985). Insecta adultă rămâne în sol până ce exoscheletul său este deplin sclerificat (Jackson, 1920).

Noua generație de insecte adulte se hrănește pe țesutul verde al frunzelor de mazăre și fasole. Atunci când aceste surse de hrană se epuizează sau frunzele îmbătrânesc, începe o perioadă de zbor extins, în care gărgărițele se hrănesc pe o varietate mai mare de leguminoase gazde secundare (Jackson, 1920; Fisher, O’Keeffe, 1979; b, c, Hamon *et al.*, 1987; Murray, Clements, 1992). Această perioadă continuă până la sfârșitul verii sau toamna, atunci când insectele adulte caută locuri pentru iernare (Jackson, 1920; Hoebeke, Wheeler, 1985). În America de Nord, Anglia și Rusia *S. lineatus* este univoltină (Jackson, 1920; Hoebeke, Wheeler, 1985; Petrukha, 1969). Cu toate acestea, în unele regiuni specia poate fi bivoltină (Hans, 1959; Hoebeke, Wheeler, 1985). În câmp, insectele adulte pot trăi până la unsprezece luni, longevitatea fiind limitată de disponibilitatea resurselor alimentare și densitatea populației. Longevitatea femelelor este mai mare decât longevitatea masculilor la densități scăzute ale populației (Schotzko, O’Keeffe, 1988).

Hypera postica. Ciclul de viață al speciei *H. postica* poate fi caracterizat prin perioade scurte de activitate intensă și perioade lungi de inactivitate. *Hypera postica* prezintă o remarcabilă plasticitate comportamentală și ecologică (Hsiao, 1993). Cele mai multe populații sunt univoltine (Helgesen, Cooley, 1976), dar în unele medii, în special în regiunile din sud, poate fi o a doua generație (Michelbacher, 1943; White *et al.*, 1969). Insecta iernează în stadiul de adult. În localitățile cu ierni blânde, ouăle, larvele și pupele, de asemenea, pot supraviețui iernii (Armbrust, White, deWitt, 1969; Radcliffe, Flanders, 1998).

În funcție de regiune, în special în cele sudice, depunerea pantei poate avea loc toamna, iarna și primăvara (Woodside, Bishop, Pienkowski, 1968; Campbell *et al.*, 1975; Whitford, Quisenberry, 1990), ori de câte ori temperaturile depășesc 1,7°C (Hsieh, Roberts, Armbrust, 1974). Tulpina tânără a lucernei este locul preferat pentru depunerea pantei (Pass, 1967), cu toate acestea, ouăle sunt depuse și în tulpinile buruienilor, printre care, *Poa bulbosa* L., *Stellaria* sp. (L.), *Capsella bursa - pastoris* (L.) (Ben Saad, Bishop, 1969; Niemczyk, Flessel, 1970). Odată ce locul pentru depunerea pantei este ales, femela perforează peretele plantei, introduce ovipozitorul și depune un grup de 9-10 ouă de culoare galbenă (Niemczyk, Flessel, 1970).

În condiții optime de laborator, potențialul de reproducere este ≈ 3650 de ouă per femelă (Coles, Day, 1977). Rata de ovipoziție crește liniar cu temperatura până la 30°C (LeCato, Pienkowski, 1972; Hsieh, Roberts, Armbrust, 1974). Incubația necesită 156 GZ (grade zile), cu un prag al temperaturii de 9,0°C per zi (Roberts, DeWitt, Armbrust 1970). Larva apărută se alimentează cu măduva tulpinii, apoi creează galerii spre exterior. Ieșind, urcă pe mugurii foliari terminali cu care se hrănește în continuare. Insecta posedă patru stadii larvare. Temperatura limită de dezvoltare este de 8,9°C, cu suma temperaturilor necesare pentru a finaliza dezvoltarea larvelor egală cu 148°C (Litsinger, Apple, 1973). Insecta imatură se transformă în pupă și imago, după acumularea de 77 GZ (Hsieh, Roberts, Armbrust, 1974). Insecta adultă rămâne în câmpurile de lucernă timp de 1-3 săptămâni pentru hrănirea suplimentară sau până la prima recoltare, apoi migrează spre locurile potrivite pentru estivare, de obicei, în afara câmpurilor de lucernă (Tysowsky, Dorsey, 1970; Kuhar, Youngman, Laub, 2010; Zahiri *et al.*, 2014) unde are loc dezvoltarea sexuală, iar activitatea metabolică este încetinită (Litsinger, Apple, 1973). Datorită schimbării fotoperioadei, insectele adulte devin din nou active, migrează înapoi spre câmpurile de lucernă, ating maturitatea sexuală și încep depunerea pantei (Kuhar, Youngman, Laub, 2000).

Protapion apricans. Insectele adulte ale speciei *Protapion apricans* hibernează în resturile vegetale de la suprafața solului în câmpurile de trifoi și terenurile adiacente. Unele insecte adulte pot rămâne în diapauză până la 2 ani. Migrația gândacilor din locurile de iernare coincide cu faza de creștere a trifoiului. Hrănirea suplimentară are loc pe frunzele de trifoi sălbatic și apoi pe cele de cultură (Friedman, Freidberg, 2007). Insectele, hrănindu-se, produc leziuni pe frunze în formă de găuri mici și, de asemenea, deteriorează tulpinile, muguri apicali și floralii.

Femela depune ouăle în bobocii florilor sau în flori. Ouăle sunt depuse între staminele florii, fiind aproape de aceeași culoare cu acestea. O femelă poate depune 11-

217 ouă, cu o medie de 35 de ouă. Depunerea pondei începe la sfârșitul lunii mai, cu atingerea valorii maxime în luna iunie. Dezvoltarea embrionară durează 8-12 zile. Larvele eclozate pătrund în ovarul florii, unde încep nutriția. De-a lungul perioadei de dezvoltare, 15-25 zile, o larvă distruge 7-11 ovare și alte 8-10 ovare pentru împu-pare, în care larva perforează găuri (Hansen, Boelt, 2008; Lundin *et al.*, 2012). Astfel, o larvă poate distruge 30-40% din ovarele unui capitul de trifoi. Pupa se dezvoltă în 5-9 zile (conform altor date 5-12). Insectele adulte apar din a doua jumătate a lunii iulie până în septembrie, uneori – până în octombrie. Înainte de iernare, insectele se hrănesc cu o gamă variată de gazde (circa 160 specii de plante). Cele mai mari daune trifoiului sunt aduse de larve. Insecta este univoltină, dar adulții pot trăi 2-3 ani. Un ciclu de dezvoltare normală de la ou până la insecta adultă durează 40-47 de zile.

Relațiile trofice

Sitona lineatus. Preferințele trofice ale speciei *Sitona lineatus* pot fi divizate în 4 grupuri:

- 1) surse alimentare de bază (mazărea, fasolea, bobul și vicia);
- 2) plante utilizate în absența celor de bază (trifoi, lucernă, esparcetă);
- 3) culturi leguminoase pe care insectele le utilizează rar, chiar și în absența plantelor din grupurile I și II (soia, lupin, linte, latirul, mazăricea păroasă);
- 4) plante care nu sunt utilizate (agriș, sfecla de zahăr, pin, zmeură, vișine, cireșe, prune ș.a.) (Turaev, 1957).

Adulții speciei *S. lineatus* după diapauză în calitate de plantă gazdă preferă mazărea de câmp și fasolea (Landon *et al.* 1995). Ambele specii de plante au o relație simbiotică cu bacteria azot-fixatoare, *Rhizobium leguminosarum* var. *viciae*, ceea ce poate explica preferința insectei (Spaink, 1994; Mutch, Young, 2004). Dezvoltarea funcției reproductive a femelelor are loc din iulie până în martie în timpul hrănirii pe gazde atât primare, cât și secundare (Schotzko, O'Keeffe, 1986a). Cu toate acestea, se crede că oogeneza solicită hrănire post-diapauză pe ambele specii de plante *P. sativum* și *V. faba* (Hans, 1959, Fisher, O'Keeffe, 1979a; Schotzko, O'Keeffe, 1986a; Hamon *et al.*, 1987, Landon *et al.*, 1995).

Preferințele trofice ale speciei *Sitona lineatus* pot varia de asemenea între genotipurile gazdelor primare, insectele adulte preferând anumite soiuri de mazăre (Havlickova, 1980; Cantot, 1989; Kordan, Sledz, 1994; Wojciechowicz-Zytko, Mlynarczyk, 2002). S-a constatat că rata de supraviețuire și durata de viață a insectei variază în funcție de soiurile de fasole (Wojciechowicz-Zytko, Mlynarczyk, 2002). Un număr mare de fabacee perene servesc drept gazde pentru *S. lineatus* primăvara, înainte de apariția leguminoaselor anuale, la sfârșitul verii și toamna, când leguminoasele anuale îmbătrânesc, și în timpul perioadei de iernare (Jackson, 1920; Fisher, O'Keeffe, 1979a; Hoebeke, Wheeler, 1985; Hamon *et al.*, 1987; Murray, Clements, 1992, 1995). Conform unor date, reprezentanții genului *Sitona* au constituit 59-96% din exemplarele de insecte colectate la sfârșitul verii, pe trifoiul alb, *Trifolium repens* L. (Fabales, *Fabaceae*) (Markkula, Koppa, 1960). În Anglia, gâr-gărița frunzelor de mazăre deteriorează în mod semnificativ trifoiul alb, consumând

în timpul iernării până la 30% din suprafața fotosintetizatoare a plantelor (Murray, Clements, 1995). În experiențele de câmp, insectele au preferat trifoiul dulce, *Melilotus albus* L. (Fabales, *Fabaceae*), și lucerna (Krasnopolskaya, 1966; Zlatanov 1966; Lykouressis, Emmanouel, 1991; Murray, Clements, 1994). Lupinul, *Lupinus albus* L. (Fabales, *Fabaceae*), a înregistrat niveluri semnificative ale deteriorărilor în Germania (Ferguson, 1994). În consecință, *S. lineatus* prezintă un comportament eurilogofag, consumând plante din genurile familiei *Fabaceae* (Petrukha, 1969). Conform unor autori, *S. lineatus* prezintă „un comportament limitat polifag” (Greib, Klingauf, 1977), deoarece în absența de leguminoase în experimentele de laborator și câmp au fost consumate *Polygonum aviculare* L. (Polygonales, *Polygonaceae*) și speciile de trandafiri *Rosa* spp. (Rosales, *Rosaceae*).

În rezultatul studiilor efectuate în Republica Moldova, pentru *S. lineatus* a fost stabilit următorul spectru trofic incluzând reprezentanți ai familiei *Fabaceae*: *Medicago sativa* (lucerna), *Pisum sativum* (mazăre), *Vicia faba* (bob de fasole), *Trifolium* spp. (trifoiul), *Lotus* spp., *Melilotus* spp., *Ononis* spp. (osul iepurelui), *Robinia* spp. (salcâm) (Malevanciuc, Munteanu, 2010).

***Hypera postica*.** Specia *H. postica* se hrănește cu o mare varietate de plante fabacee și este cunoscută în America de Nord ca unul dintre cei mai periculoși dăunătorii ai lucernei (Hsiao 1993). *H. postica* este o insectă tipic oligofagă care se hrănește aproape exclusiv pe plantele leguminoase din genul *Medicago*. Ocazional, se poate hrăni cu câteva specii din genuri apropiate, inclusiv: *Trifolium* și *Trigonella* (Kuwata *et al.*, 2005; Talwar, 2015). De asemenea se mai dezvoltă pe *Medicago lupulina*, *Melilotus alba*, *M. officinalis*, *Trifolium pratense*, *T. repens*, *T. hybridum*, și *T. incarnatum*.

Specia are patru stadii larvare: Primul (L1) și a doilea (L2) se hrănesc de obicei cu florile *Medicago sativa* L. Cei de-al treilea (L3) și al patrulea (L4) se hrănesc, de asemenea, pe frunze și pot provoca defolieri grave (Hoff, Brewer, Blodgett, 2002; Skuhrovec, 2006).

***Protapion apricans*.** Habitatele tipice sunt speciile de pajiști montane și habitatele ruderales segetale (graminee perene), fiind mai rar întâlnită în lizierele pădurilor. În mod regulat și în cantități mari, se găsește pe *Trifolium pratense* (care predomină întotdeauna printre alte specii) (Nazarenko 2013), mai puțin pe *Amaria hybrida*, *A. repens* și alte leguminoase (*Lupinaster pentaphyllus*, *Lathyrus vernus*, *Vicia cracca* și *V. tenuifolia*). La mijlocul verii, adulții, de obicei, pot fi găsiți în coroanele arborilor și arbuștilor.

2.1.2. Colectarea materialului biologic și inspectarea preventivă a acestuia la prezența infecției fungice

Recunoașterea insectelor bolnave în câmp sau ulterior, în laborator, inițial se bazează pe recunoașterea unor semne specifice procesului patologic. Insectele care sunt evident infectate cu patogeni adesea prezintă simptome caracteristice evidente și semne ale bolii, de exemplu, modificări de culoare, creșterea luxuriantă a agentu-

lui patogen pe exteriorul specimenului, semnele agentului în interiorul gazdei, vizibile prin cuticulă, dizenterie, comportament ciudat, inclusiv lipsa hrănirii sau poziția neobișnuită pe planta gazdă, mumifierea, fragilitatea sau întărirea tegumentului, diferențe notabile în mărime și alte semne și simptome. În unele cazuri, simptomele bolii pot fi foarte subtile sau nu sunt evidente, de exemplu, efectele subletale, cum ar fi castrarea parazitară, longevitatea redusă etc. Insectele bolnave pot fi recunoscute după mai mulți indici:

1. Modificarea culorii. Modificarea culorii este unul dintre simptomele patologiei la insecte. Acest fenomen poate fi observat atât la insectele vii cât și la cele moarte. De obicei, la insectele vii integumentele devin semi-transparente sau chiar transparente, de exemplu la Curculionide, Himenoptere, Diptere și alte insecte formele larvare infectate devin albe. Schimbarea culorii poate fi subtilă sau pronunțată. Un spectru larg de culori pot fi evidențiate la insectele moarte de la alb, sur, roșu, oranj, galben, albastru, verde, cafeniu sau negru. Suprafețele melanizate ale cuticulei (sub forma unor pete negre) reprezintă un răspuns imun frecvent al insectelor la atacul fungilor, microsporidiilor, nematozilor.

2. Semnele fizice ale prezenței patogenului. Adesea, agentul cauzal al bolii poate fi observat în asociere directă cu insectele infectate vii sau moarte. Unele dintre cele mai spectaculoase infecții la insecte sunt produse de patogenii fungici, provocând creșterea unui miceliu colorat la suprafața insectei. De exemplu, larvele speciei *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera) infectate cu micromiceta *Beauveria bassiana* își modifică culoarea în roz pal înainte de moarte. Localizarea țesuturilor infectate poate fi, de asemenea, caracteristică pentru anumiți patogeni și poate fi vizibilă prin cuticulă.

Unele specii de fungi care împrăștie sporii în jurul gazdei pe substrat produc un nimb distinct în jurul insectei infectate. Propagulele infecțioase prezintă o gamă largă de forme și mărimi (de la 5 μm la câțiva mm) motile, fiind împrăștiate de pe cadavrele gazdă, purtate de vânt, dispersate prin apă sau de către insecte. Majoritatea fungilor entomopatogeniucid gazdele în timp relativ scurt după apariția infecției. După moartea insectei, sporii infecțioși sunt de obicei produși la suprafața acesteia. De asemenea, în interiorul gazdei, pot fi găsiți spori de rezistență, mai mari, cu pereți groși. Corpurile insectelor sunt adesea mumificate din cauza micozei și pot persista în mediu timp de câteva săptămâni, care permite izolarea agentului patogen mult timp după moartea gazdei. Stadii de dezvoltare și de reproducere ale ciupercilor entomopatogene pot fi, de asemenea, găsite în gazde vii, cel mai frecvent în larvele dipterele acvatice.

3. Comportamentul aberant. Iritabilitatea, dispersarea sau agregarea neobișnuită, încetarea alimentării sunt comportamente care pot indica prezența unei boli infecțioase într-o populație sau într-o colonie de insecte. Insectele infectate cu anumite ciuperci urcă deseori la înălțimi mari pe planta gazdă și se atașează de ea chiar înainte de moarte.

4. Modificări ale formei și texturii. La insectele bolnave, cel mai des după moarte apare o varietate de schimbări fizice. Cadavrele pot deveni mumificate, moi sau lichefiate, tari, asemănătoare cu brânza sau tăbăcite și uscate în interior.

5. Mirosul. În anumite cazuri, cadavrele pot prezenta miros. Mirosul apare de obicei atunci când țesuturile corpului sunt lichefiate.

Colectarea manuală a insectelor permite selectivitatea și conservarea probei, în cazul în care acestea sunt importante. Acest lucru este preferabil de a fi realizat atunci când la examinarea în câmp se atestă prezența exemplarelor moarte, cadavrelor cu semne de sporulare externă, a cadavrelor mumificate. Insectele moarte sau muribunde, posibil datorită infecției de către un agent patogen, ar trebui să fie colectate separat în recipiente sterile etanșabile (pentru o perioadă foarte scurtă de timp, pentru a evita creșterea bacteriană și fungică intensă), transportate separat, astfel încât agenții patogeni să nu infecteze exemplarele vii. În câmp, insectele bolnave trebuie îndepărtate de pe substratul pe care se găsesc cu penseta și plasate individual, dacă este posibil, în recipiente curate și uscate, preferabil sterile (figura 2.5).

Pentru a evita deteriorarea cadavrelor care sunt bine fixate pe substrat, porțiunea plantei gazdă pe care acestea sunt fixate trebuie colectată împreună cu insecta atașată pe ea. Insecte vii cu semne evidente de infecție trebuie să fie păstrate în mediul în care acestea se găsesc (adică pe frunze, în sol sau apă) și transportate în laborator cât mai curând posibil. Insectele acvatice pot fi, de asemenea, transportate pe plante acvatice umede. Temperaturile reduse vor ajuta la reducerea stresului asupra organismelor și reține creșterea microbiană nedorită, până când acestea pot fi examinate.

O altă strategie constă în colectarea unui număr mare de insecte vii utilizând metode entomologice standard (capcane, fileul entomologic, plase). Există două considerații majore atunci când se colectează insecte pentru a izola agenții patogeni ai acestora: evitarea expunerii la radiațiile UV și căldură excesivă în câmp și în vehicule și evitarea morții și descompunerii gazdelor vii în timpul transportării. Într-o mare măsură, cerințele privind temperatura sau alte condiții de menținere a agentului patogen sunt dependente de condițiile necesare pentru a menține în viață gazda în timpul perioadei de colectare și transportare spre laborator. Insectele din aceeași specie care nu sunt canibali pot fi transportate în masă în cuști sau în cutii umplute cu vegetație sau alt material cu posibilitatea răcirii acestora. Este important să se evite condensarea și topirea gheții de la elementele de răcire. Insectele mici se pot îneca cu ușurință în cantități foarte mici de condens și tuburile



Fig. 2.5. Adult din specia *Sitona lineatus* (Coleoptera), cu semne vizibile de infecție fungică, plasat în eprubetă sterilă pentru transportarea în laborator (orig. A. Moldovan)

se vor scufunda în apă. Preferabil este de a utiliza pachete de gheață comercială (Lacey, Solter, 2012).

Containerele de colectare pentru insectele vii pot include orice tip de cușcă, care ar împiedica ca acestea să scape, inclusiv tuburi din plastic cu pori sau cu dopuri de bumbac pentru circulația aerului și prevenirea formării condensatului. Adăugarea unui agent de uscarea, cum ar fi silicagel, pentru depozitarea temporară va încetini sau preveni germinarea fungilor entomopatojeni și va contribui la minimizarea dezvoltării ciupercilor saprofite la suprafața speciilor.

Atunci când o insectă este suspectată de a fi infectată cu un agent entomopatogen fungic, trebuie examinată cât mai curând posibil după colectare. Invazia exemplarelor moarte de către organisme saprofite cu creștere rapidă poate complica determinarea adevăratului agent etiologic.

Insectele sănătoase trebuie să fie colectate, de asemenea, în scopuri comparative, separat de indivizii bolnavi sau morți, în condiții care să permită o bună supraviețuire. În cazul în care exemplarele infectate sunt rare sau infecțiile sunt inaparente, un număr mare de indivizi aparent sănătoși poate fi de asemenea utilizat pentru creșterea în condiții mai puțin favorabile pentru supraviețuire. În condiții de stres se poate accelera perioada de incubație și dezvoltarea agenților patogeni, care sunt prezenți la un nivel scăzut sau într-o perioadă de eclipsă la momentul colectării. Insectele menținute în spații mici, fără hrană, manifestă mai rapid infecția cu semnificație clinică prin inducerea bolii care s-ar putea să nu fie evidentă în câmp (Steinhaus, 1958).

Cu toate acestea, Weiser și Briggs (1971) avertizează că aglomerarea și/ sau alimentarea excesivă poate provoca asfixia sau stimula dezvoltarea bacteriilor facultativ saprofite. În plus, unele specii de insecte devin agresive sau chiar manifestă canibalism atunci când sunt menținute în număr mare. Larvele și adulții aparent sănătoși, de asemenea, pot fi prelucrați prin triturare, urmată de centrifugare diferențială pentru a concentra și detecta agenții patogeni cu prevalență scăzută, fie folosind metode microbiologice, microscopice sau molecular-genetice (Lacey, Solter, 2012). Exemplarele fără semne evidente ale unui proces patologic pot fi menținute în frigider până la realizarea experiențelor de izolare a fungilor entomopatojeni.

La momentul colectării insectelor este necesar de notat următoarele date: 1) insecta (specia, stadiul în ciclul celular, comportament aberant, modificări morfologice, alte semne evidente ale procesului patologic, locul nemijlocit al colectării); 2) planta gazdă, habitat; 3) prevalența bolii (indivizi izolați, epizootie); 4) locul colectării, elevația, condiții climatice (date GPS); 5) data colectării.

Pentru a izola micromicete din corpul insectelor au fost colectate exemplare adulte din speciile *Sitona lineatus*, *Hypera postica* și *Protapion apricans*. Colectările au fost realizate în perioada lunilor aprilie - septembrie 2010 și 2016 în 6 localități din Nordul, Centrul și Sudul Republicii Moldova (Glodeni, Lozova, Siret, Ivanca, Copanca și Congaz) (tabelul 2.1).

Pentru colectarea insectelor au fost utilizate metode clasice entomologice (Bacal, Cocîrță, Munteanu, 2014), care includ cosirea cu fileul entomologic, scuturarea

insectelor pe bucăți de pânză, colectarea manuală. Insectele vii din aceeași specie au fost transportate în masă în cutii cu lucernă proaspătă și asigurând accesul aerului, evitând expunerea la radiațiile UV și căldură excesivă. Insectele evident infectate cu micromicete patogene, prezentând simptome și semne caracteristice ale bolii (modificări de culoare, melanizarea cuticulei, creșterea agentului patogen la exteriorul insectei, semnele agentului în interiorul gazdei, vizibile prin cuticulă, comportament ciudat, inclusiv lipsa hrănirii sau poziția neobișnuită pe planta gazdă, mumifierea, fragilitatea sau întărirea tegumentului, diferențe notabile în mărime și alte semne și simptome), au fost transportate în laborator separat în eprubete de sticlă sterile cu dop de bumbac și plasate individual în cutii de plastic. Confirmarea corectitudinii identificării speciilor de insecte a fost realizată prin consultarea materialului Muzeului de Entomologie al Institutului de Zoologie al AȘM. Identificarea apartenenței specifice a coleopterelor curculionoide a fost efectuată cu utilizarea lupei binoculare BEL Photonics.

Tabelul 2.1. Data și locul colectării materialului biologic

Nr.	Locul colectării	Coordonate geografice	Data colectării	Planta gazdă	Specia	Nr. de exemplare
1.	Copanca	N 46° 42' 55" E 29° 37' 37"	03.09.2010	lucernă	<i>H. postica</i>	13
					<i>S. lineatus</i>	10
					<i>P. apricans</i>	9
2.	Ivanca	N 47° 17' 08" E 28° 51' 17"	14.07.2010		<i>H. postica</i>	11
					<i>S. lineatus</i>	7
					<i>P. apricans</i>	8
3.	Glodeni	N 47° 46' 15" E 27° 30' 52"	27.04.2010		<i>H. postica</i>	12
					<i>S. lineatus</i>	11
					<i>P. apricans</i>	4
4.	Siret	N 47° 08' 02" E 28° 42' 51"	27.04.2010		<i>H. postica</i>	6
					<i>S. lineatus</i>	8
					<i>P. apricans</i>	5
5.	Lozova, r. Codrii	N 47° 07' 58" E 28° 23' 09"	15.04.2010	<i>H. postica</i>	6	
				<i>S. lineatus</i>	3	
				<i>P. apricans</i>	3	
6	Vrănești-Orhei	N 47° 24' 11" E 27° 36' 07" ^o	09.06.2016	<i>H. postica</i>	200	
				<i>S. lineatus</i>	100	
				<i>P. apricans</i>	50	
7	Congaz	N 46° 03' 04" E 28° 34' 13"	10.06.2016	<i>H. postica</i>	100	
				<i>S. lineatus</i>	200	
				<i>P. apricans</i>	50	

2.1.3. Metode de investigare a insectelor în laborator

Diagnosticul bazat pe patologie poate fi destul de înșelător în cazul în care nu a fost urmat de studii suplimentare. Câteva clase de semne și simptome sunt comune pentru diferite grupuri de entomopatogeni (culoare, miros, comportament) sau pot fi rezultatul unor alte cauze, cum ar fi insecticidele chimice, nutriția necalitativă, etc. Detalii privind condițiile generale de laborator și bunele practici de laborator (curățenia, sterilitatea instrumentelor etc.), adecvate pentru examinarea insectelor bolnave, sunt prezentate de Weiser și Briggs (1971), Lacey (2012).

Un sistem de evidență completă a indivizilor infectați a fost conceput de către Steinhaus și Marsh (1962, publicat în Steinhaus, 1963a). Acesta acoperă spectrul de informații legate de insectele bolnave, examinarea lor și, în cele din urmă, evaluarea și înregistrarea concluziilor privind diagnosticul bolii. Împreună cu datele de câmp și alte informații referitoare la colectare (data, persoana care a colectat, numărul de exemplare etc.), specimenelor li se atribuie un număr de identificare. Numărul de identificare este mijlocul prin care indivizii sunt urmăriți în cadrul diferitor teste, izolării microorganismelor și în testele de evaluare a potențialului patogen.

Diagnosticul final – satisfacerea postulatelor lui Koch

Identificarea prezenței unui agent patogen suspectat într-o insectă bolnavă nu incriminează întotdeauna organismul ca agent cauzal al bolii. Verificarea satisfacerii postulatelor lui Robert Koch (1843-1910) este cel mai bun mod de a oferi un diagnostic final corect. Pentru a confirma că microorganismul izolat este agentul cauzal al bolii trebuie parcurși următorii pași (Vega, Kaya 2012; Lacey, Solter, 2012):

1. Agentul patogen trebuie să fie izolat din toate insectele bolnave examinate, iar semnele și/sau simptomele bolii înregistrate.

2. Agentul patogen trebuie să fie cultivat în cultură aseptică pe un mediu nutritiv (pentru agenți facultativ patogeni) sau într-o insectă susceptibilă (pentru agenți obligat patogeni) și trebuie să fie identificat și/sau caracterizat.

3. Agentul patogen trebuie să fie inoculat pe/în insecte sănătoase din aceeași specie sau o specie înrudită cu originalul, fiind prezente aceleași semne și simptome ale bolii.

4. Agentul patogen trebuie să fie izolat în cultură aseptică sau într-o insectă susceptibilă din nou, iar caracteristicile sale trebuie să fie exact ca și cele observate la pasul 2.

Nu este întotdeauna posibil să fie satisfăcute în măsură egală toate postulatele lui Koch, deoarece unul sau mai mulți pași nu pot fi executați sau pot fi executați doar cu mare dificultate. Pentru pasul 1, unele organisme sunt greu de detectat, deși microscopul electronic a făcut posibilă vizualizarea organismelor submicroscopice. Cu toate acestea, simpla prezență a acestor organisme într-o gazdă nu dovedește că ele sunt agentul cauzal al unei anumite boli. Pentru pasul 2, anumite microorganisme nu pot fi izolate în cultură pură sau sunt foarte dificil de cultivat. Pentru pasul 3, diferiți agenți patogeni pot produce semne, simptome și sindroame similare care pot duce în mod eronat la desemnarea organismului greșit ca agent etiologic (Kaya, Vega, 2012).

Realizările biologiei moleculare au permis de a fi lansat conceptul de „postulate Koch moleculare”. Postulatele moleculare ale lui Koch propuse de Falkow (2004) sunt folosite pentru a demonstra că o anumită genă sau un set de gene este factorul de virulență și inactivarea acestei gene(lor) duce la pierderea patogenității, fiind formulate după cum urmează:

1. Fenotipul sau proprietatea cercetată trebuie să fie asociată cu un microorganism patogen din anumit gen sau tulpină din anumită specie.

2. Inactivarea specifică sau deleția genei(lor) din genomul microorganismului ar trebui să ducă la pierderea funcției în clona respectivă;

3. Restaurarea patogenității ar trebui să aibă loc odată cu reintroducerea genei sălbatice în microorganism.

Satisfacerea postulatelor lui Koch pentru a confirma prezența unui agent infecțios este pasul final în procesul de diagnostic al infecției. Prepararea inoculului pentru astfel de teste poate necesita izolarea și cultivarea agentului patogen sau presupus patogen pe un mediu nutritiv. Atunci când acest lucru nu este posibil, de exemplu, în cazul patogenilor obligatori, se realizează izolarea inocului direct din gazdele colectate în câmp sau infectate în laborator. Uneori este necesară utilizarea unor gazde intermediare.

Atunci când este posibilă menținerea în cultură pe mediu artificial a unui agent patogen suspectat, asigurând producerea de propagule infecțioase, satisfacerea postulatelor lui Koch este un proces relativ simplu. Cu toate acestea, multe organisme sunt patogeni obligați (toate virusurile și rickettsiile, multe protozoare, unele ciuperci, nematode și bacterii). În aceste cazuri, agentul infecțios este produs *in vivo* și purificat. Patogenii obligați care necesită gazde intermediare (unele protozoare și fungi) pot fi problematic de izolat în special în cazul în care gazda intermediară nu este încă cunoscută. De asemenea, stresul creat în timpul cultivării în condiții de laborator poate exagera virulența și exacerba susceptibilitatea gazdei la infecția cu organisme facultativ patogene.

2.2. Metode de izolare a fungilor entomopatogeni

2.2.1. Izolarea fungilor din exemplare fără semne de infecție fungică

Atunci când este necesar de obținut o probă necontaminată de țesut infectat pentru inocularea mediului sau injectarea în insecte sănătoase, este necesară sterilizarea suprafeței insectelor.

Etapele de bază ale sterilizării sunt (Inglis, Enkerli, Goettel, 2012):

1) plasarea insectei în alcool etilic de 70% pentru câteva secunde pentru a facilita umectarea individului și a steriliza suprafața;

2) spălarea în apă distilată sterilă;

3) sterilizarea în hipoclorit de sodiu diluat (NaClO) pentru 1 min. (înălbitor obișnuit, 3-5% NaClO, diluat până la concentrația finală de 0,5-1% NaClO în funcție de mărimea și starea specimenului);

4) spălarea minuțioasă în apă sterilă (3 schimbări ale apei);

5) uscarea pe hârtie de filtru sterilă.

Variațiile metodei de mai sus includ menținerea mai mult sau mai puțin timp în alcool, concentrație mai mare sau mai mică de NaClO sau mai puține clătiri în apă. Datorită naturii hidrofobe a cuticulei insectelor, adăugarea la NaOCI a unui agent activ de suprafață, cum ar fi Tween 80, poate crește eficiența (Inglis, Enkerli, Goettel, 2012).

Sterilizarea suprafeței insectelor foarte mici va ucide patogenul din interiorul gazdei (de exemplu, hemipterele infectate cu fungi entomopatogeni). În acest caz, specimenul urmează a fi plasat în condiții de umiditate pentru a stimula sporularea, colectarea sporilor din vârfurile conidioforilor, fiind realizată prin transferarea sporilor mai distali pe o cantitate mică de mediu nutritiv steril plasat în vârful unui ac steril și apoi inocularea pe un mediu nutritiv corespunzător.

În cadrul cercetărilor realizate, eficacitatea procedurii de sterilizare a fost confirmată prin agitarea insectei tratate în mediul nutritiv Nutrient Agar (NA) steril lichid (1L H₂O dublu-distilată; 5g Tryptone, 3g extract de drojdii, 5g NaCl, pH 7,4) fiind verificată prezența dezvoltării microorganismelor după 1-3 zile. La aplicarea acestei metode trebuie asigurată integritatea tegumentelor corpului insectei.

Pentru izolarea fungilor entomopatogeni, corpurile insectelor sunt plasate în tuburi Ependorff de 1,5 ml, conținând 800 μl de apă dublu-distilată sterilă și triturate intens cu ajutorul bețișoarelor sterile. Câte 100 μl de suspensie sunt aplicate pe suprafața cutiilor Petri cu medii nutritive potrivite.

Medii selective sunt frecvent utilizate pentru izolarea ciupercilor din ordinul Hypocreales. Cele mai multe bacterii sunt inhibitate de pH scăzut și, în general, creșterea fungică va fi favorizată pe medii unde pH-ul este mai mic de 5. În cele mai multe cazuri, totuși inhibarea dezvoltării bacteriilor se realizează prin suplimentarea mediului cu agenți antibacterieni. În mod frecvent sunt utilizați agenți antibacterieni cu spectru larg de acțiune precum cloramfenicol, tetraciclină și streptomycină. Acești agenți pot fi utilizați singuri sau în combinație cu agenți cu o mai mare specificitate de acțiune (de exemplu, penicilina, novobiocin și cloramfenicol) (Inglis, Enkerli, Goettel, 2012). Agenții antimicrobieni trebuie să fie utilizați cu precauție, deoarece pot inhiba anumite specii sau tulpini de fungi. În plus, trebuie să decontaminăm cu atenție toate materialele (de exemplu, prin autoclavare), pentru a ne asigura că bacteriile care au dezvoltat rezistență la agenții antimicrobieni nu vor fi eliberate în mediul înconjurător.

Inhibarea dezvoltării ciupercilor de contaminare este mai problematică decât a bacteriilor, în special când se izolează fungi entomopatogeni din sol. Ciupercile din genurile *Trichoderma*, *Mucor* și *Rhizopus* se pot dezvolta rapid (circa 2-3 zile), inhibând creșterea tulpinilor entomopatogene din ordinul Hypocreales făcând izolarea acestora aproape imposibilă.

Speciile de *Penicillium* și *Aspergillus* pot fi, de asemenea, o problemă, deoarece acestea sunt înalt prolifică și sunt răspândite pe larg în sol. Fungii nedorți pot fi inhibați prin suplimentarea mediului cu fungicide (Inglis, Enkerli, Goettel, 2012).

Cutiile Petri sunt incubate timp de 2-3 zile la temperaturile 20 și 25°C (câte 10 cutii respectiv). Ulterior coloniile fungice sunt selectate și reinoculate pe cutii

Petri cu medii nutritive potrivite, procedura este repetată respectiv până la obținerea culturilor pure (tabelul 2.2).

Tabelul 2.2. Denumirea și compoziția mediilor nutritive utilizate pentru izolarea micromicetelor

Nr. d/o	Denumirea	Producător	Compoziție chimică	Condiții de preparare
1.	PDA (Potato Dextrose Agar)	Merck	1L H ₂ O dublu-distilată; 4 g infuzie din cartofi; 20 g D-glucoză; 15 g Agar microbiologic; pH 5,6±0,2	autoclavare 15 min., 121°C, 1,1 bar
2.	PDA selectiv	Merck	1L H ₂ O dublu-distilată; 4g infuzie din cartofi; 20 g D-glucoză; 15 g Agar microbiologic; pH 5,6±0,2; suplimentat cu 2 ml/L Ampicilină cu concentrația de 25 mg/ml	autoclavare 15 min., 121°C, 1,1 bar
3.	SAPF (Selectiv Agar for Pathogenic Fungi)	Merck	1L H ₂ O dublu-distilată; 10 g pep-tonă din soia; 10 g D-glucoză; 0,4 g Cicloheximidă; 0,05 g Clo-ramfenicol; 12,5 g Agar microbiologic; pH 6,9±0,2	fierbere până la dizolvarea completă
4.	SAPF înalt selectiv	Merck	1L H ₂ O dublu-distilată; 10 g pep-tonă din soia; 10 g D-glucoză; 0,4 g Cicloheximidă; 0,05 g Clo-ramfenicol; 12,5 g Agar microbiologic; pH 6,9±0,2; suplimentat cu 5 ml/L dodine, 65 mg/L	fierbere până la dizolvarea completă

O listă extinsă de medii nutritive este prezentată în Anexa I. Dacă identitatea ciupercii care se dorește a fi izolată este cunoscută, este preferabil să se utilizeze un mediu selectiv pentru specia în cauză. Cu toate acestea, în cazul în care un mediu selectiv nu există sau dacă identitatea ciupercii nu este cunoscută, practic orice mediu utilizat pentru propagarea entomopatogenilor din ordinul Hypocreales poate fi utilizat (a se vedea Anexa I). În mod obișnuit se folosește mediul Sabouraud agar dextroză cu extract de drojdie (SDAY), suplimentat cu sulfat de streptomicină (0,08%) și penicilină (0,03%), mediul SAPF (Selective Agar for Pathogenic Fungi), suplimentat cu 5 ml/L dodine, 65 mg/L sau PDA (Potato Dextrose Agar), suplimentat cu 2 ml/L Ampicilină cu concentrația de 25 mg/ml (tabelul 2.2).

După izolarea fungilor, este necesar de a se asigura că cultura obținută este lipsită de microorganisme contaminante și, dacă este posibil, că reprezintă un singur genotip. Majoritatea micromicetelor entomopatogene din ordinul Hypo-

creales sporulează intens, de aceea este relativ ușor de dispersat spori pe suprafața unui mediu selectiv ce conține agenți antibacterieni. Ulterior pot fi selectate colonii individuale fără contaminări pentru a fi reinoculate cu obținerea unei culturi pure.

Unitățile formatoare de colonii (UFC) nu provin neapărat dintr-o singură propagulă și, prin urmare, pot fi necesari pași suplimentari pentru a se asigura că o UFC reprezintă un singur genotip. Cele două metode uzuale folosite pentru obținerea unei culturi pure ce conține un singur genotip este de a izola conidii individuale sau fragmente de hife. Trebuie să fim conștienți de faptul că ambele metode descrise mai sus nu asigură 100% obținerea unui singur genotip. Câte 15 μ l de suspensie de conidii cu concentrația de 10^4 conidii/ml sunt dispersate la suprafața mediului nutritiv solid PDA. Culturile sunt examinate în câmp luminos la obiectivul 10X al microscopului, în scurt timp după ce suspensia a fost absorbită de mediu. După ce a fost identificată o conidie izolată, zona respectivă cu diametrul de 4-5 mm este excizată aseptice și transferată într-o cutie Petri nouă cu mediul nutritiv steril.

Izolarea fragmentelor din vârful hifelor este mai ușor de realizat decât izolarea unei singure conidii, dar nu poate asigura izolarea în 100% cazuri a unei singure hife. Miceliul sau o suspensie de conidii se plasează central pe un mediu agarizat. Pentru a promova creșterea difuză a hifelor, care va facilita izolarea, mediul utilizat ar trebui să conțină cantități reduse de substanțe nutritive. Marginea coloniei ar trebui să fie examinată la un microscop de disecție sau un microscop optic compus. Ulterior o secțiune de agar-agar care conține hife terminale este îndepărtată cu ajutorul unei spatule, cuțit sau ac sterile și transferată aseptice pe un mediu solid potrivit (Inglis, Enkerli, Goettel, 2012).

2.2.2. Izolarea fungilor din exemplare de insecte cu semne de infecție fungică

La atestarea prezenței, micromicetele sunt recoltate direct de pe suprafața cadavrelor de insecte cu semne vizibile de micoză. Dacă sporularea externă nu a apărut, ar putea fi necesar de a induce inițial creșterea miceliului extern al ciupercii prin plasarea cadavrului într-un mediu cu umiditate relativă ridicată (de exemplu, pe un mediu agarizat umețat cu apă suplimentat cu agenți antibacterieni, pe hârtie de filtru sterilă umețată, sau pe bumbac umezit într-un recipient steril sigilat, cum ar fi un vas Petri sigilat cu parafilm). Pentru insectele care au murit de micoze, creșterea vegetativă și/sau sporularea pe suprafața tegumentului, la temperatura de 20-25°C, are loc, de obicei, în decurs de câteva zile (Lacey, Solter, 2012). După 2-3 zile va fi observată creșterea pronunțată a fungilor la suprafața cadavrelor. Sporii distali sunt transferați în cutii Petri ce conțin mediu nutritiv steril, utilizând o cantitate mică de mediu nutritiv, plasat pe vârful unui ac steril.

În cazul în care pe cadavru se observă conidiogeneza, conidiile pot fi scuturate direct pe un mediu agarizat, conidiosporii pot fi suspendați în soluție tampon sau apă înainte de a fi dispersați pe mediu. Poate fi utilă adăugarea unui agent antimicrobian

crobian, cum ar fi chloromycetin (50 mg/ml), în soluția tampon/apa sterilă. Colonii relativ pure de micromicete entomopatogene pot fi obținute prin atașarea cadavrului la capacul cutiei Petri cu un adeziv, cum ar fi banda dublu adezivă. Conidiile eliberate din cadavru ajunse pe mediu ar putea produce colonii miceliene relativ lipsite de contaminanți. De asemenea pentru izolarea primară a fungilor de pe suprafața cadavrului poate fi utilizată metoda amprentelor.

2.2.3. Cultivarea și păstrarea tulpinilor fungice

Tulpinile de micromicete entomopatogene izolate în cultură pură sunt cultivate la suprafață pe un mediu de îmbogățire, de exemplu mediul PDA pentru întreținerea de rutină și producerea de conidiospori. Pentru a evita deshidratarea, cutiile Petri pot fi sigilate cu parafilm (figurile 2.6 și 2.7).



Fig. 2.6. Tulpină de *Beauveria bassiana*, aspect macroscopic
(Lucille K. Georg http://www.publicdomainfiles.com/show_file.php?id=13518211215847)



Fig. 2.7. Tulpină de *Isaria fumosoroseus*, aspect macroscopic
(F. Ihara http://www.naro.affrc.go.jp/org/fruit/epfdb/Deutte/Paecilo/fumo/P_fumos.htm)

Reinocularea în serie pe medii artificiale urmează a fi evitată, deoarece acest lucru duce la modificări genetice care pot afecta fenotipul (atenuarea virulenței). Sporularea se produce în decurs de 7-10 zile. Conidiile sunt recoltate direct de pe suprafața mediului cu ajutorul ansei microbiologice sterile. Conidiile și miceliul pot fi depozitate la 4-5°C, timp de până la câteva săptămâni sau chiar luni. Pentru păstrarea de lungă durată a genotipului inițial al tulpinilor izolate, acestea pot fi plasate în soluție de glicerol 10% la temperatura de -80°C.

2.3. Identificarea tulpinilor fungice

2.3.1. Identificarea fungilor în baza caracterelor morfologice

Tulpinile fungice izolate pot fi identificate morfologic în baza examinării microscopice a conidiilor și celulelor conidiogene. Din mediul nutritiv sunt excizate blocuri mici (cu suprafața de cca 1cm²) care sunt plasate pe o lamă de sticlă sterilă. Blocul de mediu solid este inoculat cu țesut fungic și acoperit cu o lamelă sterilă. Capacul cutiei Petri este înlocuit cu unul steril, iar cultura incubată la temperatura de 25°C.

După 3 zile devine vizibilă creșterea vegetativă a micromicetei la suprafața lamelei. După 4-5 zile, lamelele sunt scoase din blocul de agar, culturile pot fi tratate cu diverși coloranți ex. lacto-fucsină, și examinate la microscopul optic în câmp luminos (metoda Brightfield). Pentru identificare sunt folosite chei dihotomice de identificare (Humber, 2012).

2.3.2. Identificarea fungilor folosind metode molecular-genetice

Metodele molecular-genetice de cercetare oferă perspective valoroase în cunoașterea biologiei micromicetelor entomopatogene. Revizuirea informației taxonomice, bazată pe relațiile filogenetice, a transformat fundamental taxonomia fungilor și a avut efecte profunde asupra multor grupuri taxonomice de micromicete entomopatogene.

Utilizarea metodelor molecular-genetice a devenit un lucru obișnuit în microbiologie, inclusiv pentru identificarea fungilor entomopatogeni. Metodele biologiei moleculare reprezintă instrumente puternice care facilitează detectarea, identificarea/caracterizarea și/sau cuantificarea ciupercilor microscopice. Analizele molecular-genetice au, ca tehnologie de bază, reacția de polimerizare în lanț (PCR), precum și diferite etape analitice abordate în ciclul complet (Enkerli, Widmer, 2010).

Metodele molecular-genetice pot fi împărțite în două categorii mari: (1) dependente de cultivare și (2) metode independente de cultivare (Enkerli, Widmer, 2010). Pentru prima categorie, analizele moleculare sunt efectuate pe tulpini fungice izolate în cultură pură, obținute prin cultivare tradițională, în timp ce analizele moleculare independente de cultivare sunt realizate direct (adică fără cultivarea fungilor) pe ADN-ul extras din probe de mediu (de exemplu, cadavre de insecte, probe de sol). În analizele dependente de cultivare, se studiază două tipuri de bază de locusuri (1) gene sau regiuni ADN definite (de exemplu, genele ARN ribozomal și spacerii ce le flanchează); și (2), locusuri anonime, regiuni nedefinite sau gene distribuite în cadrul genomului.

Locusurile anonime, de obicei, sunt amplificate simultan (de exemplu, RAPD și AFLP), folosind primeri PCR care hibridizează cu regiuni multiple, în timp ce pentru prima categorie se folosesc primerii specifici pentru fiecare locus. În cazul metodelor independente de cultivare pot fi folosite doar gene sau regiuni de ADN bine definite (extract de ADN metagenomic).

Primerii utilizați pentru a amplifica locusuri anonime nu permit distincția genurilor individuale prezente în astfel de probe și, prin urmare, nu este posibil să se determine originea unui produs PCR particular. Produsele PCR obținute prin metode dependente de cultivare, precum și independente de cultivare, sunt analizate ulterior, prin aplicarea mai multor proceduri analitice (de exemplu, analiza fragmentelor prin electroforeză, clonare sau secvențiere). Aceste proceduri permit detectarea anumitor trăsături distinctive ale secvențelor de ADN, cum ar fi polimorfismul nucleotidelor sau variația lungimilor fragmentelor de ADN, care reprezintă informația de bază pentru discriminarea, identificarea taxonomică și detectarea taxonilor fungici individuali (Inglis, Enkerli, Goettel, 2012).

Atât metodele dependente de cultivare, cât și metodele independente de cultivare posedă punctele forte, precum și puncte slabe, și este important ca cercetătorul să fie conștient de meritele relative ale fiecărei abordări, precum și limitările lor. Este important să subliniem faptul că aceste două abordări pot fi complementare, precum și pot fi selectate în mod prioritar în funcție de problema științifică la care trebuie să ofere răspuns.

Analizele dependente de cultivare combină metodele moleculare cu metodele microbiologice tradiționale. Un avantaj major al analizei dependente de cultivare este că cercetătorul deține cultura vie, care este adesea necesară pentru experimentele ulterioare (de exemplu, evaluările virulenței). În plus, anumite metode moleculare necesită, de asemenea, o cultură viabilă (de exemplu, identificarea / caracterizarea unei anumite tulpini). Aceste analize includ metodele de diagnostic PCR, identificarea bazată pe secvențiere și genotiparea. Abordarea dependentă de cultivare se aplică, de asemenea, atunci când se efectuează caracterizarea genetică detaliată a fungilor, cum ar fi analizele filogenetice, secvențierea genomului și analize funcționale ale anumitor gene și proteine.

Metodele independente de cultivare pot fi folosite pentru a detecta speciile și/sau tulpinile în probele prelevate din mediul ambiant (PCR de diagnostic independent de cultivare) și acestea pot fi aplicate pentru analiza și compararea comunităților fungice. De obicei, fungii se studiază la nivel de filum, clasă, de aceea metodele respective nu sunt utilizate pe larg pentru fungii entomopatogeni. Informații suplimentare sunt incluse în lucrările Enkerli, Widmer (2010). Avantajul metodelor independente de cultivare este viteza sporită de lucru, obținută datorită lipsei necesității de a izola micromiceta în cultură pură, și, de asemenea, posibilitatea de a studia diversitatea fungică în ansamblu.

I. Extragerea ADN-ului genomic

Extragerea eficientă a ADN-ului genomic este o condiție prealabilă pentru toate analizele moleculare ulterioare. Pot fi folosite mai multe metode de extracție. Pentru toate etapele implicate, este esențial ca echipamentul și materialul utilizat (inclusiv plasticul și articolele din sticlă) să fie sterilizate, să nu poarte contaminare cu ADN străin sau nucleaze. Acest lucru ar trebui să fie asigurat de către producător sau, în cazul materialelor care sunt reutilizate, acestea trebuie să fie tratate anterior pentru

a se asigura că acestea nu conțin ADN rezidual sau deoxiribonuclează activă. Metodele pentru îndepărtarea ADN rezidual și inactivarea deoxiribonucleazei includ autoclavare, înmuierea în înălbitor de 10% (0,525% hipoclorit de sodiu) pentru 30 de minute, sau utilizarea unor substanțe disponibile comercial destinate acestui scop. Trebuie luate măsuri de precauție pentru a se asigura că materialele sunt bine clătite folosind apă purificată (Inglis, Enkerli, Goettel, 2012).

1. Omogenizarea. Primul pas în extragerea ADN-ului este omogenizarea celulelor fungice (denumită și distrugere și/ sau liza celulară), folosind metode mecanice, chimice și/sau enzimatică pentru a elibera componentele citoplasmatică într-o soluție tampon adecvat. De regulă, cantități mari de ADN pot fi extrase din celulele în faza exponențială de creștere, comparativ cu celulele coloniilor bătrâne, care conțin cantități de ADN redus. ADN-ul este relativ stabil în interiorul celulelor, astfel depozitarea pe termen mediu a biomasei fungice, fără impact negativ asupra calității ADN-ului, poate fi realizată la -20°C , deși depozitarea la -80°C este preferabilă. Calitatea și cantitatea de ADN necesare sunt dependente de metoda/metodele care trebuie aplicate. De exemplu, calitatea ADN-ului nu este o problemă pentru PCR de diagnostic, dar este o problemă pentru genotipare. Fungii din ordinul Hypocreales conțin cantități semnificative de chitină în componența peretelui celular. Din acest motiv pentru extragerea eficientă a ADN-ului este necesar de utilizat liza mecanică a celulelor. Eficacitatea acestei proceduri poate fi îmbunătățită prin liofilizarea prealabilă a biomasei fungice. Pot fi utilizate mai multe metode de omogenizare mecanică (Inglis, Enkerli, Goettel 2012). În ceea ce privește acestea din urmă, o strategie frecvent utilizată este de a mojar țesutul în azot lichid. Biomasa este de obicei măcinată până la pulbere. Azotul lichid favorizează procesul de liză celulară și asigură reducerea acumulării căldurii la minimum care poate provoca fragmentarea ADN. Acumularea de căldură în timpul extracției este o problemă deosebită în cazul utilizării altor metode precum bile din sticlă sau oțel, adăugate în tubul cu biomasă și determinate să oscileze rapid. Pentru a evita aceste riscuri este necesar de redus timpul de oscilație și de menținut tuburile la temperaturi joase. Liza mecanică este adesea urmată sau combinată cu o liză chimică a celulelor. Această etapă presupune incubarea biomasei într-o soluție de lizare conținând reactivi, cum ar fi dodecil sulfat de sodiu (SDS), bromură de cetiltrimetilamoniu (CTAB) sau fenol. Deseori, în multe protocoale sunt incluse metode enzimatică (de exemplu, proteinaza K, chitinază) care facilitează liza celulară și eliberarea ADN-ului. Pentru a facilita extracția acizilor nucleici de înaltă calitate au fost folosiți protoplaști de fungi obținuți din miceliu tânăr (St Leger, Wang, 2009). Probele din mediu sunt omogenizate în prezența unei soluții tampon potrivite prin aplicarea procedurilor mecanice, chimice sau enzimatică în mod individual sau în combinație. Procedurile mecanice implică măcinare (de exemplu, folosind un mojar cu pistil), congelare/decongelare, și/sau sonicare. Solul are o compoziție chimică și fizică extrem de complexă și protocoalele optimizate pentru un tip de sol pot să nu fie eficiente pentru extracția ADN-ului dintr-un alt tip de sol (Frostegard *et al.*, 1999; Kabir *et al.*, 2003). Pentru probele prelevate din mediu, la etapa de liză celulară trebuie să ținem cont de sursa din care vom extrage ADN (spori, miceliu) (Castrillo

et al., 2007). Efectuarea de extracții succesive din același eșantion poate fi, de asemenea, necesară, deoarece acest lucru poate duce la extracția ADN-ului mai eficient (Feinstein, Sul, Blackwood, 2009; Inglis, Enkerli, Goettel, 2012).

2. Purificarea ADN. După terminarea etapei de omogenizare, ADN-ul trebuie să fie purificat din extractul brut. În această etapă, fragmentele peretelui celular, lipidele și proteinele sunt eliminate prin aplicarea unor tehnici, cum ar fi centrifugare, extracție cu fenol/cloroform, utilizarea unor coloane de purificare și/sau precipitare (de exemplu, cu acetat de potasiu, etanol, izopropanol, și/sau polietilen glicol). ARN-ul poate fi îndepărtat prin adăugarea ARN-azelor la extractul ADN brut sau purificat. Există kituri disponibile comercial care pot fi folosite pentru a extrage ADN fungic (de exemplu, Qiagen DNeasy Plant Mini Kit, Qiagen Inc; NucleoSpin Plant II MacheryNagel Inc).

Mulți cercetători aleg să utilizeze kituri comerciale din motive logistice (de exemplu, ușurință și consistență), precum și din cauza posibilității de adaptare a unor astfel de kituri de extracție la metodele automatizate. Dezavantajul principal al folosirii kiturilor comerciale este costul ridicat. Cu toate acestea, reducerea volumului de lucru economisește timpul și compensează de multe ori costul mai ridicat al acestora. Odată ce ADN-ul a fost extras, se recomandă să fie evaluat privind calitatea și cantitatea.

Un nivel înalt de purificare a ADN este necesar în cazul extragerii ADN din probele de mediu, deoarece realizarea reacției PCR folosind acest ADN poate fi o provocare datorită prezenței substanțelor care pot inhiba reacția. În ADN-ul extras din probe de sol, în cazul unei purificări insuficiente, apar frecvent compuși polifenolici, humici, fulvici și acizii tanici, precum și alte materiale inhibitoare. Pentru a evita aceste probleme, pot fi folosite diverse strategii precum:

1) diluția ADN,

2) proceduri de purificare adițională,

3) reducerea la minimum a efectului inhibitorului în timpul PCR folosind aditivi chimici. Cea mai simplă strategie utilizată este de a dilua ADN-ul (Arbeli, Fuentes, 2007). Cu toate acestea, strategia poate fi folosită numai în cazurile în care concentrația țintă nu este limitativă. Diverse metode pot fi folosite pentru a purifica ADN post-extracție. Acestea includ precipitarea ADN cu izopropanol sau polietilenglicol 8000, urmată de îndepărtarea compușilor inhibitori rămași în faza lichidă. Alte metode includ purificarea prin centrifugare în coloane, bazată pe microfiltrare (Widmer *et al.*, 1999), legarea ADN de membrane cu siliciu (Schneider *et al.*, 2011) și alte metode (Inglis, Enkerli, Goettel, 2012). O varietate de sisteme de extragere a ADN în coloane sunt disponibile comercial, precum și o serie de kituri de extragere a ADN folosesc sistemul de purificare pe coloane.

Extragerea acizilor nucleici din materialul experimental cu ajutorul kit-ului de extragere a ADN-ului genomic, DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)

Pentru procedura de extragere a ADN au fost utilizate tulpini fungice izolate din corpul insectelor *S. lineatus*, *H. postica* și *P. apricans*. Au fost utilizate 100 mg

de cultură fungică, fiind omogenizate în mojar cu adăugare de azot lichid până la obținerea unei pulberi fine. Omogenizatul a fost transferat într-un tub Eppendorf de 2 ml pentru evaporarea azotului, evitând dezghețarea materialului biologic. La omogenizat au fost adăugate 400 μ l AP1 Buffer și 4 μ l ARN-aza A (100 mg/ml) și vortexate minuțios. Amestecul obținut a fost incubat la 65°C timp de 10 min., inversând de 2-3 ori tuburile.

Această etapă asigură lizarea celulelor. La amestecul de lizare s-au adăugat 130 μ l AP2 Buffer cu incubare pe gheață timp de 5 min. Această procedură asigură precipitarea detergenților, a proteinelor și polizaharidelor. Lizatul a fost centrifugat timp de 5 min. la 14 mii rot./min. Supernatantul a fost transferat într-o coloană QIAshredder mini, plasată într-un tub de colectare de 2 ml și centrifugat timp de 2 min. la 14 mii rot./min. pentru înlăturarea debrisiului celular. Faza filtrată a fost transferată atent într-un tub nou. La această etapă, se obțin 450 μ l de soluție ce conține ADN. Au fost adăugate 675 μ l de Buffer AP3/E, amestecând prin pipetare. Ulterior, 650 μ l de amestec au fost transferate într-o coloană DNeasy mini, plasată într-un tub de colectare și centrifugate la ≥ 8000 rot./min. Filtratul a fost înlăturat atent și procedura a fost reluată utilizând amestecul rămas. Ulterior, coloana DNeasy mini a fost plasată într-un tub de colectare nou, adăugând 500 μ l Buffer AW și centrifugând timp de 1 min. la 8 mii rot./min. Filtratul a fost înlăturat atent, au fost adăugate din nou 500 μ l Buffer AW și amestecul a fost centrifugat timp de 2 min. la 14 mii rot./min.

ADN-ul purificat a fost eluat din coloana Dneasy, utilizând soluția AE Buffer sau apă sterilă deionizată. Rezultate optimele au fost înregistrate în cazul unei eluări repetate. Coloana DNeasy mini a fost transferată într-un tub de microcentrifugare și adăugate 100 μ l AE Buffer (10 mM Tris·Cl; 0,5 mM EDTA; pH 9,0.) direct pe membrana Dneasy. Incubată timp de 5 min. la temperatura camerei (15-25°C) și centrifugată timp de 1 min. la 8000 rot./min. Volumul eluat a fost de 100 μ l soluție ce conține ADN.

II. Verificarea calității și cantității ADN

Acest lucru poate fi realizat prin electroforeză într-un gel de agaroză, folosind Ladder și soluție tampon și colorarea ulterioară și vizualizarea ADN-ului. De obicei, pentru a vizualiza ADN se folosește bromura de etidiu, colorant de intercalare. Bromura de etidiu este un mutagen puternic, de aceea metodele moderne propun folosirea unor coloranți netoxici, cum ar fi un marker potrivit (de exemplu, lambda-HindIII ADN GelRed (Biotium, Inc.) sau SYBR Green (Molecular Probes, Invitrogen Life Science). ADN de înaltă calitate apare în gel ca o singură bandă genomică cu greutate moleculară mare, în timp ce ADN-ul fragmentat apare ca mai multe benzi de greutate moleculară mai mică. Cel mai des, cantitățile de ADN sunt estimate prin electroforeză în gel de agaroză.

În studiile realizate, cantitatea de ADN a fost estimată vizual prin electroforeză în gel de agaroză de 1,5% (1,5 g agaroză, 100 ml soluție tampon Tris-Acetate-EDTA TAE 1x, 3 μ l bromură de etidiu) timp de 30 min., la 150 V, 100 A, 1x. Pentru pre-

pararea 1 l de soluție tampon TAE 50x au fost necesare 242 g baza Tris 57, 10 ml acid acetic glacial, 100 ml 0,5M EDTA pH 8,0 și H₂O distilată până la 1 l. În calitate de colorant a fost folosit Loading Dye. Gelul a fost vizualizat sub UV la 264 nm, în camera de vizualizare.

Totuși există și alte metode de estimare a ADN. De exemplu, concentrația de ADN poate fi estimată folosind un spectrofotometru sau fluorometru (de exemplu, NanoDrop), sau prin utilizarea de electroforeză capilară (de exemplu, QIAxcel).

După extragere, ADN-ul ar trebui să fie depozitat la -20°C, evitând cicluri repetate de îngheț-dezgheț. De obicei, concentrațiile mari de ADN sunt mai stabile la păstrare decât ADN diluat.

III. PCR

PCR este o metodă avansată care permite identificarea și caracterizarea fungilor entomopatogeni. PCR de diagnostic reprezintă aplicarea PCR pentru a amplifica o secvență specifică a ADN, caracteristică pentru taxonul în cauză (în așa fel că amplificarea ADN are loc doar în cazul extragerii ADN de la specia țintă. De obicei PCR de diagnostic este utilizat la nivelul speciei, dar detecția la nivel de subspecie (Entz, Johnson, Kawchuk 2005) sau subgen (Schneider *et al.* 2011) poate fi, de asemenea, posibilă.

Locusurile țintă pentru PCR de diagnostic fie sunt locusuri unice pentru taxonul selectat (de exemplu, nu sunt prezente în taxonii non-țintă) sau, în majoritatea cazurilor, sunt loci care sunt conservați la diferite niveluri între taxonii înrudiți sau chiar toate micromicetele. Pentru ca un locus conservat să fie eficient aplicat în cadrul PCR de diagnostic, acesta trebuie să conțină regiuni variabile în preajma regiunilor conservate, care permit discriminarea între taxonul țintă și taxonii non-țintă și care furnizează semnături de secvențe de ADN taxon-specifice. Pentru PCR de diagnostic, primerii sunt proiectați astfel încât hibridizarea lor are loc doar la secvențe specifice, permițând astfel amplificarea taxon specifică a locusului conservat. Genele ARN ribozomal și regiunile flanchate (adică spacerii interni transcriși ITS și regiunile intergenice) sunt exemple de astfel de loci (figura 2.8). Pentru dezvoltarea PCR de diagnostic, descoperirea sau identificarea secvențelor țintă este de o importanță majoră. Locusurile unice pot fi identificate folosind tehnici, cum ar fi RAPD sau AFLP. O altă metodă frecvent utilizată pentru a identifica sau caracteriza fungii entomopatogeni este de a secvenția loci conservate (uneori, de asemenea, denumite gene filogenetice, din cauza utilizării lor în analizele filogenetice), precum și pentru a compara secvențele obținute cu secvențe de referință. Locusurile țintă ar trebui să conțină regiuni conservate, precum și regiuni variabile. Regiunile conservate pot fi folosite ca „ancore” pentru alinierea secvențelor (pentru a garanta că secvențele omoloage sunt comparate), în timp ce regiunile variabile furnizează diferențe (polimorfism) care permit discriminarea taxonomică (Inglis, Enkerli, Goettel, 2012). Spre deosebire de PCR de diagnostic, primerii sunt proiectați în așa fel încât să hibridizeze cu regiunea conservată a genei specifice,

permițând utilizarea aceluși primeri pentru a amplifica același locus la taxonii înrudiți. În urma amplificării, ampliconul poate fi secvențiat folosind metoda Sanger și un analizator genetic. În funcție de condițiile și reactivii chimici utilizați (de exemplu, tipul de polimer), pot fi secvențiate fragmente de 800-1000 nucleotide. Astfel, regiunile amplificate în scopul identificării, în caz ideal, trebuie să fie mai scurte de 800 de nucleotide în lungime, din motive practice (se cere numai o reacție de secvențiere și nu este necesar să se genereze secvențe consensus) (Inglis, Enkerli, Goettel, 2012). Dacă este necesar de secvențiat fragmente mai lungi, sunt necesare mai multe reacții de secvențiere decalate, iar cercetătorul trebuie să genereze ulterior un numărător (formează un set continuu de segmente de ADN din aceeași genă ce se suprapun), folosind un software adecvat, cum ar fi Sequencher (Gene Codes Corporation) sau Geneious (Biomatters Ltd).

Genele ARNr și regiunile flancate sunt locusurile cel mai frecvent vizate pentru identificarea fungilor entomopatojeni în baza secvențierii ADN. Cu toate acestea, pot fi utilizați și alți loci precum gena pentru subunitatea mare a ARN polimerazei II (RPB1), a doua subunitate (RPB2), factorul de elongație 1- α (EF-1 α) sau β -tubulină. Odată ce secvența țintă a fost obținută, ea poate fi comparată cu secvențele de referință pentru a permite identificarea sau caracterizarea micromicetei (Inglis, Enkerli, Goettel, 2012).

Odată cu secvențierea întregului genom al speciilor de ciuperci, este posibil de a identifica, de asemenea, astfel de locusuri folosind analiza comparativă genomică. Pentru a identifica locusurile conservate, trebuie de efectuat o analiză comparativă a mai multor taxoni. Prin urmare, este necesar de depus un efort considerabil pentru extinderea aplicațiilor metodei PCR de diagnostic. De asemenea proiectarea unor primeri eficienți este o etapă critică care necesită investigații suplimentare. Neajunsul metodei PCR de diagnostic este cerința absolută de a evalua cât mai multe tulpini cât este posibil logistic, pentru a crea primeri specifici. La efectuarea PCR de diagnostic, se folosește proba martor pozitiv (amplificarea utilizând ADN al unei tulpini identificate deja) și negativ (adică amestec de reacție în care lipsește ADN). Sensibilitatea (adică limita de detecție) a PCR este, de asemenea, importantă, dar acest lucru nu este o problemă atât de mare pentru analiza dependentă de cultivare, deoarece ADN matrice este de obicei disponibil în cantități suficiente. Optimizarea PCR trebuie să fie abordată într-un mod metodic, verificând fiecare etapă (Inglis, Enkerli, Goettel, 2012). Pentru a reduce impactul substanțelor inhibitoare asupra reacției PCR în amestecul de reacție pot fi adăugate substanțe chimice. Frecvent utilizată în acest sens este albumina serică bovină (BSA, Comey *et al.*, 1994), care încorporează substanțele inhibitoare și, astfel, reduce efectele substanțelor inhibitoare asupra ADN polimerazei. La extragerea ADN-ului din substraturile complexe este puțin probabil ca toți inhibitorii PCR să fie complet eliminați. De aceea, este foarte important să evităm interpretarea unor rezultate fals negative, atunci când se aplică PCR de diagnostic, precum și să stabilim gradul de inhibare. Inhibarea poate fi cuantificată prin qPCR și analize statistice (Schneider *et al.*, 2011).

PCR de diagnostic independent de cultivare în etapele sale de bază este identic cu cel dependent de cultivare. Principala diferență între cele două abordări este aceea că, în PCR de diagnostic independent de cultivare, cantitatea de ADN țintă este mică și este o parte dintr-un extract de ADN complex, (extract de ADN metagenomic), în timp ce în PCR de diagnostic dependent de cultivare, ADN-ul matriță (obținut din cultura pură) nu este limitat. Pasul esențial este de a dezvolta un PCR de diagnostic dependent de cultivare, care ulterior este adaptat pentru diagnosticare independentă de cultivare. La elaborarea procedurilor de lucru urmează să se țină cont de complexitatea ADN extras (Inglis, Enkerli, Goettel, 2012; Landa *et al.*, 2015). Acest lucru poate fi realizat prin evaluarea și compararea produselor cationice obținute din probe de ADN (ADN metagenomic) conținând țintă și / sau cu mostre de ADN (ADN) metagenomic intercalat cu ADN a taxonului țintă. PCR-diagnostic independent de cultivare pentru detectarea taxonilor țintă în probele de mediu, cum ar fi solul sau insectele, au fost dezvoltate pentru diverse micromicete entomopatogene. Acestea includ detectarea *M. acridum* și *B. brongniartii* la nivelul speciei, *B. bassiana* (Castrillo, Griggs, Vandenberg, 2008; Bell *et al.*, 2009), *M. acridum* (Bell *et al.*, 2009), și *M. anisopliae* var. *anisopliae* (Destefano *et al.*, 2004), la nivel de sub-specii, și *Metarhizium clade 1*, care include cele șase specii *M. majus*, *M. guizhouense*, *M. pingshaense*, *M. anisopliae*, *M. robertsii* și *M. brunneum* la nivel de subgen (Schneider *et al.*, 2011).

Protocolul de amplificare a fragmentelor ADN polimorfe (PCR), utilizat în cercetare

Amplificarea fragmentelor de ADN a fost realizată cu utilizarea a două perechi de primeri (figura 2.8, tabelul 2.3).

Tabelul 2.3. Primerii utilizați pentru identificarea tulpinilor fungice

Nr. d/o	Denumire primer	Sucesiunea nucleotidică	Porțiunea de ADN amplificată	Lungimea fragmentului de ADN amplificat	Autor
1.	ITS4	5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3'	spacer-ul transcriptibil și porțiunea de genă care codifică ARNr 5,8S	570-590 pb	White <i>et al.</i> 1990
	ITS5	5' CAA GGC ATC CAC CGT 3'			
2.	NS5	5' AAC TTA AAG GAA TTG ACG GAA G 3'	gena ce codifică ARNr 18S	310 pb	White <i>et al.</i> 1990
	NS6	5' GCA TCA CAG ACC TGT TAT TGC CTC 3'			

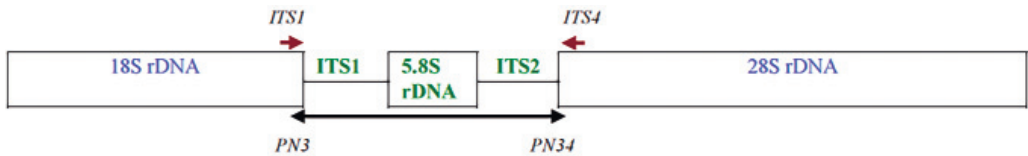


Fig. 2.8. Reprezentarea schematică a cluster-ului genelor ARNr la fungii entomopatozici din ordinul Hypocreales

Acesta este format din genele ARNr 5.8S, 28S, 18S și spacerii interni transcriși (ITS1 și ITS2) care flanchează genele. De asemenea sunt reprezentate și situs-urile de aliniere a primerilor.

Amestecul de reacție pentru fiecare probă (10 μ l) a fost compus din:

- | | |
|-----------------------|--|
| ○ dd H ₂ O | 8,1 μ l; |
| ○ PCR Buffer 10 x | 1,0 μ l; |
| ○ dNTP 5 mM | 0,2 μ l; |
| ○ Primer 1 | 0,05 μ l; |
| ○ Primer 2 | 0,05 μ l; |
| <hr/> | |
| ○ RedHot polymerase | 0,1 μ l; |
| ○ ADN testat | 0,5 μ l (\approx 0,1 μ g/ml). |

Amplificarea ADN s-a realizat în amplificatorul automat T1 Plus Thermocycler Biometra în următoarele regimuri termice:

- | | | | |
|---------|-----------|---|---------------|
| 1. 94°C | pauză | } | 34 de cicluri |
| 2. 94°C | 2:00 min. | | |
| 3. 94°C | 0:30 min. | | |
| 4. 55°C | 0:30 min. | | |
| 5. 72°C | 2:00 min. | } | 1 ciclu |
| 6. 72°C | 5:00 min. | | |
| 7. 4°C | pauză | | |

După amplificare, produsele PCR trebuie să fie analizate prin electroforeză sau secvențiere. Majoritatea laboratoarelor utilizează electroforeza în gel de agaroză (de exemplu, 1% TAE-agaroză) și ADN-ul colorat cu bromură de etidiu sau coloranți alternativi (SybrTM Green) pentru a vizualiza ADN-ul sub razele ultraviolete (UV).

Dimensiunea ampliconilor se constată în raport cu un marker corespunzător (de exemplu, Smart Ladder). Electroforeza capilară poate fi o alternativă bună pentru electroforeză în gel de agaroză (de exemplu, QIAxcel). Această tehnică poate reduce timpul și forța de muncă în timpul manipulării probelor multiple, livra imaginea ampliconilor automat, și de a salva datele într-un format electronic. Dacă PCR are ca rezultat o singură bandă, produsul PCR poate fi purificat folosind un kit comercial (de exemplu, un kit de curățare PCR pentru a îndepărta excesul de primeri, nucleoti-

de, ADN polimeraza și săruri) și secvențiat direct. În cazul în care rezultatul reacției PCR sunt mai multe benzi, banda de interes poate fi excizată și purificată utilizând un kit comercial. Banda se taie folosind un bisturiu steril purificat de ADN și se plasează într-un tub pentru microcentrifugare. Personalul trebuie să poarte echipament de protecție și o mască de protecție pentru această procedură. Ampliconii purificați pot fi secvențiați direct sau indirect. În cazul metodelor indirecte, ADN este clonat folosind un vector plasmidic pentru transformarea *E. coli*, crescută apoi pe medii selective. ADN plasmidial este izolat și secvențiat.

IV. Purificarea produsului PCR

Purificarea produsului PCR este necesară pentru a asigura succesul etapei de secvențiere a acestuia. Purificarea produsului PCR poate fi efectuată cu diverse kit-uri, de exemplu setul de reagenți Mini Elute PCR Purification Kit (QIAGEN). La 1 volum de produs PCR se adaugă 5 volume de soluție PB Buffer și se amestecă. Nu este necesar de a înlătura uleiul mineral sau petrolul lampant. Dacă soluția tampon PB conține indicator al pH -ului, se verifică ca culoarea amestecului să fie galbenă. În caz contrar adăugăm 10 μ l de acetat de sodiu, 3M, pH 5,0. Pentru a lega ADN, amestecul obținut a fost transferat într-o coloană MinElute, plasată într-un tub de colectare de 2 ml și centrifugat timp de 1 min. Filtratul a fost înlăturat. Coloana MinElute a fost plasată în același tub de colectare, au fost adăugate 750 μ l de PE Buffer și tuburile au fost centrifugate timp de 1 min. pentru a spăla ADN. Filtratul a fost vărsat și tuburile au fost centrifugate adițional timp de 1 min. la viteză maximală. După centrifugare, coloana MiniElute a fost plasată într-un tub nou de microcentrifugare de 1,5 ml.

Pentru a elua ADN pe centrul membranei, au fost adăugate 10 μ l de soluție EB Buffer (10 mM Tris·Cl, pH 8,5) sau apă deionizată, sterilă, tubul a fost lăsat în repaus timp de 1 min., apoi centrifugat timp de 1 min. Important este ca soluția de eluare să fie picurată direct în centrul membranei. Eluarea maximă se obține la pH 7-8,5. ADN-ul poate fi eluat de asemenea în soluție-tampon TE (10 mM Tris·Cl, 1 mM EDTA, pH 8,0), însă EDTA poate să inhibe reacțiile enzimice ulterioare.

V. Secvențierea produselor PCR

Secvențierea produselor PCR cel mai frecvent este realizată prin metoda dideoxi-terminală (metoda Sanger). Esența metodei dideoxi-terminale constă în introducerea în amestecul de reacție a unor dideoxi-nucleotide, incapabile de a forma legături fosfo-diesterice cu alte nucleotide. La inserarea acestor nucleotide în lanțul nou sintetizat de ADN, elongarea este stopată. În rezultat se obțin fragmente de ADN care diferă în lungime cu câte un nucleotid. La electroforeză cel mai scurt fragment care conține un dideoxi-nucleotid va migra primul. În continuare aparatele de detecție înregistrează nucleotidul marcat ca primul din succesiunea fragmentului ADN. Metoda Dye-terminator constă în utilizarea dideoxi-nucleotidelor marcate fluores-

cent, care emit lumină de lungimi de undă diferite. Acest lucru permite secvențierea fragmentului de ADN într-o singură reacție, comparativ cu patru reacții necesare în cazul utilizării nucleotidelor marcate radioactiv. În cercetările prezentate secvențierea a fost realizată utilizând kit-ul ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Ready Reaction, AmpliTaq® DNA Polymerase (Perkin-Elmer) și analizatorul genetic ABI PRISM™ 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems). Secvențierea regiunilor ITS și a porțiunilor din gena ARNr 18S, amplificate și purificate, a fost realizată în SeqLab GmbH, Germania.

VI. Analiza succesiunilor nucleotidice

Cea mai simplă formă de analiză este de a aplica Local Alignment Search Tool pentru a compara secvențele de nucleotide (BLAST, Altschul *et al.*, 1990, 1997) din bazele de date de secvențe, cum ar fi GenBank (NCBI). Această analiză preia secvențele cele mai similare prezente în baza de date. Numele asociate cu aceste secvențe permit în mod ideal, identificarea organismului care face obiectul anchetei sau pot furniza cel puțin numele speciilor înrudite. Cu toate acestea, succesul identificării depinde de acuratețea informațiilor prezente în baza de date, iar cercetătorul trebuie să examineze întotdeauna atât informațiile din cadrul NCBI, cât și din alte baze de date genetice din perspectivă critică. Analizele mai informative implică aplicarea unor algoritmi filogenetici pentru a obține gradul de înrudire (de exemplu, folosind PHYLIP, PAUP, Bionumerics etc.) între secvențele de referință selectate și secvența organismului investigat. Secvențele de referință pot fi obținute din baza de date NCBI. Totodată, este de dorit de a crea propria bază de date de secvențe.

Prima etapă este alinierea secvențelor, folosind un algoritm adecvat (de exemplu, Clustal W), și apoi editarea manuală a alinierii (de exemplu, aplicații precum BioEdit, GeneDoc, CodonCode). Analizele filogenetice pot fi realizate utilizând diferiți algoritmi, cum ar fi Maximum Parsimony, Maximum likelihood, Bayesian phylogenetic inference, și metodele bazate pe distanța dintre matrici. Această din urmă metodă (de exemplu, Neighbor-joining) este utilizată mai frecvent, deoarece este computațional mai puțin complicată. Una dintre aplicațiile cu acces gratuit frecvent utilizate este MEGA (Kumar, Stecher, Tamura, 2016). Rezultatele acestor analize sunt reprezentate sub forma de arbori filogenetici. Distanța dintre ramurile interne ale arborelui poate fi obținută prin analiza bootstrap. În cele din urmă, este important ca secvența de date generată și verificată în astfel de analize să fie pusă la dispoziția comunității științifice, și depozitată în baze de date internaționale. Creșterea cantității de informație în bazele de date reprezintă un pas crucial, deoarece baza de date se îmbunătățește în mod constant, facilitând proiectarea de primeri specifici pentru identificarea și caracterizarea fungilor.

2.4. Caracterizarea tulpinilor fungice

2.4.1. Estimarea susceptibilității insectelor țintă la infecția cu tulpinile fungice potențial patogene

Estimarea activității insecticide este de o importanță crucială pentru rezultatul de succes. Pasul inițial al oricărui experiment este de a stabili obiectivul(ele) și de a formula ipoteze de testat (de exemplu, ipoteza nulă). Este important ca atributele concomitente ale testului biologic (de exemplu, parametrii variabili ai mediului) să fie pertinente și să fie luate în considerare în raport cu obiectivele și designul experimentului. Odată ce ipotezele au fost formulate, tratamentele și un design adecvat sunt selectate pentru a răspunde la întrebările puse. Designul statistic folosit ar trebui să fie cel mai simplu design care oferă un nivel acceptabil de precizie fără a compromite posibilitatea de a reproduce rezultatele. Randomizarea și replicarea corespunzătoare sunt fundamentale pentru proiectarea experimentală adecvată. Prin urmare, este de sarcina cercetătorului să se asigure că repetițiile reprezintă unități independente. Analiza varianței (ANOVA) este frecvent utilizată pentru a evalua impactul fungilor entomopatogeni asupra insectelor.

Pregătirea inoculului. Pentru a pregăti inoculul, conidiile au fost recoltate de pe suprafața mediului și transferate cu ajutorul ansei microbiologice sterile într-un tub de 1,5 ml ce conținea 0,5 ml de apă distilată sterilă. Masa de conidii a fost agitată ușor manual (prevenind eliberarea conidiilor în aer). Pentru a suspenda uniform conidiile hidrofobe în apă, au fost folosite metode de suspensie mecanică, fără a provoca deteriorarea celulelor. Ulterior, micropistilul a fost atașat la motor și suspensia a fost agitată viguros cu deplasarea pistilului pe verticală și orizontală timp de cca 30 s. La suspensia obținută au fost adăugat suplimentar 0,5 ml apă distilată sterilă. Conidiile recent recoltate dintr-un mediu agarizat pot fi rehidratate prin plasare directă în apă cu luarea unor măsuri de precauție. Îmbibarea rapidă a apei de conidiile deshidratate poate deteriora membranele celulare. Acest lucru poate fi evitat prin utilizarea apei calde (33°C) sau prin rehidratarea prealabilă în condiții de umiditate ridicată (Inglis, Enkerli, Goettel, 2012).

Cuantificarea conidiilor în inocul. Cuantificarea numărului de propagule per unitate de volum a fost realizată cu utilizarea hemocitometrului (camera Goreaev). Suspensia apoasă ce conține propagule a fost centrifugată și aproximativ 10 μl au fost transferate în camera hemocitometrului. Pentru a asigura sedimentarea conidiilor, hemocitometrul a fost plasat în poziție orizontală timp de aproximativ 5 min. evitând evaporarea excesivă a apei. Conidiile fungice au fost numărate în 5 pătrate mari, divizate în 16 mici (total 80 pătrate mici) situate pe diagonală. Volumul unui pătrat mic este de 0,00025 mm³ (μl) = 1/4000 mm³ (μl). Pentru a evita numărarea dublă a conidiilor unei celule i-au fost atribuite doar conidiile care intersectează sau ating laturile de sus și din stânga. Numărul de propagule a fost calculat conform formulei (2.1):

$$C = \frac{N \times d \times 4 \times 10^6}{80} \quad (2.1)$$

unde: C este concentrația propagule/ml,

N – numărul de propagule în 80 de pătrate mici ale camerei Goreaev,
d – diluția suspensiei.

A fost calculat numărul mediu de propagule per pătrat și deviația standard. Cuantificarea a fost validată, dacă valoarea deviației standard a fost de maxim 10-15% din valoarea medie.

Suspensia inițială a fost diluată pentru a obține concentrația dorită cu ajutorul formulei (2.2):

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2 \quad (2.2)$$

unde: C_1 este concentrația inițială,
 V_1 – volumul necesar pentru diluarea suspensiei,
 C_2 – concentrația dorită,
 V_2 – volumul final dorit.

Evaluarea viabilității conidiilor. Deoarece metoda hemocitometrului nu face distincție între conidiile viabile și non-viabile, pentru a ajusta dozele utilizate în teste a fost determinată viabilitatea conidiilor. De asemenea a fost evaluată viabilitatea conidiilor după păstrarea timp de ~ 90 de zile a tulpinilor la diferite temperaturi, valori ale pH, salinitate ș.a. Rezultatele au fost obținute în termen de 24 de ore.

Astfel, 100 μl suspensie de conidii ce conținea 10^6 conidii a fost distribuită uniform pe suprafața cutiei Petri cu diametrul de 90 mm ce conținea mediu PDA steril. Conidiile au fost incubate la întuneric, la temperatura de 25°C timp de 24 h. Conidiile au fost considerate viabile, dacă lungimea tubului germinativ a fost de două ori mai mare decât diametrul acestora. Pentru specia *B. bassiana*, umflarea vizibilă a conidiilor germinate a fost utilizată ca semn al viabilității. Au fost enumerate 200 de conidii. Viabilitatea conidiilor a fost determinată conform formulei (2.3):

$$R = \frac{N}{T} \times 100\% \quad (2.3)$$

unde: R este viabilitatea/rata de germinare,
N – numărul de conidii ce au germinat,
T – numărul total de conidii enumerate.

Metoda a fost reluată în 3 repetiții pentru fiecare tulpină fungică. Pentru a calcula numărul de spori viabili per unitate de volum, cantitatea de conidii/ml determinată cu ajutorul hemocitometrului a fost multiplicată cu valoarea ratei de germinare.

Testarea activității insecticide a tulpinilor fungice în condiții controlate. În scopul cercetării susceptibilității dăunătorilor țintă la infecția cu tulpinile fungice cu potențial entomopatogen și selectării celei mai active tulpini au fost pregătite suspensii cu concentrația de 10^9 spori/ml din fiecare tulpină fungică identificată ca aparținând genului *Beauveria* și *Isaria*. În experiențe au fost utilizate exemplare adulte din speciile *Sitona lineatus*, *Hypera postica* și *Protapion apricans*. Insectele

au fost inoculate indirect la suprafața tegumentului. În calitate de martor a fost utilizată soluția de apă distilată sterilă. 1 ml de inocul a fost aplicat pe hârtie de filtru sterilă plasată în cutii Petri sterile. Ulterior în fiecare cutie Petri au fost plasate câte 10 exemplare din fiecare specie de insectă. Insectele au fost lăsate să se deplaseze pe suprafața hârtiei de filtru timp de 1 h pentru a intra în contact cu spori fungici (Watson *et al.*, 1995).

După inoculare, insectele au fost incubate câte 10 în cuști cu lucernă proaspătă, la temperatura camerei de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ și durata zilei de 14 h. Verificarea mortalității a fost efectuată fiecare 24 de ore. Cadavrele insectelor au fost îndepărtate înainte ca micromiceta să sporuleze pentru a preveni transmiterea orizontală. Ulterior, cuștile au fost spălate, sterilizate, iar lucerna a fost schimbată. Pentru a confirma că moartea insectelor a fost cauzată de infecția fungică, cadavrele au fost plasate în eprubete sterile cu dop de bumbac în condiții de umiditate sporită urmărind dezvoltarea miceliului. Pentru a urmări respectarea postulatelor lui Koch, fungii au fost inoculați pe mediu nutritiv PDA steril și confirmată identitatea prin analiza microscopică.

Mortalitatea insectelor a fost calculată folosind formula lui Abbott (1925). Mortalitatea insectelor cauzată de tulpina fungică (exprimată în procente) este (2.4):

$$R = \frac{C - T}{C} \times 100\% \quad (2.4)$$

unde: P este procentul estimat al insectelor ucise doar de patogen,
C – numărul de insecte vii în tratamentul de control,
T – numărul insectelor care au supraviețuit după tratament.

2.4.2. Determinarea activității insecticide a tulpinilor selectate

În scopul stabilirii corelației doză-timp-mortalitate pentru tulpinile fungice care au demonstrat activitate insecticidă sporită, a fost pregătită o serie din cinci diluții ale culturii tulpinii în apă distilată sterilă cu pasul 10. În calitate de martor a fost utilizată apa distilată sterilă. Insectele au fost inoculate conform metodei descrise mai sus. Pentru fiecare concentrație au fost folosite câte 10 exemplare adulte din speciile *Sitona lineatus* și *Hypera postica*. Experiențele au fost realizate în 3 repetiții.

Activitatea biologică a tulpinilor exprimată în LC_{50} a fost calculată după formula lui Spearman-Kärber în valorile concentrației de spori în diluții ale culturilor fungice (Rath 2011) (2.5):

$$\log_{10} LC_{50} = \log_{10} C_m - \delta(\Sigma L - 0,5) \quad (2.5)$$

unde: C_m este concentrația maximală, δ – logaritm zecimal din raportul dintre concentrația precedentă și concentrația următoare testată, (2.6)

$$L = \frac{(\rho_0 - \rho_k)}{(1 - \rho_k)} \quad (2.6)$$

unde: ρ_0 este raportul de insecte moarte în lotul experimental,
 ρ_k – raportul de insecte moarte în lotul martor.

2.4.3. Caracterizarea particularităților de creștere și dezvoltare a tulpinilor fungice cu activitate insecticidă sporită în diferite condiții ale mediului ambiant

Pentru a caracteriza tulpinile fungice care au demonstrat potențial insecticid maximal în condiții de laborator și a prezice eficiența contra speciilor de insecte testate în condiții de câmp, au fost întreprinse un șir de studii suplimentare.

I. Studiarea efectului temperaturii asupra creșterii și dezvoltării tulpinii fungice

Temperatura este un factor important ce determină rata de germinare, creștere și sporulare a tulpinilor fungice.

În scopul determinării influenței temperaturii asupra creșterii vegetative au fost pregătite suspensii de conidii în apă distilată sterilă, cu concentrația de 10^5 conidii/ml. Câte 100 μ l suspensie au fost distribuite uniform la suprafața mediului nutritiv PDA steril cu ajutorul spatulelor Drigalski sterile și cultivate timp de 3 zile la temperatura de 25°C. Din aceste culturi fungice în faza activă de creștere au fost excizate discuri de miceliu cu diametrul de 5 mm fără semne de sporulare. Câte un disc a fost transferat în condiții aseptice în centrul unei noi cutii Petri cu mediu PDA steril. Cutiile Petri însăsmânțate au fost plasate la temperaturile de 15, 20, 25, 30 și 35°C. Pentru fiecare temperatură și fiecare tulpină fungică investigată au fost folosite câte 4 cutii Petri. Cutiile fungice au fost sigilate cu parafilm și plasate în termostat pentru o perioadă de două săptămâni. Creșterea radială a micromicetei a fost înregistrată zilnic cu ajutorul riglei prin efectuarea a două măsurări reciproc perpendiculare. Creșterea radială a majorității fungilor entomopatogeni din ziua a 3-a până în a 12-a urmează un model linear. Luând în considerare acest lucru, viteza de creștere (în mm/zi) a fost utilizată ca parametru de bază pentru caracterizarea influenței temperaturii asupra creșterii vegetative a tulpinilor investigate (Fargues *et al.*, 1997).

Pentru determinarea influenței temperaturii asupra sporulării și viabilității conidiilor, o porțiune de miceliu cu diametrul de 5 mm a fost excizată din culturile fungice menținute timp de 30 de zile la temperaturile 15, 20, 25, 30 și 35°C. Pentru fiecare temperatură au fost luate câte 4 discuri cu diametrul de 5 mm și plasate în tuburi Eppendorf de 1,5 ml ce conțineau 1000 μ l de apă distilată sterilă. Conținutul eprubetelor a fost vortexat la viteza 1000 rot/min. Din fiecare eprubetă au fost luate câte 100 μ l suspensie și transferate în eprubete noi ce conțineau 300 μ l de apă distilată sterilă (diluând suspensia de 4 ori). Conținutul a fost amestecat prin vortexare la viteza 1000 rot./min. Cantitatea de conidii a fost cuantificată folosind hemocitometrul conform metodei descrise mai sus. Numărul de conidii a fost raportat la suprafața discurilor. Viabilitatea conidiilor a fost evaluată conform metodei descrise mai sus.

II. Studiarea efectului luminii solare asupra creșterii și dezvoltării tulpinilor fungice

Lumina solară este unul din factorii de bază care afectează rata de supraviețuire a conidiilor în câmp, razele UV-B (295-320 nm) fiind cele mai distructive. Totodată, iradierea cu raze UV activează procesul de reparare prin fotoreactivare. Pentru a estima efectul luminii solare asupra conidiilor au fost pregătite suspensii ce conțineau 10^6 conidii în apă distilată sterilă și expuse radiațiilor UV cu lungimea de undă 312 nm cu maxima la 300-310 nm timp de 10, 20, 30 și 40 (Mustafa, Gurvinder, 2008, cu unele modificări). În calitate de martor au servit propagulele neiradiate plasate în condiții similare. După expunere la razele UV, câte 100 μ l suspensii conidiale au fost inoculate la suprafața cutiilor Petri cu mediu PDA steril și plasate pentru creștere la temperatura de 25°C. După 24 h de la inoculare a fost determinată rata de germinare conform metodei descrise mai sus. Viabilitatea conidiilor iradiate a fost comparată cu viabilitatea conidiilor neiradiate, folosind formula (2.7):

$$R = \frac{N}{T} \times 100\% \quad (2.7)$$

unde: R reprezintă viabilitatea conidiilor iradiate,
 N – numărul de conidii iradiate ce au germinat,
 T – numărul de conidii germinate în proba martor.

Din aceste culturi fungice în faza activă de creștere au fost excizate discuri de miceliu cu diametrul de 5 mm fără semne de sporulare. Câte un disc a fost transferat în condiții aseptice în centrul unei noi cutii Petri cu mediu PDA steril. Cutiile Petri însămânțate au fost plasate la temperatura de 25°C. Pentru fiecare durată de expunere la UV și fiecare tulpină fungică investigată au fost folosite câte 4 cutii Petri. Cutiile fungice au fost sigilate cu parafilm și plasate în termostat. Datele privind creșterea radială au fost înregistrate zilnic timp de două săptămâni.

III. Studiarea influenței pH-ului mediului nutritiv asupra creșterii vegetative, sporulării și viabilității conidiilor

Au fost pregătite 5 variante de mediu nutritiv PDA cu diferit pH, după cum urmează 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 și 9.0, utilizând NaOH (cristalin) și 1M HCl. Mediul nutritiv PDA cu pH 5.6 a fost folosit în calitate de martor. Discuri de miceliu excizate din culturi proaspete în faza activă de creștere au fost transferate pe cutiile Petri respective și incubate la temperatura de 25°C. Pentru fiecare variantă de mediu nutritiv au fost folosite câte 4 cutii Petri. Viteza de creștere radială, sporularea și viabilitatea conidiilor au fost determinate conform metodelor descrise mai sus.

IV. Studiarea influenței salinității mediului nutritiv asupra creșterii vegetative, sporulării și viabilității conidiilor

Au fost pregătite 6 variante de mediu nutritiv PDA cu diferite concentrații de sare, după cum urmează 1, 2, 3, 5, 7 și 9% de NaCl. Mediul nutritiv PDA fără adăugare de NaCl a fost folosit în calitate de martor (Mert, Dizbay 1977). Discuri de miceliu excizate din culturi proaspete în faza activă de creștere au fost transferate pe cutiile Petri respective și incubate la temperatura de 25°C. Pentru fiecare concentrație de sare au fost folosite câte 4 cutii Petri. Viteza de creștere radială, sporularea și viabilitatea conidiilor au fost determinate conform metodelor descrise mai sus.

V. Studiarea influenței presiunii osmotice asupra viabilității tulpinii, creșterii și dezvoltării

Au fost pregătite suspensii ce conțineau 10^6 conidii/ml în câte 1 ml soluție de NaCl cu următoarele concentrații: 0,006 M, 0,06 M și 0,6 M în 4 repetiții. Conidiile au fost menținute în soluțiile respective timp de 24 h la temperatura 25°C. Suspensiile de conidii menținute în apă distilată sterilă au fost folosite în calitate de martor (Piatkowski, Krzyzewska, 2007, cu unele modificări). După 24 de ore a fost evaluată rata de germinare a conidiilor. Ulterior câte 100 μ l suspensie au fost distribuite uniform la suprafața mediului nutritiv PDA cu ajutorul spatulelor Drigalski sterile. Pentru fiecare concentrație de NaCl testată au fost utilizate câte 4 cutii Petri. După 72 h de la inoculare, din mediul nutritiv au fost excizate discuri de miceliu cu $d = 5$ mm și transferate pe mediu nutritiv PDA steril. Viteza de creștere radială, sporularea și rata de germinare au fost înregistrate conform metodelor descrise mai sus.

3

**PREMISE DE UTILIZARE A AGENȚILOR
FUNGICI ÎN CONTROLUL BIOLOGIC
AL COLEOPTERELOR****3.1. Coleopterele curculionoide, dăunători ai culturilor agricole**

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 chiar dacă sunt aplicate măsuri de protecție a plantelor (Voloșciuc, 2015; Moldovan, 2019).

Reprezentanții suprafamiliei Curculionoidea (Coleoptera) sunt unii dintre cei mai periculoși dăunători ai plantelor de cultură în lume (Perju, 1995; Ghizdavu, 1997; Keskin, Ozkaya, 2015; Carcamo, 2015; Urban, 2015), numărând mai mult de 200 mii specii. În cadrul acestei suprafamilii, cea mai numeroasă familie este Curculionidae, cu aproximativ 51 mii de specii descrise din 4600 de genuri cunoscute în întreaga lume (Oberprieler, 2014; Shin, 2017).

Primele mențiuni despre coleopterele curculionoide din Republica Moldova aparțin secolului al XVIII-lea. Astfel, Dimitrie Cantemir în lucrarea sa „Descrierea Moldovei” menționează dauna gândacilor cari (Coleoptera, Curculionidae, Scolytinae), provocată stejarului. Cercetările orientate au demarat la sfârșitul sec. XIX – începutul sec. XX, în legătură cu necesitatea cunoașterii biologiei unor dăunători periculoși ai plantelor și căutării metodelor de combatere a lor (Rekalo, 1888; Zabriskiy, 1890; Bezval, 1912; Vitkovskiy, 1913; Krasilshchik, 1916; Vereshchagin, 1968 ș.a.). Informații despre răspândirea unor specii de curculionoi-de pe teritoriul Republicii Moldova sunt prezentate și în alte lucrări fundamentale: „Vrediteli lesa” (Lukyanovich, Ter-Minasyan, 1955), „Opredelitel” nasekomyh evropejskoj chasti SSSR” (Arnoldi, Zaslavskiy, Ter-Minasyan, 1965) și în unele publicații cu subiect specific (Petrukha, 1969; Dieckmann, 1982; Korotyayev, 1990; Poiras, 2006). În fauna coleopterelor curculionoide a Republicii Moldova până în prezent au fost evidențiate 683 de specii din 212 genuri, cea mai numeroasă fiind familia Curculionidae (521 specii, ceea ce reprezintă 76,3% din numărul total de specii), urmată de familia Apionidae (88 de specii, 12,9%) (Poiras, 2006).

Majoritatea speciilor de curculionoide sunt fitofagi, preponderent oligofagi sau monofagi, având un spectru trofic extrem de divers și unic. De obicei, reprezentanții acestui grup se hrănesc cu diverse organe ale plantelor, inclusiv mugurii, frunzele, semințele, fructele, tulpina, rădăcina și de asemenea scoarța și lemnul. Cel mai mare număr de specii a fost observat pe plantele din familiile Fabaceae, Rosaceae, Asteraceae, Fagaceae, Brassicaceae și Salicaceae (Poiras, 2006).

Leguminoasele (Fabaceae sau Leguminosae) se clasează pe locul doi după familia Poaceae privind importanța economică. Un număr mare de plante leguminoase, astfel ca mazărea (*Pisum*), fasolea (*Phaseolus*), bobul (*Vicia*), fasolița (*Vigna*),

soia (*Glycine*), linteia (*Lens*), constituie o sursă semnificativă de proteine de origine vegetală. Soia (*Glycine*) este de asemenea sursă de grăsimi. În calitate de plante furajere sunt cultivate trifoiul (*Trifolium*) și lucerna (*Medicago*). De asemenea reprezentanții acestor genuri sunt cultivați și în calitate de fertilizanți naturali. Reprezentanții leguminoaselor sunt utilizați de asemenea ca sursă de fibre, condimente și în calitate de plante decorative (Bennett, 2011). Leguminoasele înregistrează o tendință pozitivă: din 2013, producția aproape s-a triplat în Uniunea Europeană și a ajuns la 6 milioane de tone (2,6 mil. ha) în 2018. Principalele leguminoase sunt mazărea de câmp și bobul, în timp ce linteia și năutul sunt cultivate doar pe suprafețe limitate. Franța, Spania și Lituania sunt principalii producători de mazăre de câmp. În Republica Moldova, conform datelor prezentate de Biroul Național de Statistică, în perioada anilor 2008-2018, suprafața terenurilor agricole cultivate cu leguminoase pentru boabe a oscilat între 28-41 mii ha, iar suprafața terenurilor ocupate de plante de nutreț între 71-54 mii ha. De asemenea, se observă o creștere pozitivă a recoltei medii a leguminoaselor pentru boabe de la 1,3 t/ha în 2008 până la 2 t/ha în 2017 cu o scădere la 1,2 t/ha în 2018 (Anuarul Statistic al Republicii Moldova, 2019).

Printre leguminoase, genul *Pisum* cuprinde specii de plante ierboase anuale de origine asiatică și nord-africană. Genul conține cinci specii, printre acestea mazărea (*Pisum sativum* L.) este cultivată pentru boabe și semințe. Boabele de mazăre, fiind bogate în proteină (20-35%) și amidon (30-50%), sunt folosite în hrana oamenilor în stare verde sau conservate, dar și ca boabe uscate. Paietele de mazăre, bogate în proteină (6-10%), se folosesc la furajarea oilor. Cultura de mazăre lasă solul bogat în azot (80-100 kg/ha), eliberând terenul devreme. Având rădăcină pivotantă ce pătrunde adânc în sol (100 cm) și cu capacitate de solubilizare a compușilor greu solubili de fosfor și calciu, ea poate valorifica apa și nutrienții dintr-un volum mare de sol și aduce la suprafață compuși de fosfor și calciu necesari culturilor post-mergătoare (Starodub, 2008). Din suprafața totală cultivată cu mazăre (atât pentru consum în stare proaspătă, cât și uscată), 4,5 mil. ha revin Asiei cu recolta medie de 9,3 t/ha mazăre verde și 1,13 t/ha mazăre uscată; urmată de Europa cu 3,0 mil. ha, recolta medie 5,3 tone/ha mazăre verde și 1,38 tone/ha mazăre uscată (dintre care 2,2 mil. ha sunt cultivate în Europa de Est, cu o recoltă medie de 4,3 t/ha mazăre verde și 1,14 t/ha mazăre uscată) și America de Nord cu 1,8 mil. ha, recolta medie 4,8 t/ha mazăre verde, 1,36 t/ha mazăre uscată (1,4 mil. ha fiind cultivate în Canada) (FAO, FAOSTAT, 2019).

Producțiile medii de mazăre obținute în România sunt în jur de 1,5 t/ha, dar în condițiile aplicării unor tehnologii corespunzătoare se pot obține 2-4 t/ha. În Franța se realizează curent producții medii pe țară de peste 4 t/ha. Din producția totală a plantelor, boabele reprezintă 35-50%. În Republica Moldova, suprafața însămânțată cu mazăre verde a scăzut de la 3,1 mii ha la 2,2 mii ha în anii 2010-2018, pe când productivitatea a crescut de la 2,7 la 3,96 t/ha cu o scădere în 2018 la 2,23 t/ha. Suprafața totală de leguminoase pentru boabe în perioada respectivă este în creștere, datele nefiind dezagregate după culturi (Anuarul Statistic al Republicii Moldova, 2019).

Genul *Medicago* cuprinde specii de plante anuale și perene, utilizate în calitate de furaje atât în zonele temperate, cât și tropicale. Printre acestea, lucerna (*Medicago sativa* L.) este o specie perenă cultivată în multe țări ca cel mai important furaj pentru perioada de iarnă (Chandra, 2009), cu suprafața anuală de cultivare de aproximativ 30 mil. ha (Kechang, Ping, Cash, 2009; Tohidfar *et al.*, 2013). Lucerna este o cultură avantajoasă fiind o leguminoasă perenă, se exploatează 3-5 ani, realizează producții mari de furaj (14-20 t substanță uscată la hectar, în sistem intensiv), are un conținut ridicat de proteină brută (19-20% P.B. din S.U.). Lucerna are un rol important în asolament ca solă amelioratoare, lăsând în sol cantități importante de azot fixat pe cale simbiotică (Schitea 2010). Această cultură este bine cunoscută pentru producția de biomasă bogată în nutrienți. Este o sursă alimentară importantă pentru animale, deoarece este îmbogățită cu proteine, calciu, fosfor și vitamine (A, B și D) (Sharma, Kumar, Bhatnagar, 2011). Consumul mondial anual de biomasă de lucernă în 2018 a constituit în jur de 197,8 mil. tone (*Mordor Intelligence. Alfalfa hay market - growth, trends, and forecast, 2020-2025*). Din suprafața totală cultivată cu lucernă, 41% (11,9 mil. ha) au revenit Americii de Nord, alte 25% (7,12 mil. ha) au revenit Europei, 23% – Americii de Sud (7 mil. ha) și 8% – Asiei (2,23 mil. ha), restul suprafeței a revenit Africii și Oceaniei. Conform datelor ultimilor ani, cel mai mare producător de lucernă a fost SUA, suprafața cultivată fiind de aproximativ 6,9 mil. ha, urmată de China (4,7 mil. ha și producție de 1,4 mil. t), Canada (3,7 mil. ha) (Gardner, Putam, 2018), Australia (3-3,5 mil. ha) (Humphries *et al.*, 2018), Argentina (3,2 mil. ha) (Basigalup *et al.*, 2018). În Franța, lucerna se cultivă pe aproximativ 600 mii ha, cu recolta medie de 12 t/ha (Beguier *et al.*, 2018). În România, lucerna este principala plantă furajeră, suprafața ocupată cu această cultură, în perioada 2012-2018, a oscilat între 337,8-408,7 mii ha (Anuarul statistic al României, 2019). În Republica Moldova, în perioada anilor 2008-2018, suprafața terenurilor ocupate de plante de nutreț a oscilat între 71-54 mii ha (Anuarul Statistic al Republicii Moldova, 2019).

Genul *Trifolium* conține aproximativ 300 de specii cu răspândire cosmopolită și cu cea mai mare diversitate în zonele temperate; pot fi plante anuale, bienale sau perene. Valoroase din punct de vedere economic sunt considerate trifoiul-roșu (*Trifolium pratense* L.) și trifoiul-alb (*Trifolium repens* L.). În prezent, trifoiul-roșu se cultivă pe toate continentele chiar dacă are o plasticitate ecologică inferioară lucernei, ocupând o suprafață de circa 15 mil. ha, din care aproximativ o treime în SUA. Trifoiul roșu se folosește în hrana animalelor sub formă de masă verde, fân, făină de fân sau nutreț însilozat. Recoltat la înflorire, fânul de trifoi conține circa 14,5% proteină brută, 20,4% celuloză brută, 22-26 mg caroten/kg furaj și cantități însemnate de vitamine. În Republica Cehă, trifoiul-roșu este una dintre cele mai răspândite culturi furajere. Aceasta este cultivată pentru producția de furaje verzi și material săditor (Kolarik, Rotrekl, 2013). Trifoiul-roșu prezintă importanță deosebită și în ameliorarea unor însușiri ale solului, acțiunea de refacere a structurii solului fiind mai mare decât la lucernă.

Pierderile anuale în recolta leguminoaselor cauzate de boli, dăunători și buruieni constituie aproximativ 37%, dintre acestea 10-15% sunt provocate de insectele

dăunătoare, datele fiind incomplete, deoarece problema calității furajului nu este luată în considerație (Cristea, 2002).

Plantele leguminoase sunt gazde pentru diverse specii de artropode. Conform unor studii, în SUA peste 1000 specii de artropode sunt trofic atașate de fabacee. Dintre acestea, 100-150 specii cauzează daune economice și doar câteva dintre ele, pot fi considerate dăunători cheie, restul fiind de importanță locală sau sporadică, fitofagi accidentali, entomofagi (parazitoizi și prădători) sau polenizatori. Insectele provoacă daune nu doar părților aeriene ale plantelor și semințelor, dar afectează, de asemenea, persistența și longevitatea câmpurilor. Dăunătorii cheie ai fabaceelor în SUA sunt *Hypera postica* (Gyll.) (Coleoptera, Curculionidae), precum și un complex de dăunători hemipteri (Hemiptera) precum: *Empoasca fabae* (Harris), *Therioaphis maculata* (Buckton), *Acyrtosiphon pisum* Harris, *A. kondoi* Shinji., *Spissistilus festinus* (Say), *Philaneus spumarius* (L.). În producția de semințe, pierderi importante pot fi cauzate de *Lygus hesperus* (Knight) și *L. elisus* Van Duzee (Hemiptera), *Bruchophagus roddi* Gussakovskiy (Hymenoptera) și *Otiorrhynchus ligustici* L. (Coleoptera, Curculionidae). În Europa, leguminoasele sunt atacate de un spectru larg de dăunători, printre care menționăm speciile: *Otiorrhynchus ligustici*, *Phytonomus transsylvaticus* Petri, *Tychius flavus* Beck. precum speciile din genul *Sitona* spp. (Coleoptera, Curculionidae), *Aphis craccivoru* Koch. *Therioaphis trifolii* Mon, *Adelphocoris lineolatus* Goeze, (Hemiptera), *Contarinia medicaginis* Kieff. (Diptera), *Bruchophagus roddi* Guss (Hymenoptera), *Chloridea viriplaca* Hfn. (Lepidoptera) ș.a. Cercetările efectuate în câmpurile de lucernă pe teritoriul Republicii Moldova au evidențiat faptul că curculionidele reprezintă cea mai numeroasă familie de dăunători, fiind identificate 22 de specii aparținând la 12 genuri (Munteanu *et al.* 2014a). Speciile *Sitona lineatus* L., *Hypera postica* (Gyll.) și *Protapion apricans* (Hbst.) au fost atestate drept dăunători semnificativi ai culturilor de *Fabaceae* (Munteanu *et al.*, 2012, Hotărârea Guvernului Republicii Moldova nr. 123 din 02.02.2018).

Speciile *Sitona lineatus*, *Hypera postica* și *Protapion apricans* sunt de origine Palearctică, iar potențialul expansiv al acestora a crescut remarcabil în ultimii ani (Botha, Hardie, Casella, 2004). În America de Nord, specia *S. lineatus* a fost pentru prima dată identificată în 1936 în statele Victoria, Columbia Britanică și Canada (Downes 1938). Ulterior specia s-a răspândit spre Sud și s-a stabilit în Washington, Oregon, California de Nord, Idaho de Nord-Vest și alte regiuni din Nord-Vestul SUA (Hoebeke, Wheeler, 1985). De asemenea specia și-a extins arealul de răspândire în Africa de Nord și Orientul Apropiat (Turcia, Georgia, Armenia, Azerbaidjan, Liban, Siria, Israel, Iordan, Peninsula Sinai, Peninsula Arabă, Iran și Irak) (Fauna Europaea, *Sitona lineatus*). Cât privește specia *Hypera postica*, aceasta a fost introdusă în Nearctica la începutul anilor 1900 (Zahiri *et al.*, 2014). Insecta s-a răspândit în părțile de vest și de sud ale Asiei, Africa de Nord, (Hsiao, 1993) și Japonia (Okumura, Shiraishi 2002). Deși au fost raportați numeroși factori biotici de mortalitate pentru această specie, ea persistă în plantațiile de lucernă în majoritatea țărilor în care această plantă este cultivată (Khanjani, 2005; Zahiri *et al.*, 2014). Specia *Pro-*

tation apricans este răspândită pe o parte semnificativă din regiunea Paleartică, cu excepția tundrei și deșerturilor din Finlanda. Specia s-a răspândit în Orientul Apropiat (Turcia asiatică, Republicile Ruse din Caucaz, Georgia, Armenia, Azerbaidjan, Lebanon, Siria, Israel, Iordan, Peninsula Sinai (Egipt), Peninsula Arabă, Iran și Irak) (Fauna Europaea, *Protapion apricans*).

***Sitona lineatus*.** Hrănirea insectelor adulte cu frunze primăvara poate distruge materialul săditor și plantele tinere. Forma „U” caracteristică a creștăturilor este rezultatul hrănirii adulților, iar în cazul infestărilor severe, mugurii de creștere pot fi distruși complet (Jackson, 1920). Hrănirea adulților limitează capacitatea fotosintetică a leguminoaselor, în consecință se reduce capacitatea de a produce organe reproductive sau nodozitățile rădăcinii de sprijin (Havlickova, 1982; Williams, Schotzko, O’Keeffe, 1995). Gradul de deteriorare a plantelor gazdă primare în timpul hrănirii adulților primăvara depinde de momentul de atac și de densitatea insectelor (Williams, Schotzko, O’Keeffe, 1995, 1998). Reducerea suprafeței fotosintetizante, datorită defolierii, constituie 50% în momentul de răsărire a plantelor și 35% atunci când defolierea începe cu o săptămână mai târziu. În lipsa compensării nutrienților, defolierea poate reduce numărul de păstăi pe plantă (Williams, Schotzko, O’Keeffe, 1995, 1998). Prejudiciul adus de către adulți plantelor gazdă nu se limitează doar la defoliere. Astfel, *S. lineatus* a fost identificată ca vector al ofilirii bacteriene (*Clavibacter michiganensis* ssp. *insidiosus*) la cultura de lucernă (Kudela, Havlickova, Vacke, 1984). Larvele au un habitat criptic și deteriorează semnificativ nodozitățile rădăcinii (Jackson, 1920; George, 1962; Bardner, Fletcher, 1979). Rata maximală de distrugere a nodozităților coincide cu faza de înflorire (Jackson, 1920). În studiile întreprinse, larvele au deteriorat între 40 și 98% dintre nodozități, în special cele de pe rădăcina principală (Verkleij, van Amelsvoort, Smits, 1992; Carcamo, Vankovsky, 2011). Prin distrugerea nodozităților larvele cauzează pierderi economice mult mai mari decât defolierea cauzată de adulți (Hunter, 2001; Corre-Hellou, Crozat, 2005). Deteriorarea rădăcinii poate face plantele mai sensibile la infecțiile secundare și modifică echilibrul de azot dintre rădăcini și structurile supraterane (Hunter, 2001). Distrugerea nodozităților rădăcinii induce pierderea cantității de azot din semințe și reduce cantitatea de azot care ajunge în sol, în special dacă momentul de atac coincide cu fazele inițiale de înflorire (Dore, Meynard 1995, Corre-Hellou, Crozat, 2005; Carcamo, Herle, Lupwayi, 2015; Carcamo *et al.*, 2018). Atunci când daunele cauzate de *S. lineatus* cresc, cantitatea de azot provenită prin fixarea acestuia scade (Corre-Hellou, Crozat 2005), ceea ce contribuie la scăderea cantității de azot disponibil în sol pentru culturile ulterioare (Dore, Meynard, 1995; Carcamo, Herle, Lupwayi, 2015). Pragul economic de dăunare recomandat constituie de la 0,3 până la 1 adult per plantulă (Antonelli *et al.*, 1985). Dacă numărul mediu de plantule cu frunzele din vârf deteriorate depășește 30%, dăunătorul prezintă risc pentru recoltă și este necesar de a interveni cu măsuri de control (Carcamo, Vankovsky, 2011; Carcamo *et al.*, 2018).

***Hypera postica*.** Atât larvele, cât și adulții speciei *H. postica* provoacă daune considerabile părților vegetative ale leguminoaselor. Câmpurile puternic infestate

par argintii sau chiar albe, din cauza defolierii severe. Adulții și larvele în număr mare pot deteriora tulpinile, frunzele și mugurii împiedicând regenerarea (Fick, 1976; Reddy *et al.*, 2018; Yucel *et al.*, 2018, Nikolova, 2018). Efectele reziduale ale leziunilor severe provocate de dăunător pot reduce creșterea plantei, drept rezultat scade randamentul recoltelor ulterioare (Fick, Liu, 1976; Radcliffe, Flanders, 1998). Cele mai grave vătămări au loc la prima recoltă de lucernă (Fick, Liu, 1976; Nikolova 2018). Cu toate acestea, din cauza infestărilor severe, a doua recoltă de asemenea poate fi afectată de hrănirea larvelor și adulților din miriște (Fick, 1976; Nikolova, 2018). Prejudiciile provocate de specia *H. postica* pot duce la scăderea masei verzi a plantei și randamentului calității furajelor. Severitatea distrugerii culturii depinde de densitatea dăunătorilor și stadiul de dezvoltare a plantelor, în momentul de infestare (Koehler, Pimentel, 1973; Koehler, Rosenthal, 1975; Shade, Hintz, 1983). Cu cât mai devreme planta este atacată, cu atât mai mare este impactul produs de larve în timpul hrănirii. Odată cu dezvoltarea suficientă a plantei, aceasta poate tolera defolierea, iar nivelul scăzut al populației dăunătorului (< 3 larve pe plantă) poate avea chiar un efect pozitiv asupra culturii prin stimularea creșterii vegetative (Weaver, Balasko, Townsend, 1993). Prin urmare, nivelurile de prejudiciu economic pentru lucernă provocate de *H. postica* sunt dificil de calculat și se bazează în principal pe înălțimea tulpinii plantei în momentul infestării (Koehler, Pimentel, 1973; Koehler, Rosenthal, 1975; Kuhar, Youngman, Laub, 2000). Conform unor studii, pragul economic de dăunare pentru specia *H. postica* constituie 1,5 până la 3 larve per tulpină sau 20 larve per plantă. Cu toate acestea, pragurile economice reale pot fi mai mici sau mai mari decât aceste valori, fiind util de a le estima în baza costurilor suportate pentru produsele de uz fitosanitar și prețul lucernei pe piață (Pellissier, Nelson, Jabbour 2017). Specia *H. postica* este considerată un dăunător considerabil al plantelor de cultură și a dus la pierderi economice semnificative în întreaga lume. Daunele cauzate de acest dăunător în prima recoltă pot atinge 50-70% (Khanjani, 2005). Pe de altă parte, lipsesc programele de creare a soiurilor de lucernă rezistente la dăunătorul *H. postica*, din cauza variației genetice insuficiente a plantei și lipsei datelor privind genele responsabile de rezistență (Tesfaye, Samac, Lamb, 2009; Tohidfar *et al.*, 2013). În cazul speciei *H. postica*, preferința pentru lucernă este atât de mare încât culturile gazdă secundare nu vor fi vătămate, atât timp cât lucerna este cultivată alături de acestea în câmp (Campbell *et al.*, 1975).

***Protapion apricans*.** În cazul speciei *Protapion apricans*, cele mai mari daune sunt de asemenea provocate de larve. Acestea vătămează mugurii foliari, cei floralii, semințele și distrug ovarele florilor. Pe parcursul dezvoltării sale, larva consumă în jur de 5-11 ovare. Pierderile de flori de trifoi-roșu pot ajunge la 80%, iar pierderile de semințe 50%. Primăvara, înainte de depunerea pontei, insectele adulte se hrănesc cu frunze și mugurii auxiliari. Larvele care se dezvoltă pot provoca daune serioase prin roaderea galeriilor în tulpini. Pragul economic de dăunare pentru trifoiul-roșu variază între 4-10 adulți pe m². O densitate a insectei egală cu 2-3,5 indivizi per plantă implică necesitatea de a interveni cu măsuri fitosanitare de control (Kolarik, Rotrekl, 2013).

Din păcate, în sistemele agricole de producție a leguminoaselor, dăunătorilor le este acordată o atenție ne semnificativă. Studiile întreprinse în anii 2014- 2016 au arătat că neglijarea problemei în cauză a condus la creșterea considerabilă a populațiilor speciilor de insecte dăunătoare (Munteanu *et al.*, 2014a; Munteanu Molotievskiy, Bacal, Moldovan, 2015).

3.2. Metode utilizate în combaterea coleopterelor curculionoide dăunătoare

Dovezile științifice demonstrează faptul că insectele au existat pe Pământ cu mult înainte de apariția speciei umane. Odată cu dezvoltarea agriculturii, o preocupare tot mai mare a devenit de a proteja plantele de dăunători. În acest scop au fost dezvoltate diverse metode de combatere printre care evidențiem metodele fizico-mecanice, agrotehnice, genetice, chimice și biologice.

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. Pe parcursul timpului, împotriva speciei *Sitona lineatus* au fost utilizate numeroase insecticide chimice din grupurile: organofosfaților (forat), carbamaților (aldicarb, carbofuran, carbosulfan, ben-furacarb, bendiocarb, furatiocarb), piretroizilor (lambda-cihalotrin, permetrin, beta-ciflutrin) și neonicotinoidelor (imidacloprid, tiametoxam, clotianidin) (Horak, Buryskova, 1980; King, 1981; Bardner, Fletcher, Griffiths, 1983; Griffiths, Bardner, Bater, 1986; Ester, Jeurig, 1992; Steene *et al.*, 1999; Rotrekl, Cejtchaml, 2008; Vankosky, Carcamo, Dossdall, 2009-2011). Investigarea produselor chimice cu potențial de a fi utilizate în controlul speciei *S. lineatus* s-a axat pe identificarea celor mai eficiente insecticide și proceduri de aplicare. Insecticidele foliare pot reduce numărul de adulți și proteja roada (Bardner, Fletcher, Griffiths, 1983). Aplicațiile foliare nu au efecte directe asupra larvelor, dar aplicarea în timp util poate scădea populațiile de adulți, producția de ouă și populațiile eventuale ale larvelor (Steene *et al.*, 1999). Spray-urile foliare trebuie să fie aplicate cât mai rapid după detectarea insectelor, în scopul de a controla populațiile larvare, deoarece adulții reușesc să se împerecheze și femelele depun ouă la scurt timp după sosire. Dacă sunt aplicate prea târziu, depunerea pontei nu este împiedicată, iar eforturile de control nu vor avea impact asupra populațiilor larvare (Bardner, Fletcher, Griffiths, 1983; Ester, Jeurig, 1992). Utilizarea tratamentelor insecticide ale semințelor pentru a proteja rădăcinile leguminoaselor anuale și de a furniza o protecție sistemică a frunzișului au avut un anumit succes (Seidenglanz *et al.*, 2010; Carcamo, Vankovsky, 2011). Controlul speciei *S. lineatus* poate fi realizat prin aplicarea tratamentelor semincere, însă beneficiile pot fi scăzute, deoarece semințele au tendința de a se aglomera, reducând rata de însămânțare. Actualmente se recomandă aplicarea combinată a tratamentelor semincere cu pulverizarea foliară (Wanner, 2016).

Împotriva speciei *Hypera postica* sunt eficiente următoarele insecticide: Imidan (fosmet), malation, Coragen 20 SC (clorantraniliprol), Cygon 480 CE/Lagon 480

E (dimetoat), Matador/Bug, Silencer 120 EC (lambda-cihalotrin). Larvele și adulții speciei pot fi controlați bine cu insecticide organofosforice, inclusiv carbamați și piretroizi. Cu toate acestea, apariția unor insecticide organofosforice în apele de suprafață, în special clorpirifos (Lorsban®), care coincide cu perioada aplicării insecticidelor contra dăunătorului, pune accent pe găsirea mijloacelor alternative în gestionarea speciei *H. postica* (Long *et al.*, 2002). Mai mult de atât, insecticidele piretroide au dezavantajul de a fi non-selective. Studiile recente pun în evidență eficacitatea produsului fipronil (Solitaire WG 80%) care posedă spectru larg de acțiune, dar este considerat mai puțin periculos, deoarece este slab miscibil cu apa, ceea ce ar putea reduce pătrunderea acestuia în apele subterane (Mohammadpour, Jafarlu, Soltani, 2018).

Adulții speciei *Protapion apricans* perforează frunzele, iar larvele distrug ovaarele trifoiului. Astfel, pentru controlul speciei, pe piață sunt disponibile produse chimice precum: Fastac 10 EC (alfa-cipermetrin), Decis 2.5 EC (delta-metrin), Polytrin 200 CE (cipermetrin), Karate 5 EC (lambda-cihalotrin), Cypermetrin 200CE, Fury 10 EC (zeta-cipermetrin), Sumialpha 5 CE (esfenvalerat), Bulldock 0.25 EC (beta-ciflutrin), Regent 200 CE (fipronil), Alphaguard 10 CE (alfa-metrin) care provoacă mortalitate de 91-100% în cazul adulților și 69-91% fiind aplicate împotriva larvelor (Bucurean, 2008). În intenția de a identifica produse chimice mai puțin toxice pentru mediu au fost investigate astfel de produse ca Biscaya 240 (tiacloprid) și Mospilan 20 SP (acetamiprid) care au demonstrat eficiență înaltă contra speciei *P. apricans* în condiții de teren (Kolarik, Rotrekl, 2013).

Este cunoscut faptul că majoritatea compușilor chimici utilizați posedă un nivel înalt de toxicitate și 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. Drept rezultat al consumului de produse alimentare nesănătoase se reduce randamentul muncii, apar dizabilități prelungite cu repercusiuni grave. De asemenea, pesticidele au un impact negativ atât asupra mediului, cât și asupra biodiversității (van der Werf, 1996; Wilson, Tisdell, 2001; Maroni, Fanetti, Metruccio, 2006; Berny, 2007; Pimentel, 2005; Damalas, Eleftherohorinos, 2011). Mai mult de 98% din insecticidele utilizate în afara speciei țintă atacă un spectru larg de organisme benefice (Miller, 2004). Aplicarea insecticidelor chimice are efect negativ prin distrugerea populațiilor speciilor benefice precum inamicii naturali ai dăunătorilor sau polenizatorii și creșterea probabilității de dezvoltare a rezistenței dăunătorilor la produsul utilizat (Damalas, Eleftherohorinos, 2011). Din cauza efectelor adverse, unele din aceste produse (dre exemplu forat, aldicarb, carbofuran, carbosulfan ș.a) deja sunt interzise spre utilizare în mai multe state (Anexa III, Convenția de la Rotterdam). Drept rezultat au apărut noi tipuri de pesticide chimice, mai specifice și mai puțin persistente. În plan global, totuși se constată o tendință de creștere a cantităților de pesticide chimice utilizate, inclusiv cele interzise (Lamberth, Jeanmart, Luksch, 2013; Nishimoto, 2019).

Necesitatea identificării unei alternative insecticidelor chimice a stimulat interesul pentru elaborarea unor metode de control al dăunătorilor inofensive pentru om

și mediu, readucând în atenția cercetătorilor metodele fizico-chimice, agrotehnice, genetice și biologice de control al dăunătorilor și plasând un accent tot mai mare pe elaborarea strategiilor de management integrat al dăunătorilor.

Monitorizarea regulată a culturilor agricole, pentru identificarea potențialilor dăunători, este indispensabilă unui management eficient al organismelor dăunătoare. Cea mai răspândită metodă de monitorizare este examinarea câmpului pe un traseu zigzag sau sub forma literei M. Pentru a monitoriza insectele, de asemenea pot fi utilizate capcane. Acestea sunt utilizate, în special, pentru detectarea prezenței insectelor care se deplasează rapid. Monitorizarea permite de a interveni la momentul oportun și de a preveni o daună considerabilă. Cercetările efectuate au sugerat faptul că capcanele cu feromoni de agregare ar putea fi eficiente pentru monitorizarea populațiilor de densitate mică (Nielsen, Jensen, 1993). În testările întreprinse, capcanele feromonale au asigurat monitorizarea eficientă a populațiilor de insecte (Quinn *et al.*, 1999). Studiile recente subliniază faptul că tipul capcanei, tipul recipientului pentru feromoni și locul amplasării capcanelor influențează eficiența metodei (Reddy *et al.*, 2018). Utilizarea capcanelor cu feromoni poate facilita aplicarea mai eficientă a insecticidelor foliare.

Un management eficient al organismelor dăunătoare presupune mai multe activități care se completează reciproc. Majoritatea practicilor de management sunt activități de lungă durată care au drept scop principal prevenirea impactului negativ prin menținerea populațiilor de organisme dăunătoare sub pragul economic de dăunare. Practicile de control, pe de altă parte, sunt activități de scurtă durată care urmăresc nimicirea organismelor dăunătoare. Metodele preventive sunt considerate prioritare comparativ cu metodele de control direct. Accentul urmează a fi plasat pe încurajarea proceselor biologice și a mecanismelor naturale de protecție. Soluția pentru problema dăunătorilor sunt metodele non-toxice, care pot asigura sănătatea omului, în particular, și a mediului în ansamblu.

Managementul sustenabil al dăunătorilor presupune parcurgerea a trei etape:

- 1) asigurarea condițiilor bune de creștere și dezvoltare pentru culturi în scopul sporirii rezistenței acestora;
- 2) încurajarea mecanismelor naturale de control prin promovarea inamicilor naturali ai dăunătorilor;
- 3) aplicarea măsurilor de control direct pentru a distruge dăunătorii cu impact negativ minim asupra ecosistemului.

Scopul acestei abordări este optimizarea măsurilor utilizate la etapele 1 și 2, încurajând mecanismele de autocontrol natural și minimizarea utilizării măsurilor de control direct (etapa 3). Acest lucru reduce cheltuielile și previne impactul negativ al metodelor de control direct asupra agroecosistemului. Experiența practică a fermierilor și rezultatele științifice confirmă că utilizarea combinată a metodelor preventive și directe de control a organismelor dăunătoare este cea mai eficientă (Moldovan, 2018).

Etapa 1. Urmează a fi selectate acele varietăți/soiuri care sunt bine adaptate la condițiile locale de mediu (temperatură, aportul de nutrienți, buruieni, dăună-

tori și boli), fiind mai rezistente la atacul dăunătorilor. Este necesar ca semințele să fie neinfectate, cu energie germinativă maximă, provenite din surse demne de încredere. Majoritatea dăunătorilor atacă planta la un anumit stadiu de viață. Este important ca acest stadiu de viață să nu corespundă cu perioada densității înalte a dăunătorului. Alegerea corectă a perioadei de semănat și plantat permite de a evita invazia în procesul de migrare, depunere a ouălor sau introducerea bolilor de către insectele vectori. De asemenea, permite de a sincroniza atacul cu inamicii naturali ai acestora, condițiile de mediu nefavorabile pentru dezvoltare sau prezența gazdelor alternative. Alegerea perioadei optime de semănat/plantat necesită cunoașterea ciclului de viață al organismelor dăunătoare. Astfel, o tactică eficientă de control al dăunătorilor lucernei este recoltarea culturii primăvara devreme (Cassagrande, Stehr, 1973), înainte de depunerea pontelor cu asigurarea unei recolte calitative. Recoltarea târzie de toamnă, de asemenea, poate ajuta la reducerea populațiilor de curculionioide dăunătoare (Hilburn, 1985). Pășunatul de iarnă poate avea un efect similar ca recoltarea târzie. Introducerea materiei organice în sol poate ajuta la controlul dăunătorilor prin suplینirea solului cu microorganisme patogene pentru insecte și activarea rezistenței plantelor la dăunători de către substanțele nutritive din compost. Aplicarea mulciului organic poate reduce dăunătorii prin crearea confuziei olfactive sau prin mascarea locurilor preferate pentru depunerea ouălor. Utilizarea sistemelor de culturi limitează presiunea organismelor dăunătoare, acestea având puține plante gazdă. Diversitatea plantelor oferă un habitat favorabil pentru insectele benefice. Speciile de plante înrudite pot, vizual și chimic, să interfereze cu organismele dăunătoare, făcând habitatul mai puțin favorabil pentru ele. Culturile capcană sunt mai atractive pentru dăunător decât cultura principală, fie în calitate de hrană, fie pentru depunerea ouălor. În majoritatea cazurilor, culturile capcană sunt distruse la o infecție severă sau la finisarea ciclului de viață al plantelor pentru a evita migrarea dăunătorului în cultura principală. O altă strategie este intercalarea culturilor repelente pentru dăunători între rândurile culturii principale. În acest sistem, cultura intercalată maschează cultura principală, care nu este recunoscută de către insectă, fie datorită substanțelor chimice produse, fie din cauza diferențelor fizice dintre planta respectivă și planta gazdă. Culturile de acoperire protejează solul de eroziune, sporesc activitatea biologică în sol și pot favoriza prezența organismelor folositoare. Insectele dăunătoare nu vor găsi cultura din cauza confuziei olfactive (Pelissier *et al.*, 2017; Moldovan, 2018; Carcamo *et al.*, 2018).

Etapa 2. Inamicii naturali ai dăunătorilor sunt alte organisme (virusuri, bacterii, fungi, prădători și parazitoizi), care contribuie la controlul organismelor dăunătoare. Practicile au drept scop de a stimula dezvoltarea inamicilor naturali în cultura principală și în apropierea ei, prin asigurarea unui habitat favorabil acestora. Pentru îmbunătățirea habitatelor trebuie alese doar plante care nu sunt gazde pentru organismele dăunătoare. Aceasta presupune acceptarea existenței unui număr redus de dăunători în câmp, care vor servi ca hrană sau gazdă pentru inamicii naturali și includerea în sistemul de culturi a plantelor care vor constitui hrană sau adăpost pentru

inamicii naturali. Gardurile vii atrag prădătorii și parazitoizii, oferind nectar, polen, gazde alternative și/sau pradă. Zonele de refugiu pentru coleoptere constituie fâșiile de iarbă din vecinătatea câmpurilor de cultură care oferă habitat pentru inamicii dăunătorilor, cum ar fi carabidele, stafilinidele și păianjenii. Măsurile de protecție a culturilor leguminoase de asemenea presupun crearea zonelor tampon de protecție (Hossain *et al.*, 2002; Landis, Wratten, Gurr, 2000; Philips, Rogers, Kuhar, 2014; Pellisier, Nelson, Jabour, 2017). După prima tăiere, este necesar să se păstreze o mică parte a zonei tampon, în care dăunătorul poate depune ouăle; după sfârșitul înfloririi, această zonă tampon poate fi cosită, iar furajul recoltat distrus, astfel încât dăunătorii în curs de dezvoltare să fie, de asemenea, distruși. În plus, zonele tampon înflorite pot atrage insectele polenizatoare, care, după tăiere, pot continua să viziteze și polenizeze florile din a doua creștere (Kolarik, Rotrekl, 2013). Fâșiile cu flori presupun plantarea plantelor cu flori locale pentru a atrage prădătorii, parazitoizii și polenizatorii. Plantele companion din cadrul culturii principale de asemenea pot atrage inamicii naturali ai dăunătorilor și polenizatorii.

Etapa 3. În cazul invaziilor devastatoare a dăunătorilor sau patogenilor vor fi necesare măsuri directe, pentru a minimiza pierderile. Controlul direct este utilizat ca ultimă opțiune în cazul când celelalte metode au eșuat. Practicile de control direct includ: controlul fizico-mecanic și controlul biologic. Dintre metodele fizico-mecanice evidențiem utilizarea capcanelor pentru capturarea insectelor. Capcanele nu trebuie plasate la hotarul câmpului sau în apropierea zonelor de refugiu pentru insectele benefice. Capcanele cu feromoni sunt utilizate de obicei pentru monitorizarea dăunătorilor, dar pot fi utilizate și pentru capturarea în masă (Bacal, Cocîrță, Munteanu, 2014; Moldovan, 2018).

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. Controlul biologic este o parte extrem de importantă a strategiilor de Management Integrat al Organismelor Dăunătoare (IPM) care pot asigura sustenabilitatea agriculturii, siguranța economică și alimentară (Tanada, Kaya, 1993).

3.3. Istoricul cercetărilor privind controlul biologic al dăunătorilor

Dezvoltarea metodelor de control biologic al dăunătorilor a avut la bază faptul că organismele dăunătoare, la rândul său, sunt atacate de alte organisme vii, numite inamici naturali (Sweetman, 1936). Putem spune că conceptul își are originea în perioada timpurie a dezvoltării apiculturii și sericulturii, când au început să fie observate unele anomalii la albini și viermii de mătase. O listă detaliată a evenimentelor centrale este prezentată în lucrarea „*Microbial control-the emergence of an idea. A brief history of insect pathology through the nineteenth century*” (Controlul microbiologic, apariția unei idei. Un scurt istoric al patologiei insectelor în

timpul sec. al XIX-lea) (1956), autor Edward Steinhaus și în Capitolul 2 al lucrării „*Insect Pathology*”, Ediția a II-a (2012, autor E. Davidson, ed. F. Vega, H. Kaya).

În istoria cercetărilor privind controlul biologic pot fi evidențiate trei etape:

I. Etapa preliminară, în care agenții de control biologic erau utilizați fără o fundamentare științifică (anii 200-1887);

II. Perioada intermediară în care au fost puse bazele cercetărilor în acest domeniu (1888-1955);

III. Etapa modernă, caracterizată prin cercetări complexe fundamentate teoretic și metodologic (1956 – prezent).

Primele date privind utilizarea metodelor de control biologic sunt menționate în China, în secolul al III-lea. Acestea se referă la utilizarea furnicilor din specia *Oecophylla smaragdina* Fabricius (Hymenoptera) pentru controlul dăunătorului citricelor *Tesseratoma papillosa* (Hemiptera). Fenomenul de parazitism la insecte (parazitoizi) este pentru prima dată interpretat de Van Leeuwenhoek în 1701 și Vallisnieri în anul 1706 (Godfray, 1994). Primul patogen al insectelor de origine microbială a fost evidențiat de entomologul Reaumur de Geer în anul 1726 (Ainsworth, 1976). La sfârșitul secolului al XVIII-lea, păsările erau transportate la distanțe mari pentru a fi utilizate pentru controlul insectelor. La începutul secolului al XIX-lea, Darwin a pus în evidență importanța reprezentanților familiei Ichneumonidae ca factor de control natural al lepidopterelor, dăunători ai verzei. Deja în anul 1827, Hartig (Germania) sugera producerea în masă a parazitoizilor din larve parazitare pentru a fi utilizate în masă (*Ecologically based pest management: new solutions for a new century*, 1996). În anul 1835, entomologul Agostino Bassi (1773-1856) a descoperit că boala muscardină a viermilor de mătase a fost cauzată de un organism viu, foarte mic, parazit, o micromicetă care va fi numită în cele din urmă *Beauveria bassiana* în onoarea sa.

Un alt cercetător entomolog, Vincenz Kollar (Austria), a propus conceptul de „control natural” în anul 1837. În perioada anilor 1850-1887 s-au intensificat cercetările privind aplicarea metodelor de control biologic al dăunătorilor în Statele Unite ale Americii. Acest lucru a devenit necesar din cauza cultivării pe scară largă a culturilor agricole de origine europeană. Odată cu introducerea acestora, au devenit importați și dăunătorii acestora. Lipsa inamicilor naturali a fost cauza creșterii numericului populațiilor de insecte dăunătoare provocând invazii în masă. Prima aplicare cu succes a parazitoizilor pentru controlul speciei *Conotrachelus nenuphar* (Curculionidae) în SUA a fost realizată în anul 1870. Speciile din genul *Trichogramma* spp. (paraziți ai ouălor) (Trichogrammatidae) au fost aplicate în Canada, în anul 1882, pentru controlul lepidopterelor dăunătoare. Cercetătorul microbiolog Louis Pasteur (1822-1895) a fost cel care, prin realizările sale generalizate în lucrarea „*Etudes sur la mala, die des vers a soie*”, (Studii în boala viermilor de mătase), publicată în anul 1970, a contribuit semnificativ la salvarea sericiculturii franceze. Pasteur a acordat atenție deosebită patologiilor cauzate de bacterii și protozoare (Steinhaus 1956). Odată cu disponibilitatea crescândă a microscopelor, oamenii de știință au avansat în cunoașterea agenților patogeni. Cercetările infecțiilor fungice lansate de Bassi au fost continuate de o serie de alți cercetători astfel ca: Robin

(1847, 1853), Fresenius (1856, 1858), Gray (1858), Tulasnes (1863-1865), Brefeld (1870,1877), Cohn (1870), Zopf (1890), Cooke (1892), Masee (1895), Giard (1896), și Thaxter (1888, 1896-1931) (Steinhaus 1956, 1975). Ideea utilizării agenților patogeni pentru a controla insectele dăunătoare este strâns legată de numele savanților precum John Eaton LeConte (1825-1883) și Hermann August Hagen (1817-1893) în spațiul american și Ilya Ilyich Mechnikov (1845-1916) în Rusia. În legătură cu cercetările sale privind controlul cărăbușelului cerealelor *Anisoplia austriaca* (Coleoptera, Scarabaeidae), I.I. Mechnikov a descoperit bacteria *Bacillus salutarium* și micromiceta *Metarhizium anisopliae*, care sunt patogene pentru acest dăunător, și a dezvoltat metode de cultivare a agenților de control biologic pentru utilizare practică. În anul 1879 a fost publicat raportul său, în care I.I. Mechnikov a apreciat semnificația epizootiilor naturale în reducerea populațiilor de insecte, a promovat utilizarea practică de către om a agenților patogeni, în special de natură fungică, în controlul insectelor, demonstrând această posibilitate experimental. Această idee și-a găsit adepți energici în persoana altor oameni de știință, astfel ca I.M. Krasilshik și L.S. Tsenkovski. Cu toate acestea, experimentele lui I.M. Krasilshik privind „producția în masă” de culturi entomopatogene nu au primit în acel moment și în anii următori valorificarea așteptată în practica agricolă. Motivul pentru aceasta, conform lui, cercetătorului I. Rubtzov (1948), a fost faptul că I.M. Krasilshik „a subestimat factorul de variabilitate al agenților patogeni bacterieni și scăderea inevitabilă a virulenței în condiții artificiale”. Este foarte probabil ca motivul să fie și mai larg în natură: pentru a provoca o boală distructivă a uneia sau altei insecte dăunătoare prin introducerea artificială a culturilor de microorganisme patogene, este necesar să se creeze toate condițiile necesare pentru evoluția progresivă a bolii pe acel teritoriu, dar pentru aceasta este necesar să se cunoască bine toate tiparele care determină dezvoltarea patologiei în condiții naturale (Steinhaus, 1956). Alți cercetători europeni au sugerat folosirea fungilor împotriva muștelor, lăcustelor și altor insecte dăunătoare (Tanada, Kaya, 1993; Davidson, 2012). Cercetările în acest domeniu au fost continuate de cercetătorii din SUA și Franța. Odată cu lucrările lui Picard (1913), s-a trecut la extinderea cercetărilor, abordându-se atât aspectele fundamentale, cât și aplicative (taxonomie, morfologie, epizootologie, tehnici de multiplicare și aplicare etc.) (Mihalache, Pârvescu, 1980).

În anul 1898, savantul japonez Sigetane Ishiwata (1868-1941) (Aizawa 2001) descoperă bacteria, pe care o numește *Bacillus sotto*, agent cauzal al morții larvelor viermelui de mătase (Ishiwata 1901, 1905). În 1909, cercetătorul german Ernst Berliner descoperă o bacterie entomopatogenă, pe care o numește *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1915). Acest nume a fost păstrat pentru această specie până în prezent și include *B. sotto* și anumite tulpini, numite inițial *Bacillus cereus* (Beegle, Yamamoto, 1992).

Primele observații privind legătura dintre prezența poliedrelor virale și manifestarea bolii la insecte aparține autorilor Emilio Cornalia (1856) și Angelo Maestri (1856). Cercetările privind agenții virali ai bolilor la insecte iau avânt la început

tul sec. al XX-lea (von Prowazek, 1907, 1912; Escherich, Miyajima, 1911; Glaser, Chapman, 1913), atunci când patologiile de natură virală sunt clar delimitate de cele cauzate de bacterii. Cercetările anilor 1905-1911 s-au axat pe controlul biologic al speciei *Lymantria dispar* (L.) (Lepidoptera, Erebidae). Termenul de „control biologic” a fost pentru prima dată utilizat de Harry Scott Smith în anul 1919. Termenul a fost introdus în uz prin intermediul lucrărilor științifice ale renumitului savant Paul H. DeBach (1914-1993). Cercetările lansate de Berliner în 1909 au fost continuate (Mattes, 1927), fapt care a dus în cele din urmă la apariția primului produs comercial în 1938 (Beegle, Yamamoto 1992; Milner, 1994) (Davidson, 2012). Perioada anilor 1930-1940 a fost caracterizată de un avânt în cercetarea agenților de control biologic (Mihalache, Pîrvescu 1980). Prezența granulovirusurilor în larve este pentru prima dată atestată de către Andre Paillot, fapt consemnat în lucrarea sa „*L'infection chez les insectes*” (Infecția la insecte) (1933). Odată cu dezvoltarea metodelor microscopice și în special a microscopului electronic în anii 1940 și 1950, Gernot Bergold (1947) a publicat primele micrografii electronice ale baculovirusurilor (NPV) și a dezvoltat noi tehnici pentru a purifica virusurile (Benz, 1986; Arif, 2005). Un al treilea tip de virus al insectelor, acum cunoscut sub numele de cypovirus, a fost descris de Ishimori (1934) și mai târziu de Smith și Wyckoff (1950). Alte descrieri timpurii ale semnelor și simptomelor bolii probabil cauzate de viruși sunt cronicizate de Steinhaus (1975).

În perioada 1937-1963 au fost publicate peste 1200 de lucrări științifice în problema fungilor entomopatogeni (Muller-Kogler, 1965, citat în Mihalache; Pîrvescu, 1980). Mecanizarea, industrializarea și chimizarea agriculturii, elaborarea pe scară largă a pesticidelor de sinteză relativ accesibile pentru fermieri și constatarea efectelor adverse ale acestor practici accelerează cercetările fundamentale și aplicative în domeniul controlului biologic. Sunt înființate institute și laboratoare specializate în cercetarea patologiei insectelor în SUA (Universitatea Berkeley, California), Canada (Stațiunea de Combatere Biologică Sault Sainte, Ontario), Franța (Stațiunea de Combatere Biologică La Miniere, Versailles), URSS (Institutul Unional de Cercetări Științifice în Protecția Plantelor) ș.a. În teritoriul actual al Republicii Moldova, în anul 1969 a fost fondat Institutul Unional de Cercetări Științifice în Domeniul Metodelor Biologice de Protecție a Plantelor, care a devenit centrul principal de coordonare a cercetărilor în domeniul protecției biologice a plantelor în fosta URSS. Pe parcursul celor peste patruzeci de ani, instituția a suferit câteva restruc-turări, trecând prin denumirile următoare: Institutul Unional de Cercetări Științifice în domeniul Metodelor Biologice de Protecție a Plantelor (1969-1992), Institutul de Protecție Biologică a Plantelor al AȘM (1992-1999), Institutul de Cercetări pentru Protecția Plantelor al MAIA (1999-2005), actualmente încadrat în Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor. Un moment important în evoluția cercetărilor este instituirea, în anul 1955, a Comisiei Internaționale pentru Controlul Biologic împotriva Inamicilor Culturilor Agricole (*Commission Internationale de Lutte Biologique contre les Enemis des Cultures* – CILB), cunoscută actualmente ca *International Organization for Biological Control* (IOBC). În continuare au fost puse

bazele conceptului de prag economic de dăunare (Stern *et al.*, 1959). Cercetările în domeniul microorganismelor entomopatogene au cunoscut un nou avânt după anul 1962, odată cu publicarea cărții cercetătoarei Rachel Carson „*Silent Spring*”. Au fost puse bazele dezvoltării conceptului de Management Integrat al Organismelor Dăunătoare, controlul biologic fiind considerat component cheie al acestui concept. În anul 1967 este fondată Societatea de Patologie a Nevertebratelor (*Society for Invertebrate Pathology*, SIP). Începând cu anii 1970, au fost puse bazele metodelor de control biologic al dăunătorilor în cultura de bumbac, lucernă, citrice, soia etc. (Sweeteman, 1936; Stern *et al.*, 1959; Doust, 1964; Hagen, Franz, 1973; DeBach, 1974; Simmonds, Franz, Sailer, 1976; van den Bosch, Messenger, Gutierrez, 1982; Bondarenco, 1986; van Driesche, Bellows, 1996; Abrol, Shankar, 2012; Davidson, 2012). În URSS, doar în perioada anilor 1970-1983, cercetările realizate au dus la creșterea cotei parte a produselor biologice de protecție a plantelor la 30% din toate produsele de uz fitosanitar (Bondarenco, 1986). Au fost dezvoltate preparate precum Boverin, Entobacterin, Dendrobacilin, Bitoxibacilin, Lepidocid, asociate cu numele savanților V. P. Pospelov, O. I. Shvetsova, A. R. Zurabova, E. V. Talalaev, N. V. Candîbin, ș.a. (Shternshis *et al.*, 2001). Cu toate acestea, utilizarea insecticidelor chimice rămâne a fi cea mai practică metodă de combatere a insectelor dăunătoare, fiind utilizate extensiv, ignorând informațiile cu privire la riscurile majore asociate acestora. 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). Necesitatea identificării unei alternative insecticidelor chimice a stimulat interesul pentru elaborarea unor metode inofensive pentru om și mediu, intensificând cercetările științifice privind metodele de control biologic pentru cei mai periculoși dăunători agricoli. În Republica Moldova au fost aprobate Programul 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 pun accent pe utilizarea metodelor biologice de combatere a insectelor dăunătoare.

3.3.1. Agenții de control biologic aplicați împotriva coleopterelor curculionoide

Prădătorii. Investigarea impactului coleopterelor Carabidae asupra populațiilor de *Sitona lineatus* sugerează că adulții emergenți din pupe sunt mai susceptibili la atac (2,6-23,8% mortalitate) decât larvele (0,6-10,5% mortalitate) (Aeschlimann, 1980; Hamon *et al.*, 1990). Coleopterele carabide sunt mai active la suprafața solului, prin urmare, larvele pot evita pericolul, datorită habitatului subteran (Hunter, 2001). Perioadele de activitate maximă a carabidelor corespund cu momentul de vârf al apariției insectelor adulte noi, la sfârșitul lunii iulie – mij-

locul lunii august (Hamon *et al.*, 1990). În câmpurile din Marea Britanie infestate cu *S. lineatus* au fost identificate densități mari ale mai multor specii de coleoptere carabide, printre care *Pterostichus madidus* F., *Pt. melanarius* Ill., *Harpalus rufipes* DeG. și *Agonum dorsale* Pontoppidian (Hamon *et al.* 1990). În Polonia, *Pterostichus cupreus* L. a fost activ în perioada de ovipoziție a dăunătorului *S. lineatus*, în timp ce *Bembidion properans* Steph. (Coleoptera, Carabidae) a fost mai activ în iunie, fiind un prădător atât al ouălor, cât și al larvelor emergente (Ropek, Jaworska, 1994). Prădători ai larvelor speciei *Hypera postica* sunt coccinelidele, ploșnițele din familia Nabidae, unele specii din familia Chrysopidae (Neuroptera) și de asemenea unii păianjeni (Ouayogode, Davis, 1981). În studiile efectuate în Iowa, SUA, au fost atestate densități sporite ale adulților speciei *Coleomegilla maculata* De Geer (Coleoptera, Coccinellidae) în câmpurile infestate cu specia *H. postica* (Giles, Obrycki, DeGooyer, 1994). Experiențele realizate în laborator, folosind coleoptere carabide, au stabilit că un gândac ar putea consuma în medie 20 de insecte adulte pe zi, deși în condiții de câmp, doar una sau două insecte se așteaptă să fie consumate zilnic. Conform unor estimări, coleopterele carabide ar reduce populațiile speciei *S. lineatus* cu 30% și mai mult (Hamon *et al.*, 1990). Studiile din ultimii ani au atestat faptul că, în condiții de laborator, specia *Pterostichus melanarius* Ill. (Coleoptera, Carabidae) consumă preferențial adulți din specia *S. lineatus*, iar specia *Bembidion quadrimaculatum* L. (Coleoptera, Carabidae) consumă ouăle (Vankosky, Carcamo, Dossall, 2011). În Republica Moldova, în câmpurile de lucernă, populate de specia *Sitona lineatus*, au fost atestate densități crescute ale prădătorilor *Harpalus distinguendus* (Duftschmid) și *H. rufipes* (De Geer) (Coleoptera, Carabidae) (Munteanu *et al.*, 2014a).

Parazitoizii. Mai multe specii de parazitoizi pot avea un impact în controlul populațiilor speciei *Sitona lineatus* în Europa și Africa de Nord, inclusiv *Allurus muricatus* Hal., *Microctonus aethioides* Loan, *Perilitus rutilus* Nees și *Pygostolus falcatus* Nees (Hymenoptera, Braconidae) (Aeschlimann, 1980). Parazitul ouălor *Patasson lameerei* Deb. (Hymenoptera, Mymaridae), răspândit în sudul Europei (Aeschlimann, 1980), atacă ouăle nemelanizate expuse pe suprafața solului (Schotzko, O'Keefe, 1986b). Ouăle și adulții sunt obiectivele principale ale parazitoizilor himenoptere, deoarece larvele sunt adăpostite de nodozitățile rădăcinilor (Aeschlimann, 1980; Hamon *et al.*, 1990). Specia *Hypera postica* este parazitată de *Microctonus aethioides*, *Bathyplectes anurus* (Thomson) (Ichneumonidae), *B. curculionis* (Thomson) și *Oomyzus incertus* Ratzeburg (Eulophidae). În Germania, în câmpurile de trifoi cu densități sporite ale speciei *Protapion apricans*, cea mai răspândită specie de parazitoid a fost *Spintherus dubius* Nees (Hymenoptera, Pteromalidae) (Kruess, Tschardtke, 1994). În Suedia, cele mai numeroase au fost speciile de parazitoizi *Spintherus dubius* Nees, *Triaspis caudata* Nees și *Triaspis obsurella* Nees (Lundin *et al.*, 2012). Cercetările în acest domeniu din Republica Moldova au identificat că pe *Sitona* spp., *Anthrenomus pomorum* (L.), *Byctiscus betulae* (L.), *Stereonychus fraxini* (Deg.), *Hypera postica* (Gyll.) și *Lignyodes bischoffi* (Bl.) (Coleoptera, Curculionidae) parazitează reprezentanți ai familiilor: 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* (Hymenoptera, Braconidae), iar ouăle acestuia sunt parazitare de *Anaphes diana* (Mymaridae). Din larvele speciei *Hypera postica* au fost izolați ectoparazitul solitar *Bathyplectes curculionis* Thomson (Hymenoptera, Ichneumonidae) și endoparazitul *Tetrastichus incertus* Ratzeburg (Hymenoptera, Eulophidae), iar adulții sunt paraziți de speciile *Microctonus aethioides* Loan, *Perilitus rutilus* (Braconidae), *Camogaster exiqua* Meigen (Diptera, Tachinidae) (Poiras, 2006).

Nematozii. În Europa au avut succes studiile privind combaterea speciei *Sitona lineatus*, folosind nematozi entomopatogeni. După expunerea timp de șase zile la *Steinernema carpocapsae* Weiser, *Steinernema feltiae* Filipjev (Rhabditida, Steinernematidae) sau *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar (Rhabditida, Heterorhabditidae), mortalitatea a atins 100% (Jaworska, 1998). Expunerea insectelor adulte la *H. bacteriophora*, cu o rată de 300 de nematozi pe insectă, a determinat o mortalitate de 50% după șase zile și 100% după 14 zile (Wiech, Jaworska, 1990). Indivizii juvenili ai speciei *H. bacteriophora* pot penetra cuticula gazdelor (Bedding, Molyneux, 1982), explicând succesul speciei în infectarea insectelor adulte. S-a remarcat faptul că insectele hrănite cu *V. faba* au fost mai puțin predispuse la infecții decât cele hrănite cu *P. sativum*. Mortalitatea larvelor terțiare hrănite cu *Pisum sativum* a atins 100%, în patru zile (Jaworska, Ropek, 1994). Reproducerea nematodului a fost mai intensă în cazul hrănirii insectelor cu fasole. Studiile au evidențiat că speciile *Steinernema carpocapsae*, *S. feltiae* și *H. bacteriophora* sunt eficiente în controlul biologic al dăunătorului *Sitona lineatus* (Jaworska, 1998), iar *S. carpocapsae* și *H. indica* sunt eficiente în cazul speciei *Hypera postica* (Shah, Azmi, Tyagi, 2011; Poinar, Grewal, 2012).

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 (Georgis, Gaugler, 1991; Bilgrami, Gaugler, 2007). 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.

Insecticidele microbiene sau biopesticidele pe bază de virusuri bacterii sau ciuperci microscopice sunt o alternativă utilizării inamicilor naturali prezentați mai sus, combinând avantajele atât ale metodelor de control biologic, cât și ale 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.

Virusurile. Printre virusurile cel mai frecvent utilizate ca agenți pentru combaterea insectelor evidențiem Virusul Poliedrozei Nucleare (VPN) (Federici, 1993). Majoritatea VPN infectează lepidopterele, dar au fost izolate, de asemenea, din reprezentanții ordinelor Coleoptera, Diptera, Hymenoptera ș.a. Utilizarea biopesticidelor virale este limitată de acțiunea lentă, lipsa semnelor externe ale larvelor în primele etape de propagare ale virusului și costul preparatelor, deoarece acestea se înmulțesc numai în celulele vii. În Republica Moldova, preparatele virale elaborate de asemenea, sunt orientate spre controlul populațiilor de lepidoptere dăunătoare. Recent a fost elaborată biotehnologia producerii și aplicării preparatului baculoviral Virin-HSP pentru combaterea dăunătorului *Helicoverpa armigera*. Au fost elaborate procedeele tehnologice de producere și aplicare a preparatelor microbiologice și înaintată documentația tehnologică pentru înregistrarea de stat (regulamentele tehnologice de producere, indicațiile tehnice și recomandările metodice de aplicare) a preparatelor biologice: în baza virusurilor entomopatogene – preparatul baculoviral Virin-HS-P, în baza virusului poliedrozei nucleare, pentru combaterea dăunătorului buha fructificațiilor (*H. armigera*), ceea ce permite combaterea organismelor dăunătoare în sistemele de agricultură ecologică și intensivă (Voloșciuc, 2015; Voloșciuc, Josu, 2016, 2017).

Bacteriile. 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*. Vătămările 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. Rezultate promițătoare au fost înregistrate în cazul evaluării activității insecticide a preparatelor microbiene Lepidocide P și SP Bankole împotriva speciei *Protapion apricans* (Balandina, 2007). 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 (Munteanu *et al.*, 2014b). Tulpina autohtonă de bacterii *Bacillus thuringiensis*, CNMN-BB03, posedă o activitate insecticidă pronunțată asupra coleopterelor curculionide *Neocoenorhinidius pauxillus*, *Phyllobius oblongus* și *Sitona lineatus*, cauzând o mortalitate de 80,0%, 73,3% și 66,6% respectiv (Munteanu *et al.*, 2011; Munteanu *et al.*, 2013). De asemenea, se efectuează cercetări ample privind activitatea insecticidă a tulpinilor de *Bt* contra diferitor dăunători (Moldovan, Toderas, Munteanu-Molotievskiy, 2017; Moldovan, Munteanu-Molotievskiy, Toderas, 2018; Moldovan, 2019), inclusiv specii de curculionide, însă datele privind activitatea insecticidă a tulpinilor native de *Bt*, asupra speciilor incluse în studiul de față, sunt limitate. Pe lângă o serie de avantaje obținute prin folosirea biopesticidelor bacteriene, 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.

Patogeni recombi-nați genetic. Au fost întreprinse încercări de a controla populațiile speciei *Sitona lineatus* prin modificarea genetică a *Rhizobium leguminosarum*, introducând gene ale *Bt* subsp. *tenebrionis*, care exprimă endotoxi-

ne cu activitate insecticidă (Bezdicsek *et al.*, 1994; Skot, Timms, Mytton, 1994; Quinn, Bezdicsek, 1996). Exprimarea genei Cry3 în *R. leguminosarum* a cauzat mortalitatea dăunătorului *S. lineatus*, scăderea ratei de dezvoltare a insectelor și a redus distrugerea nodozităților (Bezdicsek *et al.*, 1994; Quinn, Bezdicsek, 1996). Competitivitatea tulpinilor de *Rhizobium* spp. ce conțin gene Cry3, comparativ cu tulpinile de *Rhizobium* spp. nemodificate, precum și efectul general al nodozităților modificate asupra biomasei plantelor, poate limita utilizarea inserțiilor genei Cry3 în programele de combatere a gărgăriței frunzelor de mazăre. S-a constatat că, la introducerea în sol a bacteriilor *Rhizobium* modificate, acestea au ocupat de la 40 la 97% din nodozitățile rădăcinilor, sugerând că tulpinile modificate sunt competitive (Bezdicsek *et al.*, 1994). Distrugerea nodozităților plantelor de larvele speciei *S. lineatus* a scăzut în prezența bacteriilor modificate, însă biomasa totală a plantelor a fost semnificativ mai crescută atunci când plantele au fost inoculate cu tulpina de tip sălbatic (Bezdicsek *et al.*, 1994). Prin urmare, folosirea pe scară largă a acestei strategii de management necesită investigații suplimentare pentru a înțelege mai bine natura relației simbiotice între *R. leguminosarum* modificată și plantele gazdă. Pentru a crea soiuri de lucernă rezistente la *Hypera postica*, trei genotipuri comerciale de lucernă, Km-27, KK 14 și Syn 18, au fost transformate cu tulpinile de *Agrobacterium* GV101, LBA4404 și AGL01. Toate tulpinile conțineau plasmide recombinante, având integrate gena Cry3A, promotorul CaM-V35S, precum și gena marker npt77. Rezultatele obținute au indicat integrarea cu succes a genei țintă în genomul liniilor transgenice primare. Liniile de lucernă transgenică au manifestat rezistența la atacul larvelor (73-90% mortalitate) (Tohidfar *et al.*, 2013).

Fungii. Mai multe specii fungice prezintă potențial de a fi utilizate în controlul populațiilor de *Sitona lineatus* inclusiv *Metarhizium flavoviride* Metschn., *M. anisopliae* Metschn. (Hypocreales, Clavicipitaceae), *Beauveria bassiana* Vuilleman, *Paecilomyces farinosus* Holmsk. și *P. fumosoroseus* Wize. (Eurotiales, Cordycipitaceae) (Hans, 1959; Muller-Kogler, Stein, 1970; Poprawski, Marchal, Robert, 1985). Eficacitatea micromicetelor entomopatogene variază în funcție de virulența tulpinii fungice, concentrația acesteia în sol și stadiul insectei în momentul de atac (Poprawski, Marchal, Robert, 1985; Verkleij, van Amelsvoort, Smits, 1992). Studiile întreprinse privind activitatea insecticidă a cinci specii de fungi (*Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride*, *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces farinosus* și *P. fumosoroseus*) asupra ouălor, larvelor și pupelor de *Sitona lineatus* au atestat că ouăle au fost sensibile doar la aplicarea în concentrații mari a speciei *M. flavoviride*. Larvele nou eclozate au fost sensibile la toate cele cinci specii fungice (Poprawski, Marchal, Robert, 1985). Într-un studiu privind eficacitatea micromicetei *Beauveria bassiana* în Europa Centrală, s-a constatat că, la inocularea solului cu 10^7 cm³ de conidii, numărul de adulți emergenți a fost cu 48% mai mic decât numărul de insecte emergente în lotul de control. Longevitatea adulților infectați cu *B. bassiana* a scăzut cu creșterea severității infecției, iar aproximativ 50% dintre adulții infectați au murit în termen de 10 zile de la infecție (Muller-Kogler, Stein, 1970). Aceste rezultate sugerează

rează faptul că prezența ciupercilor microscopice entomopatogene în momentul de incubație poate reduce în mod semnificativ populațiile speciei *Sitona lineatus*. Un studiu mai recent menționează tulpina *Beauveria bassiana* 238, activă împotriva speciei *S. lineatus* (Riedel, Steenberg, 1998).

Pentru controlul biologic al speciilor din genul *Hypera* pot fi folosite speciile de micromicete *Beauveria bassiana* (Hypocreales) (Hedlund, Pass, 1968) și *Zoophthora phytonomi* (diviziunea Zygomycotina), raportată pentru prima dată în America de Nord în 1973, în Ontario, Canada (Harcourt *et al.*, 1974). O specie similară cu *Z. phytonomi* a fost identificată în populațiile de *H. postica* din Europa. Într-un studiu din anul 2014 a fost evaluată activitatea insecticidă a 5 specii de micromicete *Beauveria bassiana* Vuilleman, *Metarhizium anisopliae* Met-schn. (Hypocreales, Clavicipitaceae), *Clonostachys rosea* (Link) Schroers, Samuels, Seifert & W. Gams (Hypocreales, *Bionectriaceae*) și *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Zare & W. Gams împotriva exemplarelor adulte din specia *H. postica*. Tulpina de *B. bassiana* a manifestat cea mai înaltă activitate insecticidă (Mustafa, Lazgeen, Abdullah, 2014). De asemenea, într-un studiu recent au fost izolate 7 tulpini de *Beauveria bassiana* și 1 tulpină de *B. pseudobassiana* S.A. Rehner și R.A. Humber (Hypocreales, *Cordycipitaceae*). Tulpinile au cauzat între 81-97% mortalitate, fiind testate pe larve și 36-92% atunci când au fost testate pe adulți (Yucel *et al.*, 2018).

Ținând cont de cele expuse mai sus privind preferințele trofice, habitatul criptic al larvelor, daunele provocate de speciile *S. lineatus*, *H. postica* și *P. apricans*, agenții potențiali de control biologic al acestor dăunători și mecanismele particulare de acțiune, putem concluziona că ciupercile microscopice entomopatogene prezintă perspective promițătoare de aplicare în calitate de agenți de control biologic, deoarece ele sunt capabile de a infecta adulții, astfel împiedicând depunerea ouălor și daunele provocate de larve. Pe lângă aceasta, ciupercile microscopice entomopatogene prezintă un șir de avantaje și anume: eficiența înaltă, siguranța pentru sănătatea omului, minimizarea reziduurilor de pesticide în produsele alimentare, siguranța pentru speciile nevizate, astfel promovând biodiversitatea, managementul rezistenței dăunătorilor, potențialul antibacterian și antifungic.

3.4. Biotehnologia producerii și aplicării preparatelor entomopatogene fungice

Pe parcursul a mii de ani, co-evoluția insectelor și ciupercilor microscopice a favorizat apariția speciilor de entomopatojeni fungici. Atenția crescândă a societății umane pentru riscurile utilizării pesticidelor de sinteză, apariția unui număr mare de specii rezistente au constituit premisa pentru reorientarea cercetărilor științifice spre valorificarea mecanismelor naturale de control al dăunătorilor. Studiile care vizează utilizarea preparatelor entomopatogene pe bază de ciuperci microscopice pentru controlul biologic al dăunătorilor confirmă aplicabilitatea și importanța acestui grup de microorganisme (Singh, Rainab, Singha, 2017). Pen-

tru a elabora agenți de control biologic pe baza micromicetelor entomopatogene, este necesar de a înțelege biologia și mecanismul de acțiune ale tulpinilor fungice izolate. De asemenea urmează a fi luate în calcul eficiența și costul pentru a le compara cu pesticidele chimice.

Strategia optimă este de a utiliza entomopatogenii fungici în scopul reducerii efectivului numeric al populației de dăunători sub pragul economic de dăunare. Aceasta va reduce cantitatea de spori introduși în mediul ambiant, va scădea costul unei aplicări și va maximiza beneficiile. Cunoașterea biologiei dăunătorilor permite de a planifica perioadele de aplicare și numărul de aplicări necesare, astfel oferind date necesare pentru analiza cost-eficiență (Kiewnick, 2007).

Pentru elaborarea formulei preparatului este important de a cunoaște care tip de spori posedă infectivitate maximă, conidiile sau blastosporii și de a decide care va fi tipul de cultivare, la suprafață sau în profunzime. Preparatele pot fi formulate pe mai multe căi (Seaman, 1990; Mollet, Grubenmann, 2001; Gasic, Tanovic, 2013) (figura 3.1).

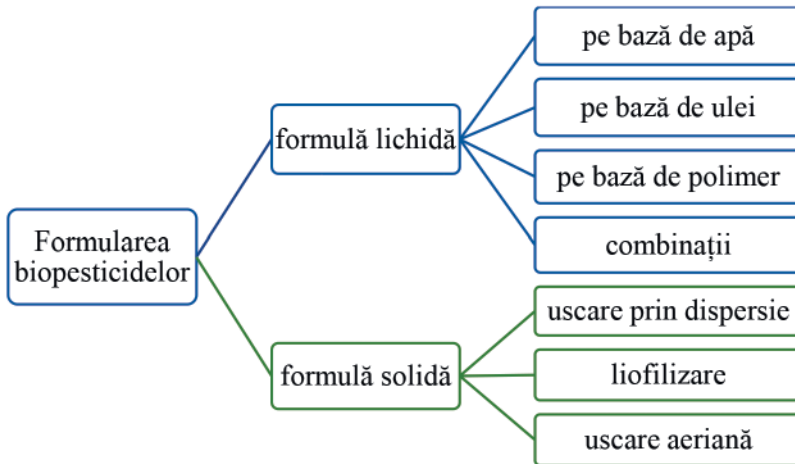


Fig. 3.1. Principalele tipuri de formule ale preparatelor entomopatogene fungice

Etapa de formulare ține cont de datele privind creșterea și dezvoltarea tulpinii în diferite condiții ale mediului ambiant și presupune selectarea aditivilor care vor fi adăugați la spori fungici, asigurând stabilitatea produsului pe durata păstrării, protecția tulpinii de acțiunea factorilor nefavorabili ai mediului, sporirea eficacității produsului prin favorizarea interacțiunii sporilor cu cuticula insectelor, aplicarea simplificată a produsului cu utilizarea echipamentelor standard.

Tabelul 3.1 prezintă formulele biopesticidelor cel mai des aplicate și disponibile pe piață, ingredientele utilizate, avantajele și dezavantajele acestora (Tadros, 2005; Knowles, 2008).

Tabelul 3.1. Formulele biopesticidelor

Nr. d/o	Tipul de formulare	Ingrediente	Mod de aplicare	Avantaje	Dezavantaje
1.	Praf (DP)	1. agent de control (10%), 2. pulbere minerală solidă (talc, argilă etc.) măcinată fin, cu dimensiuni ale particulelor cuprinse între 50-100 μm , 3. agenți UV protectori și materii adezive	direct către țintă, mecanic sau manual	ușor de produs	risc de inhalare
2.	Prafuri pentru tratarea semintelor (DS)	1. agent activ, 2. purtător, pulbere, 3. factorul de adeziune	aplicat semințelor prin amestecare	protecția agentului de control	risc de inhalare în timpul păstrării
3.	Granule (GR) (100-1000 μm , sau microgranule 100-600 μm)	1. agent activ 5-20%, 2. materiale minerale (caolin, silicagel, amidon, polimeri, îngrășăminte uscate și reziduuri de plante măcinate)	aplicate pe sol pentru a controla insectele care trăiesc în sol sau pentru absorbția de plante prin rădăcină	ușor de produs, eliberează treptat agentul de control	este nevoie de umiditate suficientă în sol
4.	Prafuri umectabile (WP)	1. ingredient activ, 2. agent tensioactiv, 3. agenți de umectare și dispersie, 4. umpluturi inerte	aplicat după suspensia în apă utilizând echipament standard	stabilitatea îndelungată, buna amestecare cu apa și aplicarea convenabilă folosind echipamente de pulverizare	pot ridica probleme grave de sănătate și siguranță pentru producători din cauza poluării, inhalării iritație a pielii și a ochilor.
5.	Granule dispersabile în apă (WG) (alternativa prafurilor)	1. ingredient activ, 2. agent tensioactiv, 3. agenți de umectare și de dispersie, 4. umpluturi inerte	aplicat după suspensia în apă utilizând echipament standard	nu generează praf și cu o stabilitate bună la depozitare, utilizatori	de obicei, sunt mai scumpe decât tipurile mai vechi de formulări (prafuri, pulberi umede)

Nr. d/o	Tipul de formulare	Ingrediente	Mod de aplicare	Avantaje	Dezavantaje
6.	Emulsii (faza dispersă 0.1-10 μm , apă în ulei sau ulei în apă)	1. agent activ, 2. emulsifiant	conceput pentru a fi amestecat cu apă înainte de utilizare, poate fi apli- cat folosind echipament de pulveri- zare	protejează agentul ac- tiv, ajută la aderarea la suprafața cuticulei	stabilitatea inferioară și fitotoxicitate ocasionale
7.	Suspensie concentra- tă (SC) (ingredient solid activ, 1-10 μm , dispersat în faza lichidă)	1. agent activ, 2. agent de umecta- re/dispersare, 3. agent de con- centrare, în timpul procesului de măci- nare, ingredientele inerte adsorbite pe suprafețele parti- culelor împiedică reagregarea parti- culelor mici	poate fi aplicat fo- losind echi- pament de pulverizare	bazate pe apă, pot fi ușor manipulate, sunt sigure pentru mediu și operator	
8.	Dispersii în ulei (OD)	1. agent activ, 2. ulei vegetal	urmează a fi dilat, poa- te fi aplicat cu utilizarea echipamen- telor stan- dard prin pulverizare	oferă posi- bilitatea de a formula ingrediente active sensi- bile la apă și o capacitate de a utiliza un fluid adju- vant în loc de apă, care poate spori eficacitatea controlului dăunătorilor.	ingredientul urmează a fi selectat rigu- ros

Nr. d/o	Tipul de formulare	Ingrediente	Mod de aplicare	Avantaje	Dezavantaje
9.	Suspo-emulsii (SE) (amestec de concentrat de suspensie și emulsie)	1. agent activ, 2. agent de dispersare, 3. agent de emulsifiere	poate fi pulverizat	combină avantajele suspensiilor și aplicării uleiurilor	este extrem de complicat de formulat
10.	Capsule în suspensie (CS) Agent activ microincapsulat în suspensie apoasă	1. ingredient activ, 2. capsulă din gelatină, amidon, celuloză și alți polimeri 3. agenți tensioactivi, 4. agenți de îngroșare	urmează a fi diluat și poate fi pulverizat	agentul de control este protejat de condițiile extreme de mediu (radiații uv, temperatură), iar stabilitatea reziduală a acestuia este îmbunătățită datorită eliberării lente (controlate)	cost ridicat, complexitate de formulare
11.	Lichide cu volum mic (UL)	1. concentrații înalte ale agentului de control, 2. agenți tensioactivi, 3. agenți de control ai drift-ului		ușor de transportat și aplicat	nu pot fi diluate, urmează a fi produse în cantități mari

(Surse: Knowles, 2005, 2006; Gasic, Tanovic, 2013)

Cele mai frecvent utilizate formule pentru preparatele entomopatogene fungice sunt prezentate în tabelul de mai jos (tabelul 3.2).

După ce formula preparatului este elaborată, aceasta urmează a fi testată în câmp pentru a confirma eficacitatea. Impactul tulpinii fungice asupra speciilor non-țintă este deseori o consecință negativă, imposibil de a fi prognozat, determinată doar după aplicarea preparatului în condiții de teren agricol. Studiile întreprinse până la moment au constatat foarte puține cazuri de afectare a speciilor non-țintă. Dacă eficacitatea preparatului este confirmată, urmează producția în masă. La această etapă se studiază posibilitatea de a reduce costurile de producție asociate multiplicării microorganismelor sau aditivilor utilizați în formula preparatului. Sunt publicate numeroase studii cu privire la producerea fungilor pe substraturi solide (Singh, Rainab, Singha, 2017).

Tabelul 3.2. Biopesticide fungice

Nr.	Specia fungică	Produs	Formulă	Durata de păstrare
1.	<i>Beauveria bassiana</i>	BotaniGard, Naturalis-L, Mycotrol, Bio-Power, Beauverin, Boverol, Proecol	WP, SC	1 an ($\leq 20^{\circ}\text{C}$)
2.	<i>Beauveria brongniartii</i>	Betel, Schweizer Beauveria	WP	1 an ($\leq 2^{\circ}\text{C}$)
3.	<i>Lecanicillium lecani</i>	Mycotal, Bio-Catch, Vertalec	WP	0,5 an ($\leq 4^{\circ}\text{C}$)
4.	<i>Metharizium anisopliae</i>	Bio-Catch -M	WD	1 an ($\leq 4^{\circ}\text{C}$)
		Green Muscle, BioCane	G	
5.	<i>Metarhizium flavoviride</i> var. <i>flavoviride</i>	BioGreen	WP	0,5 an ($\leq 4^{\circ}\text{C}$)
6.	<i>Isaria fumosorosea</i>	Preferal, Priority, Futureco, No-Fly	WP, WDG	0,5 an ($\leq 4^{\circ}\text{C}$)

(Sursa: Skinner, Parker, Kim, 2014)

Fungii persistă în mediul înconjurător sub formă de spori, focarele de boli fiind declanșate de condiții speciale de temperatură, umiditate și densitatea populației de insecte. Populațiile de dăunători depășesc, în general, pragul economic de daună până la apariția în mod natural a unui focar de boală. În consecință, obiectivul introducerii agenților patogeni ai insectelor în populațiile de dăunători este de a induce focarele de boli înainte ca populația să atingă un prag economic de daună. Există patru tactici diferite de utilizare a agenților patogeni în controlul insectelor: controlul biologic clasic, introducerea augmentativă, introducerea inundativă și manipularea de mediu.

În controlul biologic clasic, un agent patogen (de obicei local) este introdus în populația dăunătorilor în una sau câteva locații geografice. Agentul patogen se reproduce în populația țintă a dăunătorilor și devine endemic în câțiva ani, reducând permanent nivelul de infestare a dăunătorilor la un prag inferior pragului economic de daună și apoi având drept scop menținerea acestui nivel.

O a doua tactică este augmentatarea inoculativă. În acest caz, agenții patogeni sunt introduși periodic în populațiile în care aceștia deja există pentru a spori nivelul de infecție. Drept rezultat, focarul de boală apare mai devreme decât în condiții obișnuite, reducând astfel mărimea populației dăunătorilor sub pragul economic. Cu această abordare, o singură introducere nu poate constitui o măsură de control al dăunătorilor, fiind necesară introducerea repetată a patogenului, la diferite intervale de timp (câțiva ani, anual sau sezonier).

Cea mai frecvent utilizată tactică pentru controlul insectelor cu agenți patogeni este augmentarea inundativă a agentului patogen în populația de dăunători, cauzând

niveluri înalte ale mortalității. În acest caz este vorba de utilizarea termenului de insecticid microbian. Agentul patogen se aplică după necesitate pentru a menține populația dăunătorilor sub pragul economic de daună. De obicei, această tactică necesită mai puține aplicații decât un pesticid chimic cu spectru larg de acțiune, deoarece agentul patogen este mult mai specific decât majoritatea substanțelor chimice și, prin urmare, nu afectează alți inamici naturali ai dăunătorului. Insecticidele microbiene au primit cea mai mare atenție din partea cercetătorilor, deoarece s-a dovedit a fi cea mai de succes strategie pentru combaterea dăunătorilor și pentru asigurarea profitului economic.

Managementul mediului reprezintă o tactică, în care este îmbunătățită eficiența inamicilor naturali ai insectelor deja existenți în ecosistem, prin ameliorarea factorilor de mediu favorabili dezvoltării acestora. Această abordare este mai des utilizată în cadrul agriculturii ecologice și agriculturii sustenabile, decât în sistemele agricole intensive. Cu toate acestea, practicile agricole (de irigare, recoltare, cultivare) pot influența eficiența metodei (Federici, 1996).

4

**CERCETĂRI PRIVIND DEZVOLTAREA
AGENȚILOR FUNGICI DE CONTROL BIOLOGIC
AL COLEOPTERELOR DĂUNĂTOARE****4.1. Izolarea și identificarea noilor tulpini fungice**

Cercetările prezentate în acest subcapitol au urmărit caracterizarea microflorei fungice a coleopterelor curculionoide incluse în studiu. Au fost investigate modalitățile de izolare și identificare a tulpinilor native de micromicete cu potențial entomopatogen și optimizarea procedurilor de obținere a agenților de control biologic. În acest scop au fost utilizate două metode de izolare a micromicetelor:

- 1) izolarea fungilor din exemplare de insecte fără semne de infecție fungică;
- 2) izolarea directă a fungilor din exemplare de insecte cu semne de infecție fungică.

În total au fost izolate 55 de tulpini fungice dintre care 42 de tulpini fungice au fost izolate din exemplare fără semne de micoză, iar 13 tulpini fungice au fost izolate prin recoltare directă din exemplare cu semne de micoză. Tulpinile de micromicete izolate din exemplare de insecte vii au fost identificate folosind metodele molecular-genetice iar cele izolate din exemplare cu semne de infecție au fost identificate morfologic.

Studiile comparative ale secvențierilor genelor ARNr oferă posibilitatea de a evidenția relațiile filogenetice ale diferitor grupuri taxonomice (Woese, Olsen, 1986; Medlin *et al.*, 1988; Jorgensen, Cluster, 1989). Genele ce codifică ARNr a subunităților mici ribozomale (ARNr 18S) sunt conservative și evoluează relativ lent, fiind utile în studiul organismelor îndepărtate filogenetic. Regiunile ITS (*Internal Transcribed Spacer* – Spațiator Intern Transcris) evoluează mult mai rapid și pot varia în cadrul speciilor unui gen sau în cadrul populațiilor (White *et al.*, 1990). În ultimii 15 ani, regiunea ITS a ADN-ului nuclear a fost utilizată pentru analiza diversității fungice în probele din mediu. Recent, regiunea ITS a fost selectată în calitate de marker oficial pentru barcodarea ADN-ului fungic (*Deliberation of 37 mycologists from 12 countries at the Smithsonian's Conservation and Research Centre, Front Royal, Virginia, 2007*) (Bellemain *et al.*, 2010). Identificarea exactă a agenților de control biologic este un pas important pentru elaborarea programelor de control biologic al dăunătorilor. Ca urmare a studiilor filogenetice moleculare, au fost realizate modificări considerabile în clasificarea fungilor. Utilizarea metodelor molecular-genetice a permis de a reuni formele sexuate (teleomorfe) de formele asexuate (anamorfe) ale aceleași specii, care mult timp au fost considerate specii diferite și a permis reclassificarea speciilor de micromicete entomopatogene în încrengătura Ascomycota. Studiul filogenetic este de asemenea important, deoarece permite de a prezice trăsăturile comune ale speciilor înrudite, inclusiv spectrul de gazde.

Identificarea tulpinilor de fungi în baza succesiunilor nucleotidice. În rezultatul analizei BLAST a succesiunilor nucleotidice parțiale ale genei ARNr 18S (NCBI GenBank) și reconstituirii arborelui filogenetic în microflora fungică a spe-

ciilor *Sitona lineatus*, *Hypera postica* și *Protapion apricans*, au fost identificați 17 reprezentanți din clasa Dothideomycetes, 3 din ordinul Dothideales, 5 din ordinul Capnodiales și 9 din ordinul Pleosporales; 12 reprezentanți din clasa Sordariomycetes, 1 din ordinul Sordariales, 1 din ordinul Xylariales și 10 din ordinul Hypocreales; 5 reprezentanți din clasa Eurotiomycetes, ordinul Eurotiales, 4 reprezentanți din clasa Saccharomycetes, ordinul Saccharomycetales, doi reprezentanți din ordinul Mucorales și câte 1 reprezentant din ordinele Sporidiobolales și Tremellales.

Ca rezultat al analizei BLAST și analizei filogenetice în baza succesiunii nucleotidice a regiunii ITS, trei tulpini (izolate din corpul insectei *S. lineatus*) au fost identificate ca *Beauveria bassiana* prezentând 100% omologie în secvența nucleotidică a regiunii ITS (figura 4.1). Ca rezultat al analizei filogenetice, tulpina L5/6 a fost identificată ca *Isaria fumosorosea* cu o similaritate de 99% (figura 4.2).

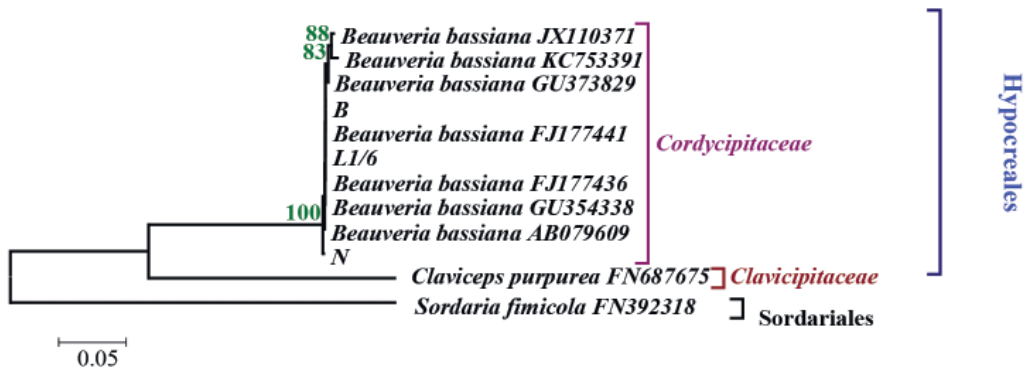


Fig. 4.1. Relațiile filogenetice ale tulpinilor B, N și L1/6 (*B. bassiana*) (orig.)

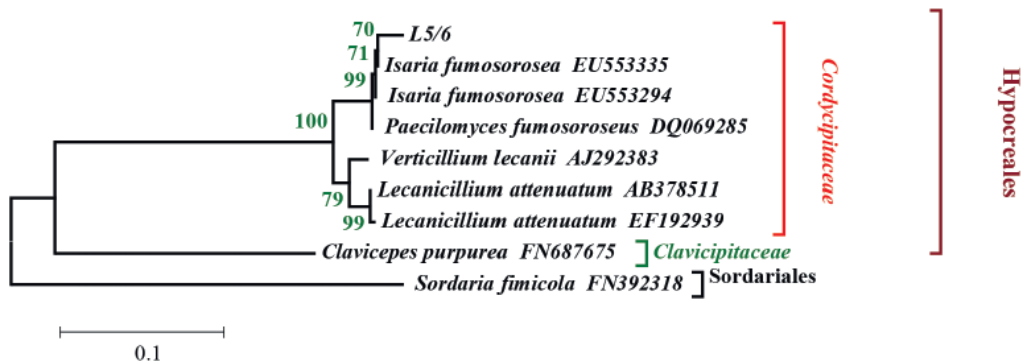


Fig. 4.2. Arborele filogenetic reconstruit al tulpinii L5/6 (*I. fumosorosea*) (orig.)

Identificarea tulpinilor fungice în baza caracterelor morfologice. În urma izolării tulpinilor fungice din corpul insectelor cu semne vizibile de micoză, au fost evidențiate 12 tulpini morfologic similare cu *Beauveria* spp. și o tulpină similară cu *Isaria* sp. (figurile 4.3 și 4.4).

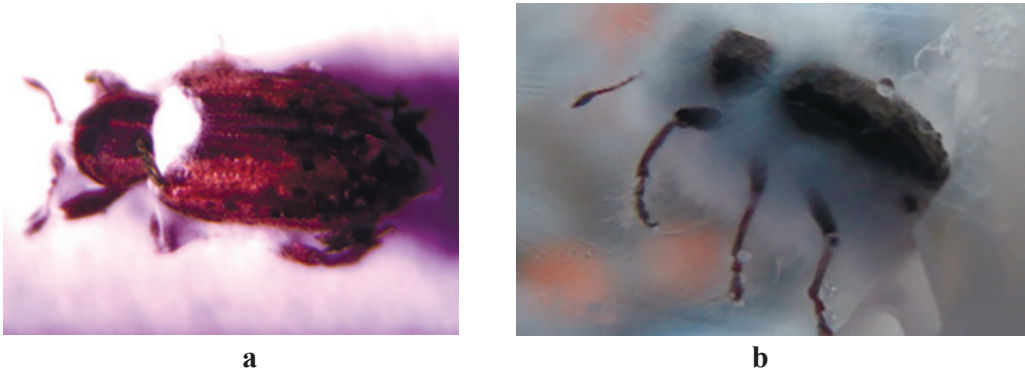


Fig. 4.3. Exemplare de insecte cu semne de micoză (orig. A. Moldovan)
a - *H. postica*, b - *S. lineatus*

Ulterior, tulpinile fungice izolate au fost reinoculate în cultură pură și au fost identificate folosind chei dihotomice de determinare ca *Beauveria* spp. și *Isaria* sp.

Următoarele caracteristici morfologice au fost folosite pentru identificare (Humber, 2012):

1. sporii, hifele și alte structuri fungice sunt vizibile la suprafața insectei gazdă; (2)
2. pe suprafața corpului insectei gazdă se observă structuri lungi macroscopice; (3)
3. pe miceliul aerian dezvoltat la suprafața corpului insectei gazdă se formează conidii; (4)
4. Conidiile se formează în lanțuri scurte sau lungi; (5)
- 4a. Conidiile sunt produse câte una, pe denticule separate, aparte pe fiecare celulă conidiogenă, sau produse pe multe denticule separate pe fiecare celulă conidiogenă sau, în grupuri mici; (7)
5. celulele conidiogene au baza umflată și gâtul lung, se formează câte una sau în grupuri, lanțurile de conidii deseori sunt lungi și divergente (atunci când se formează pe grupuri de celule conidiogene);

Paecilomyces (Isaria)

7a. celulele conidiogene produc câteva sau mai multe conidii, fiecare formată pe denticule separate; (8)

8. celulele conidiogene au un apex denticulat extins, (apexul în creștere, formează în mod repetat conidii și se ramifică, sau crește la baza conidiei nou formate).

Beauveria

Pentru comparație au fost utilizate tulpinile de *Beauveria bassiana* L1/6, B și N, și *Isaria fumosorosea* L5/6 identificate anterior, folosind metodele molecular-genetice.

Șapte dintre tulpini au fost izolate din corpul insectelor din specia *S. lineatus*, iar șase din corpul insectelor din specia *H. postica* (tabelul 4.1). Cercetările ulterioare vor viza virulența acestor tulpini. Acele tulpini care vor prezenta activitate insecticidă promițătoare pentru a fi aplicate în calitate de agenți de control biologic vor fi identificate la nivel de specie cu utilizarea metodelor molecular-genetice.

Tabelul 4.1. Tulpinile de fungi izolate direct de pe insecte, cu semne vizibile de infecție fungică

Nr. d/o	Insecta gazdă	Tulpina fungică	Identificare morfologică
1	<i>Sitona lineatus</i>	Cg1	<i>Beauveria</i> spp.
2		Cg6	
3		Cg7	
4		Cg10	
5		Cg11	
6		Cg12	
7		Cg13	
8	<i>Hypera postica</i>	Hp1Cg	<i>Isaria</i> sp.
9		Hp2Cg	
10		Hp3Cg	
11		Hp4Cg	
12		Hp8Cg	
13		Hp5Cg	

4.2. Caracteristica și importanța practică ale tulpinilor entomopatogene identificate

În microbiota indivizilor din speciile *Sitona lineatus* și *Hypera postica* au fost evidențiate micromicetele *Beauveria bassiana* (3 tulpini), *Beauveria* spp. (12 tulpini), *Isaria fumosorosea* (1 tulpină) și *Isaria* sp. (1 tulpină), cu potențial în controlul biologic al diferitor specii de insecte dăunătoare.

Genul *Beauveria* Vuill., 1912,

B. bassiana (Bals.-Criv.) Vuill., 1912

Poziția taxonomică și caracteristica morfologică. *Beauveria bassiana* (*Balsamo-Crivelli*) Vuillemin (1912) (Hypocreales, Cordycipitaceae) (= *Botrytis bassiana* Bals.-Criv., Linnaea 10: 611 (1835), *Spicaria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. (1910), *Penicillium bassianum* (Bals.-Criv.) Biourge, La Cellule 33: 101 (1923), *Sporotrichum densum* Link (1809), *Sporotrichum larvatum* Peck (1879), *Sporotrichum globuliferum* Speg. (1880), *Sporotrichum minimum* Speg. (1882), *Botrytis bassiana* subsp. *tenella* Sacc. (1882), *Botrytis brongniartii* subsp. *delacroixii* Sacc. (1892), *Isaria vexans* R.H. Pettit (1895), *Isaria citrinula* Speg. (1911), *Sporotrichum epigaeum* var. *terrestre* Dasz. (1912), *Botrytis necans* Masee (1914), *Botrytis stephanoderis* Bally (1923), *Sporotrichum sulfurescens* J.F.H. Beyma (1928), *Isaria shiotae* Kuru (1932), *Beauveria doryphorae* R. Poiss. & Patay (1935), *Trichoderma minima* (Speg.) Gunth. Müller (1965)) (de Hoog, 1972). Actualmente, genul

Beauveria include 26 de specii descrise (Rehner *et al.*, 2011; Sanjuan *et al.*, 2014; Kepler *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2018; Bustamante *et al.*, 2019).

Ciupercile microscopice din genul *Beauveria* pot fi identificate până la nivel de gen, folosind caracterele morfologice. Conidioforii sunt formați din grupuri dense de celule conidiogene, hialine, cu pereții netezi, celulele simpodiale, scurte, globoase, cu rahis apical denticulat sub formă de zigzag, formând o succesiune de conidii sesile unicelulare (de Hoog, 1972; Rehner, Buckley, 2005). *In vitro*, speciile din genul *Beauveria* cresc de obicei încet, au aspect lănos, de culoare albă, gălbui sau roz (figura 4.4). Coloniile vechi au aspect de praf datorită unui număr mare de conidii produse de diferite forme sferice, subsferice, elipsoidale (de Hoog, 1972; Rehner *et al.*, 2011). În plus, unele specii sau tulpini pot produce pigmenți de culoare roșie (de Hoog, 1972). Caracterele morfologice nu sunt suficiente pentru a identifica cu exactitate reprezentanții genului *Beauveria* până la nivel de specie (Robene-Soustrade *et al.*, 2015; Imoulan *et al.*, 2017).

Tulpinile de *B. bassiana*, fiind cultivate *in vitro*, formează colonii cu diametrul de 6-23 mm în 8 zile (de Hoog, 1972), 15-32 mm timp de 10 zile la 23°C (Rehner *et al.* 2011) au aspect lănos, catifelat, de pudră, cu înălțimea de până la 5 mm, la început alb, după care gălbui sau roz. Rar formează exsudat, mirosul lipsește (figura 4.4). Hifele submerse cu pereții netezi, 1,5-3 μm. Hifele miceliului aerian hialine, cu pereții netezi, 1-2 μm, târâtoare sau ascendente care poartă grupuri de celule laterale umflate, de cele mai multe ori de 3-6 × 3-5 μm, care, prin ramificare ulterioară, dau naștere la celule mai mici umflate sau 1-5 celule conidiogene. La tulpinile proaspăt izolate, conidiile sunt strâns grupate; la tulpinile mai vechi, ramificarea devine mai puțin strânsă, celulele conidiogene apar în grupuri mici sau solitar pe celule laterale elipsoidale până la subcilindrice (până la 15 × 6 μm), sau apar direct din hife. Celulele conidiogene sunt formate dintr-o parte bazală, uneori alungită globuloasă, în formă de balon, de cele mai multe ori cu dimensiunile 3-6 × 2,5-3,5/6 μm (de Hoog 1972, Rehner *et al.*, 2011), celule terminale mai subțiri cu un rahis bine dezvoltat, cu lungimea de aproximativ 20 μm lungime și lățimea de 1 μm, geniculat sau îndoit neregulat, denticulat, denticulele cu lățimea și lungimea de 1 μm. Conidiile sunt hialine sau rar gălbui, netezi, sferice până la elipsoidale, uneori cu o bază apiculată, (1,5-) 2-3 (-4) × (1,5-) 2-2,5 (-3) μm (de Hoog, 1972; Rehner *et al.*, 2011). Nu au



Fig. 4.4. Tulpină fungică din genul *Beauveria* izolată din corpul speciei *Sitona lineatus* (orig. A. Moldovan)

fost observați clamidospori. Miceliul pe substrat natural formează de obicei o pâslă deasă, granular-pulverulentă, gălbuie, rar roșiatică. Partea bazală a celulelor conidiogene sferică, sub-sferică, cu dimensiunile de $2,5-4 \times 2-3 \mu\text{m}$ (de Hoog, 1972).

Particularitățile ciclului vital. Tulpinile de micromicete din specia *B. bassiana* sunt răspândite în sol. Deși se pot nutri saprofit, fiind cu ușurință cultivate *in vitro* pe medii nutritive, acestea în ciclul său vital au nevoie de insecte pentru a produce cantități semnificative de spori care vor asigura supraviețuirea și răspândirea speciilor. Speciile de fungi din ordinul Hypocreales sunt concurenți slabi pentru substanțele organice din sol, comparativ cu micromicetele saprofite oportuniste care sunt omniprezente în soluri (Meyling, Eilenberg, 2007). Conidiile prezente în sol, fiind hidrofobe, se atașează la stratul ceros/suprafața chitinoasă a gazdei. Are loc recunoașterea receptorilor de la suprafața acestora (Holder, Keyhani, 2005; Mora *et al.*, 2017). Conidiile germinează. Cu formarea tubului germinativ, acesta crește la suprafața cuticulei și o penetrează prin rupturi mecanice și digestie enzimatică (Vega *et al.*, 2012; Mora *et al.*, 2017). Ulterior, micromiceta ajunge în hemolimfă și produce blastospori. Aceștia se reproduc prin înmugurire, ocolind răspunsul imun al gazdei (Lord, Stanley, 2012; Saranraj, Jayaprakash, 2017). După epuizarea resurselor, blastosporii produc hife care cresc spre exteriorul gazdei, producând la suprafața insectei cantități impunătoare de conidii. Pe parcursul perioadei de vegetație sunt înregistrate focare de infecție în populațiile de insecte. Intensitatea focarelor depinde de mai mulți factori abiotici și biotici (Inglis *et al.*, 2001; Meyling, Eilenberg, 2007; Jaronski, 2010). Conidiile sunt răspândite prin intermediul vântului, al ploii și al insectelor. Din numărul total de conidii produse, doar o cantitate mică va reuși să infecteze noi gazde (Meyling, Eilenberg, 2007).

Relațiile trofice. *B. bassiana* este o specie cosmopolită care poate fi izolată din sol, insecte, filosferă și ocazional din țesuturile vii ale plantelor. *Beauveria bassiana* (*Bb*) este un agent patogen fungic comun, dar puțin înțeles al multor grupuri de insecte, fiind cunoscută pentru capacitatea de a infecta mai mult de 700 de specii de insecte din majoritatea ordinelor (Goettel *et al.*, 1990; Inglis *et al.*, 2001; Meyling, Eilenberg, 2007; Rohrlich *et al.*, 2018). Cu toate acestea, tulpinile individuale de *B. bassiana* izolate de pe anumite specii de insecte, pot prezenta un spectru îngust de acțiune (Rohrlich *et al.*, 2018). Spectrul trofic în condiții de câmp este de obicei mai îngust decât în condiții de laborator, fiind influențat de componenta spațio-temporală, planta-gazdă și de factorii abiotici. Specificitatea față de gazdă a tulpinilor de *B. bassiana* este încă insuficient studiată, fiind necesare studii minuțioase (Rohrlich *et al.*, 2018).

De asemenea tulpinile de *B. bassiana* pot exista în calitate de endofiti ai plantelor de cultură precum: porumbul (*Zea mays* L.) (Wagner, Lewis, 2000), sorgul (*Sorghum* spp.) (Tefera, Vidal, 2009), fasolea (*Phaseolus vulgaris* L.) (Parsa, Ortiz, Vega, 2013; Afandhi, Widjayanti, Emi, 2019), bumbacul (*Gossypium hirsutum* L.) (Lopez, Sword, 2015), ardeiul dulce (*Capsicum annum* L.) (Jaber, Alananbeh, 2018) fără a produce daune plantelor, asigurând protecția acestora față de dăunători și patogeni.

Genul *Isaria* Persoon, 1794

I. fumosorosea Wize 1904

Poziția taxonomică și caracteristica morfologică. *Isaria fumosorosea* Wize (1904) (Hypocreales, Cordycipitaceae) (= *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) A.H.S. Brown & G. Smith, (1957), *Spicaria fumosorosea* (Wize) Vassiljevsky (1929), *Cordyceps fumosorosea* (Wize) Kepler, B. Shrestha & Spatafora (2017), *Spicaria aphodii* Vuill. (1910), *Monilia aquatilis* Malguth (1928), *Paecilomyces hibernicus* Kennelly & Grimes (1930), *Paecilomyces isarioides* N. Inagaki (1962)). Conform studiilor recente de reconstrucție a relațiilor filogenetice cu utilizarea metodelor molecular genetice (Kepler *et al.*, 2017), genul este redenumit în *Cordyceps*, aparținând familiei Cordycipitaceae.

Coloniile au o rată de creștere moderată, ating 3-4 cm în diametru timp de 10 zile. Coloniile tinere au aspect pulverulent, sporulează activ. Unele tulpini pot produce coremii (numite și sinemate) distinctive, culturile sunt albe la început, culturile bătrâne au aspect de fulgi, zonele conidiale pot dezvolta lent nuanțe de roz (figura 4.5).

De obicei, exsudatul este absent, unele tulpini produc picături incolore mici. Mirosul lipsește. Miceliul cu pereți netezi, hialini, 1,0-3,2 μm lățime. Conidioforii provin preponderent din miceliu cufundat în substrat, având lungimea de până la 60 μm lungime, 2,0-3,0 μm lățime, cu pereți netezi, ramificați neregulat, sau care poartă verticile dispuse câte 2-5 pe ramuri divergente; ramuri cilindrice scurte, 4-10 \times 2,3-3,5 μm , purtând frecvent ramuri secundare. Conidioforii și ramurile acestora se termină cu fialide dispuse în grup de 1-6 (de obicei 2-4). La culturile mai vechi, conidioforii apar de obicei ca ramuri laterale scurte pe miceliu aerian, cu lungimea de



Fig. 4.5. Tulpină fungică din genul *Isaria*, izolată din corpul insectei *Hypera postica* (orig. A. Moldovan)

7-28 μm , puțin ramificate, frecvent monovercilate, sau cu fialide solitare sau verticile de fialide dispuse neregulat pe miceliu. Pe conidioforii complecși, fialidele sunt relativ scurte, 5-9 \times 2,5-3,3 μm , elipsoidale în partea inferioară, îngustându-se brusc într-un gât scurt de aproximativ 1 μm lățime; fialidele solitare și fialidele de pe conidiofori simpli au 8-30 \times 1,5-2,5 μm , alungite sau ușor umflate la bază, trecând treptat într-un gât relativ lung. Conidiile sunt hialine, cu pereți netezi, cu forma elipsoidală spre alungite, cu vârful rotund sau ascuțit, 2,5-4,0 \times 1,4-2,2 μm (în medie 3,6 \times 1,7 μm), conidiile ocazionale până la 5,0 \times 2,6 μm ; în lanțuri scurte (Brown, Smith, 1957).

Particularitățile ciclului vital. Ciclul vital al speciei este similar cu cel al altor specii de fungi entomopatogeni din ordinul Hypocreales. Conidiile de *I. fumosorosea* care intră în contact cu cuticula gazdei produc enzime capabile de a o penetra. Are loc formarea tubului germinativ (inclusiv a apresoriului) care penetrează cuticula și pătrunde în hemocel. Micromiceta poate de asemenea să pătrundă în corpul insectei prin orificiul bucal sau anal. Miceliul se dezvoltă în interiorul insectei și ulterior crește spre exterior producând conidii. Insecta piere din cauza lipsei de substanțe nutritive, distrugerii țesuturilor și din cauza toxinelor produse de fungi (Castellanos-Moguel, 2013).

Relațiile trofice. Specia prezintă un spectru relativ mare de gazde cu răspândire largă pe glob. Este întâlnită în sol, pe plante, în aer (Zimmermann, 2008). A fost izolată din aproximativ 40 de specii de artropode din 10 ordine de insecte, mai frecvent fiind izolată din lepidoptere (Smith, 1993; Hoy, Raghuwinder, Rogers, 2010; Majeed *et al.*, 2017; Jessica *et al.*, 2018; Usanmaz-Bozhuyuk *et al.*, 2018). Tulpinile de *I. fumosorosea* sunt considerate non-toxice pentru om și au efect minim asupra speciilor nevizate, dacă sunt aplicate corect (Osborne, Landa, 2002; Copping, 2004; Zimmerman, 2008). Unele tulpini au spectru îngust de acțiune, pe când altele spectru larg de acțiune (Zimmerman, 2008). Există puține date privind ecologia și biologia acestei specii, fiind necesare studii extensive. Tulpinile de *I. fumosorosea* de asemenea sunt obiectul cercetărilor privind existența în calitate de endofiti ai plantelor de cultură, fiind date privind potențialul de a coloniza grâul (*Triticum aestivum* L.) (Werner, Saar, Stephan, 2015; Koch *et al.*, 2018).

Studiile ulterioare trebuie să vizeze virulența tulpinilor izolate și acțiunea lor asupra speciilor *S. lineatus*, *H. postica*, *P. apricans* și asupra artropodelor nevizate. Necesită investigații ulterioare influența tulpinii asupra altor insecte din genul *Sitona*, ținând cont de faptul că, alături de *Sitona lineatus*, în Republica Moldova au fost identificați încă 18 reprezentanți ai acestui gen (Poiras, 2006). De asemenea, un interes deosebit prezintă tulpina identificată ca *Isaria fumosorosea*, deoarece nu au fost raportate efecte negative ale acesteia asupra albinelor și artropodelor nevizate. *Beauveria bassiana* este utilizată ca insecticid biologic în controlul unui spectru larg de dăunători, fiind activă de asemenea împotriva speciei *Sitona lineatus* L. (Steenberg, Ravn, 1996; Riedel, Steenberg, 1998) și *Hypera postica* (Yucel *et al.*, 2018). Specia fungică rareori infectează oamenii sau animalele, fiind considerată un insecticid sigur. Totuși a fost raportat cel puțin un caz de infecție umană a unei persoane cu imunodeficiență (Tucker *et al.*, 2004). În plus, ca orice praf, sporii pot determina dificultăți ale respirației. A fost constatată capacitatea micromicetei *B. bassiana* de a crește ca endofit al plantelor de cultură și avantajele pentru controlul biologic al dăunătorilor (Vidal, Jaber, 2015, McKinnon *et al.*, 2017). Specia *B. bassiana* produce un șir de substanțe biologic active printre care enzime proteolitice, lipolitice, amilaza, chitinaza, cu ajutorul cărora penetrează integumentele, alcaloizi, toxina beauvericina, un ciclodepsipeptid care, alături de alte toxine, are efect antibacterial (Patocka, 2016). De asemenea, specia posedă efect antagonist împotriva fungilor

fitopatogeni (Yun *et al.*, 2017). *Isaria fumosorosea* este o specie cosmopolită cu o gamă largă de gazde, care include insecte din peste douăzeci și cinci de familii (inclusiv suprafamilia *Curculionoidae*) și specii de acarieni. Micromiceta este folosită pentru controlul biologic al insectelor, dăunători ai plantelor decorative, plantelor leguminoase, porumbului, bumbacului, orezului și a altor culturi. De asemenea, *I. fumosorosea* reduce dezvoltarea și răspândirea făinării castraveților, *Sphaerotheca fuliginea* (Schltdl.) Pollacci (Ascomycota, *Erysiphaceae*) (Kavkova, Curn, 2005). Tulpinile de *I. fumosorosea* produc numeroși metaboliți, inclusiv proteaze, chitinaze, lipaze, beauvericină, implicate în procesul de patogeneză la insecte (Luangsa-Ard *et al.*, 2009; Ali, Huang, Ren, 2010).

4.3. Evaluarea activității insecticide a tulpinilor fungice entomopatogene

În scopul evaluării preliminare a patogenității tulpinilor fungice izolate, identificate ca *Beauveria* spp. și *Isaria fumosorosea*, au fost pregătite suspensii cu concentrația de $\sim 10^9$ spori/ml din cultura de 7 zile. A fost evaluată viabilitatea conidiilor și cantitatea de inocul aplicată a fost ajustată astfel încât cantitatea de conidii capabile de a infecta gazda să fie aceeași. Datele privind mortalitatea înregistrată la 7-a zi sunt prezentate în tabelul 4.2.

Tabelul 4.2. Evaluarea preliminară a activității insecticide a tulpinilor fungice

Nr. d/o	Tulpina fungică testată	Viabilitatea, %	Cantitatea de inocul aplicată, ml	Mortalitatea (Abbot, 1925) la a 7-a zi de la tratament, %		
				<i>S. lineatus</i>	<i>H. postica</i>	<i>P. apricans</i>
1.	<i>B. bassiana</i> , L1/6	94,0±4,50	1,064	100	70	40
2.	<i>B. bassiana</i> , B	90,0±3,97	1,111	70	30	0
3.	<i>B. bassiana</i> , N	86,0±1,50	1,163	60	10	10
4.	<i>Beauveria</i> sp., Cg7	90,0±3,12	1,111	70	50	0
5.	<i>Beauveria</i> sp., Cg10	87,0±2,00	1,149	80	30	0
6.	<i>Beauveria</i> sp., Cg11	82,0±1,80	1,220	60	30	0
7.	<i>Beauveria</i> sp., Cg12	87,0±3,12	1,149	90	50	20
8.	<i>Beauveria</i> sp., Cg13	93,0±2,18	1,075	50	20	0
9.	<i>I. fumosorosea</i> , L5/6	91,5±4,82	1,093	40	0	0
10.	Martor, H ₂ O _{dist. sterilă}		1	0	0	0

Specia *Sitona lineatus* a fost susceptibilă la infecția cu toate tulpinile fungice testate, iar specia *Hypera postica* a fost susceptibilă la infecția doar cu tulpinile fungice din genul *Beauveria*. În cazul speciei *Protapion apricans*, au fost înregistrate cele mai mici valori ale mortalității, fiind capabile de a cauza mortalitate doar 3 din cele 9 tulpini entomopatogene investigate. Ca rezultat al estimării susceptibilității insectelor țintă la infecția cu tulpinile fungice potențial entomopatogene pentru determinarea activității insecticide, a fost selectată tulpina L1/6 care a prezentat valori sporite ale mortalității.

Evaluarea activității insecticide a tulpinii *Beauveria bassiana* L1/6 (CN-MN-FE-01)

Cuantificarea inoculului a fost realizată folosind Camera Goreaev. Pentru tulpina L1/6, concentrația de spori recoltată a constituit $1,02 \times 10^7$ conidii/ml. Deviația standard a constituit 3,962, ceea ce reprezintă 9,72% din valoarea medie a numărului de spori în 16 pătrate mici. Per cutie Petri, au fost aplicate câte 1 ml suspensie spori. Au fost folosite cutii Petri cu diametrul de 90 mm, suprafața fiind egală cu $63,617 \text{ cm}^2$.

Evaluarea viabilității conidiilor

Au fost numărate conidiile care au germinat per număr total de 200 de conidii. Experiența a fost efectuată în trei repetiții. Deviația standard calculată a constituit 6,245, ceea ce reprezintă 3,287% din valoarea medie a numărului de spori germinați.

Viabilitatea sporilor a constituit 95% după păstrare în frigider timp de 2 ani, la temperatura de 4°C . În cazul păstrării tulpinii în glicerol de 10%, la temperatura de -80°C , viabilitatea conidiilor a constituit 96%.

Cantitatea de conidii viabile în inocul

$$C = 1,02 \times 10^7 \text{ spori/ml} \times 0,95 = 0,969 \times 10^7 \text{ spori/ml.}$$

Concentrația de spori, per unitate de suprafață la concentrația maximală testată, este de:

$$C = \frac{C}{S} = \frac{0,969 \times 10^7}{63,617} = 1,523 \times 10^5 \text{ spori/cm}^2.$$

Activitatea insectidică a tulpinii *Beauveria bassiana* L1/6 a fost testată pe insectele adulte sănătoase, provenite din populația naturală a speciilor *Sitona lineatus* și *Hypera postica*. Insectele au fost lăsate să se deplaseze pe suprafața hârtiei de filtru pentru a intra în contact cu sporii ciupercii (figura 4.6). După inoculare, insectele au fost incubate câte 10 în cuști, cu lucernă proaspătă în condiții controlate, la temperatura camerei de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ și durata zilei de 14 h (figurile 4.6 și 4.7).

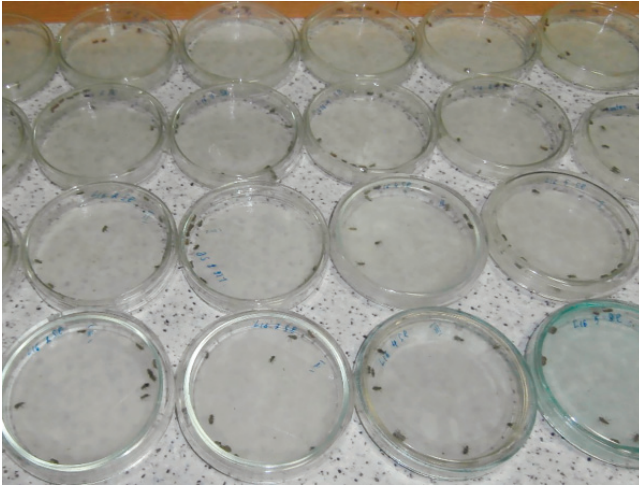


Fig. 4.6. Inocularea speciilor de dăunători cu suspensii conidiale din cultura tulpinii *B. bassiana* L1/6



Fig. 4.7. Transferarea insectelor în cuști cu lucernă proaspătă

Fiecare 24 de ore au fost înregistrate datele cu privire la numărul de exemplare moarte. Au fost observate schimbări în comportamentul trofic al insectelor. Acestea, devenind pasive, începând cu ziua a doua de la inoculare, a scăzut numărul de creștături specifice pe frunzele de lucernă (figura 4.8).



a



b

Fig. 4.8. Verificarea mortalității insectelor după inocularea cu tulpinile fungice: a - verificarea mortalității, b - înregistrarea datelor

Cadavrele insectelor au fost îndepărtate înainte ca micromiceta să sporuleze pentru a preveni transmiterea orizontală. Au fost remarcate deplasarea insectelor spre vârful plantei și fixarea înainte de moarte (figura 4.9). Ulterior, cuștile au fost spălate, sterilizate, iar lucerna a fost schimbată.



a

b

Fig. 4.9. Verificarea mortalității și transferarea indivizilor (orig. A. Moldovan):

a - exemplare moarte fixate la baza frunzelor,

b - transferarea indivizilor în eprubete

Faptul că mortalitatea insectelor a fost cauzată de infecția fungică a fost confirmat prin apariția miceliului aerian caracteristic pe cadavrele plasate în condiții de umiditate sporită și lipsa dezvoltării acestuia în proba martor (figura 4.10).



a

b

Fig. 4.10. Insecte cu miceliu aerian dezvoltat la exterior (orig. A. Moldovan):

a - specimenii cu sporulare externă, b - *Sitona lineatus*

Cea mai efectivă dintre concentrațiile testate ale tulpinii L1/6, pentru *Sitona lineatus* L., a fost $0,969 \times 10^6$ spori/ml cauzând o mortalitate de 100% la a 5-a zi de la tratament (figura 4.11).

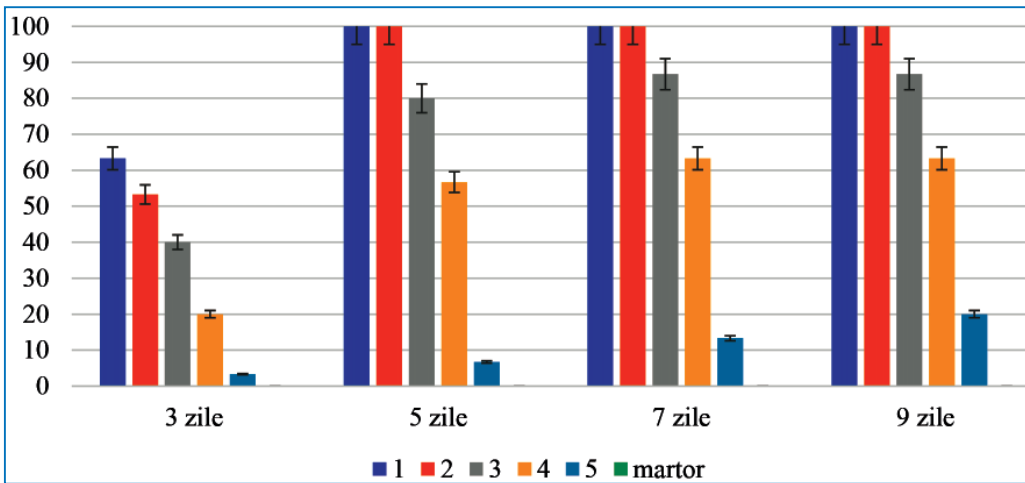


Fig. 4.11. Rata medie a mortalității indivizilor din specia *S. lineatus* după aplicarea suspensiei din conidii ale tulpinii L1/6

1 - $0,969 \times 10^7$ conidii/ml, 2 - $0,969 \times 10^6$ conidii/ml, 3 - $0,969 \times 10^5$ conidii/ml, 4 - $0,969 \times 10^4$ conidii/ml, 5 - $0,969 \times 10^4$ conidii/ml, mator – apă distilată sterilă

Activitatea biologică a tulpinii exprimată în valorile LC_{50} , calculată după formula lui Spearman-Kärber, a constituit $1,127 \times 10^4$ spori/ml. Astfel, o reducere cu 50% a efectivului dăunătorului *Sitona lineatus* L. poate fi obținută la aplicarea culturii fungice *Beauveria bassiana* L1/6, în concentrație de $1,127 \times 10^4$ spori/ml, în apă distilată.

Datele denotă că tulpina de fungi propusă, *Beauveria bassiana* L1/6, posedă o activitate insecticidă mai pronunțată asupra speciei *S. lineatus*, comparativ cu datele din literatura de specialitate, și poate fi utilizată în calitate de agent biologic în controlul efectivului lor numeric (tabelul 4.3).

Tabelul 4.3. Rata mortalității dăunătorului *Sitona lineatus* L. după aplicarea suspensiei de spori din cultura fungică a tulpinilor de *Beauveria bassiana*

Nr.	Tulpina	Cantitatea sporilor per individ	Mortalitatea, nr. exemplare moarte/nr. total	Mortalitatea, %
1.	<i>Beauveria bassiana</i> L1/6	$0,969 \times 10^5$	30/30	100
2.	<i>Beauveria bassiana</i> 238 (Riedel, 1998)	1×10^7	17/20	85

Tulpina este ecologic inofensivă, deoarece a fost extrasă din mediul natural, nu este patogenă pentru plante și organismele homeoterme. În natură nu sunt introduse

organisme noi, ceea ce exclude deteriorarea ecosistemelor, cum se observă în cazul utilizării altor patogeni și preparate. Tulpina *Beauveria bassiana* L1/6 a fost depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Neputogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie sub numărul CNMN-FE-01 și în baza ei a fost obținut brevetul de invenție nr. MD 4560 (Moldovan, Munteanu-Molotievskiy, Toderăș, 2018).

Izolarea tulpinilor locale de *Beauveria bassiana*, cu activitate insecticidă sporită și o viteză sporită de acțiune, reprezintă o etapă importantă în dezvoltarea programelor de control biologic bazate de preparate entomopatogene fungice în Republica Moldova.

Din punctul de vedere al costurilor, producția locală de biopesticide este mai avantajoasă pentru fermieri. Ulterior se cere de a evalua virulența tulpinilor izolate asupra unei game mai largi de artropode, în special cele nevizate. 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 a oferi strategii de management integrat viabile și eficiente.

4.4. Proprietățile fiziologice ale tulpinii de fungi *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01

Majoritatea micromicetelor pot fi cultivate cu succes în condiții de laborator. Cercetările actuale ale savanților sunt orientate spre selectarea tulpinilor fungice capabile de a crește pe medii nutritive accesibile, producând, totodată, o cantitate ridicată de spori. De asemenea sunt realizate investigații științifice care au drept scop caracterizarea metaboliților produși de tulpinile fungice pentru a identifica acele substanțe care au un rol important în procesul de patogenează. Însă aceste date nu sunt cele mai importante pentru elaborarea preparatelor entomopatogene. Pentru a produce biopreparate eficiente în baza tulpinilor fungice, sunt necesare date privind răspunsul tulpinilor fungice la acțiunea diferitor factori fizici și chimici. Formarea sporilor, germinarea, viabilitatea acestora, creșterea vegetativă a tulpinilor fungice în condiții de câmp sunt afectate de temperatură, umiditate, radiațiile cu diferite lungimi de undă, salinitate ș.a. (Jaronski, 2010; Vega *et al.*, 2012). Cercetările din ultimii ani au scos în evidență faptul că răspunsul tulpinilor fungice la acțiunea factorilor de mediu depinde de specie, ecotip și au elucidat faptul că activitatea insecticidă depinde de anotimp. Este cunoscut faptul că factorii fizici au o influență semnificativă asupra creșterii și dezvoltării tulpinilor fungice în condițiile naturale. Totuși puține dintre studiile realizate în ultimii ani au urmărit caracterizarea particularităților fiziologice ale agenților de control biologic din această perspectivă. Majoritatea studiilor s-au axat pe selectarea mediilor nutritive optime pentru maximizarea producției de spori în condiții de laborator (Piatkowski, Krzyzewska, 2007). Studiarea efectului diferitor factori fizici asupra creșterii și dezvoltării tulpinilor fungice cu potențial insecticid înalt este esențială pentru prognozarea eficacității tulpinii selectate în condiții de câmp, pentru elaborarea formulei biopreparatului și a recomandărilor de aplicare și ajustare a dozelor utilizate.

4.4.1. Influența temperaturii asupra creșterii și dezvoltării tulpinii de fungi *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01

Un factor limitativ care acționează asupra creșterii și dezvoltării tulpinilor este temperatura. De asemenea, acest factor influențează direct capacitatea de a infecta insecta gazdă (Mietkiewski *et al.*, 1994; Mishra, Kumar, Malik, 2015; Athanassiou *et al.*, 2017). Temperatura înaltă afectează direct sporularea, iar temperaturile extreme pot inhiba complet producerea de spori (Piatkowski, Krzyzewska, 2007; Mwamburi, Laing, Miller, 2015). De asemenea este cunoscut faptul că la temperaturi mai mari de 45°C se induce sinteza de proteine de șoc termic (Xavier, Khachatourians, 1996). Toleranța termică este un element cheie pentru stabilitatea și eficiența preparatului pe bază de condii fungice în condiții de câmp (Tong, Feng, 2020).

Ca rezultat al analizei datelor obținute în prezenta lucrare, a fost stabilit faptul că creșterea radială a tulpinii *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01 urmează un model liniar (figura 4.12).

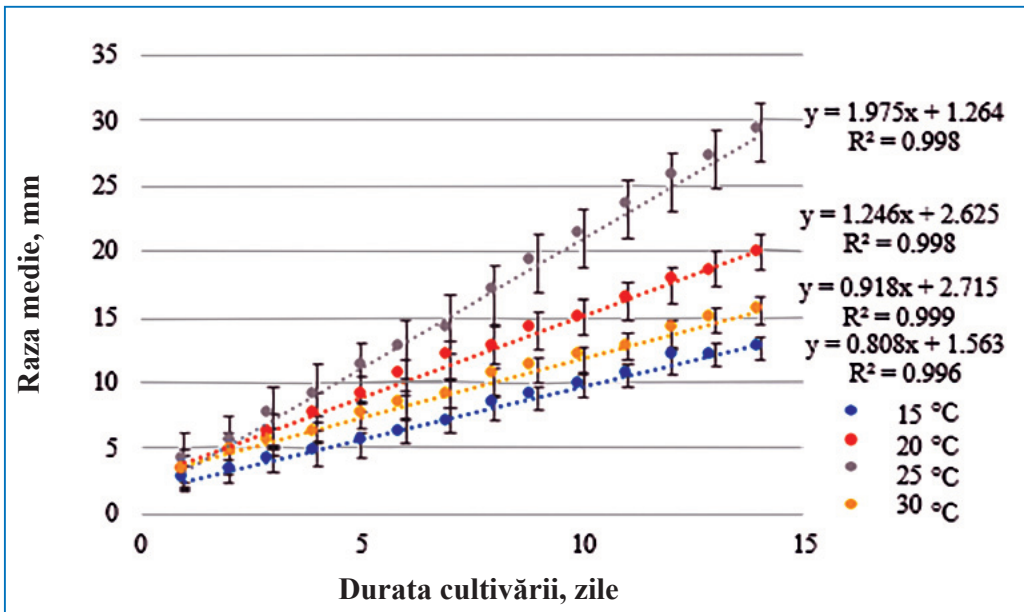


Fig. 4.12. Graficul care exprimă dependența dinamică de creștere a coloniilor tulpinii *B. bassiana* CNMN-FE-01 (mm) de temperatură

Viteza de creștere radială a tulpinii de fungi diferă semnificativ din punct de vedere statistic la temperaturile testate ($F(3,52) = 6,073$, $p = 0,001$). Din ecuația dreptei a fost dedusă viteza medie de creștere radială care este egală cu panta dreptei. Ca rezultat al analizei datelor privind viteza medie de creștere radială, a fost determinat faptul că temperatura optimă de creștere este de 25°C. Creșterea tulpinii se stopează la temperatura de 35°C (figura 4.13, Moldovan Munteanu-Molotievskiy, Toderaș, 2022).

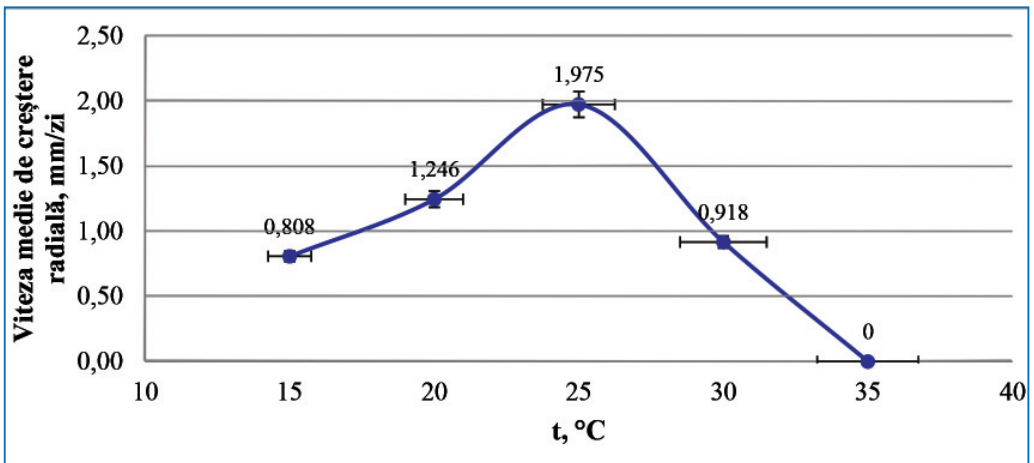


Fig. 4.13. Viteza medie de creștere radială a tulpinii de fungi *B. bassiana* CNMN-FE-01 pe mediul nutritiv PDA la diferite temperaturi, mm/zi

Studiile anterioare privind temperatura optimă pentru creșterea vegetativă a entomopatogenilor fungi au constatat faptul că aceasta variază semnificativ între diferite specii și în cadrul speciilor. Conform datelor din literatura de specialitate pentru mai multe specii de fungi, inclusiv din genurile *Beauveria*, *Metarhizium* și *Paecilomyces*, temperatura optimă pentru creștere și dezvoltare este situată în intervalul 24 și 27°C (Hallsworth, Naresh, 1999). Fiind studiate 65 de tulpini de *B. bassiana*, a fost constatat că, în majoritatea cazurilor, temperatura optimă de creștere a variat în limitele 25-28°C. Unele tulpini au avut temperatura optimă de 20°C și 30°C (Fargues *et al.*, 1997). Ulterior fiind studiate mai multe tulpini de *B. bassiana* și *M. anisopliae*, a fost evidențiată o viteză de creștere lineară la temperatura de 30°C. Din cele 98 de tulpini cercetate, doar 3 au fost capabile de a crește la 35°C (Rodriguez, Gerding, France, 2009). Există date privind izolarea tulpinilor de *M. anisopliae* capabile de a crește bine la temperaturi egale și mai mari de 35°C (Teja, Rahman, 2016). Ca rezultat al analizei datelor obținute, a fost stabilit că sporularea și rata de germinare sunt maxime în cazul cultivării la temperatura de 25°C (figurile 4.14, 4.15, Moldovan, Munteanu-Molotievskiy, Toderăș, 2022).

Lipsa creșterii și germinării la temperaturi apropiate de temperatura corpului uman prezintă un avantaj semnificativ pentru înregistrarea preparatelor entomopatogene fungice (Butt, 2002). Totodată, temperatura poate avea un efect negativ semnificativ asupra procesului de patogeneză în cazul creșterii semnificative a temperaturii la suprafața solului (Arthurs *et al.*, 2001, Rangel *et al.*, 2005; Vega *et al.*, 2012).

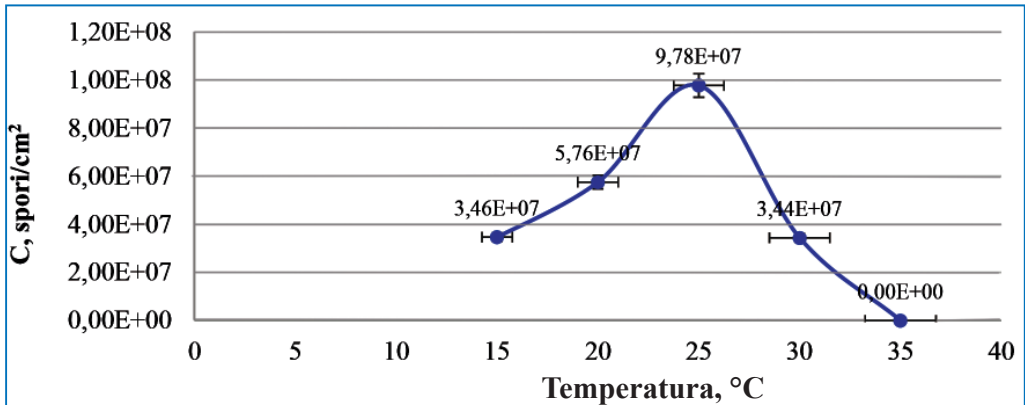


Fig. 4.14. Cantitatea de spori/cm² produși de tulpina *B. bassiana* CNMN-FE-01, în funcție de temperatură

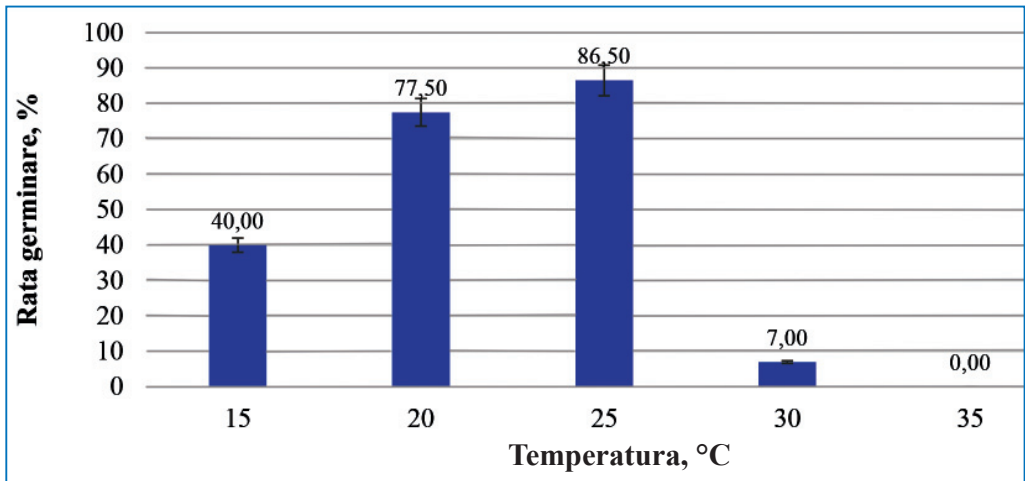


Fig. 4.15. Viabilitatea conidiilor tulpinii *B. bassiana* CNMN-FE-01 după menținerea îndelungată la diferite temperaturi

A fost stabilit că, la temperatura de 25°C, timp de 90 de zile, tulpina fungică își menține viabilitatea sporilor în proporție de 86% (figura 4.15). Temperaturile mai mari de 25°C reduc semnificativ viabilitatea sporilor. Inhibarea creșterii tulpinii *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01 la temperaturi mai mari 30°C și reducerii considerabile a viabilității sporilor după expunerea îndelungată la temperaturi mai mari de 30°C denotă necesitatea aplicării repetate ale tulpinii fungice *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01 în cazul utilizării în calitate de agent de control biologic al coleopterelor curculionoide (Moldovan, Munteanu-Molotievskiy, Toderaș, 2022).

4.4.2. Influența radiațiilor UV asupra creșterii și dezvoltării tulpinii de fungi *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01

A fost cercetată microscopic germinarea conidiilor tulpinii *B. bassiana* CNMN-FE-01 după iradiere cu radiații UV, $\lambda = 312$ nm (figurile 4.16, 4.17).

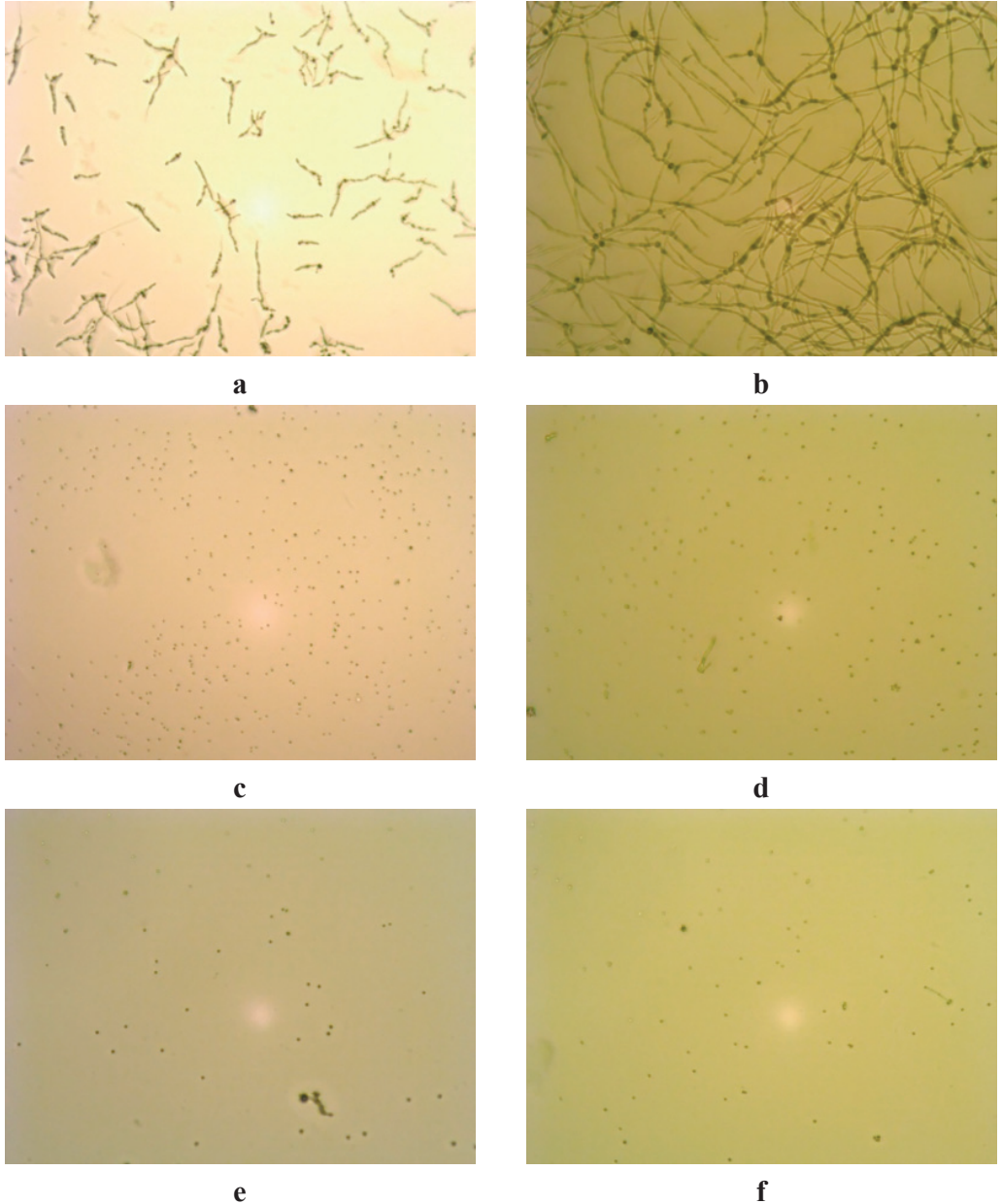


Fig. 4.16. Germinarea conidiilor după expunerea la raze UV, examinare microscopică: a - după 24 h, martor; b - după 30 h, martor; c - 24 h, 10 min. expunere UV; d - 30 h, 10 min. UV; e - 24 h, 20 min. UV; f - 30 h, 20 min. UV

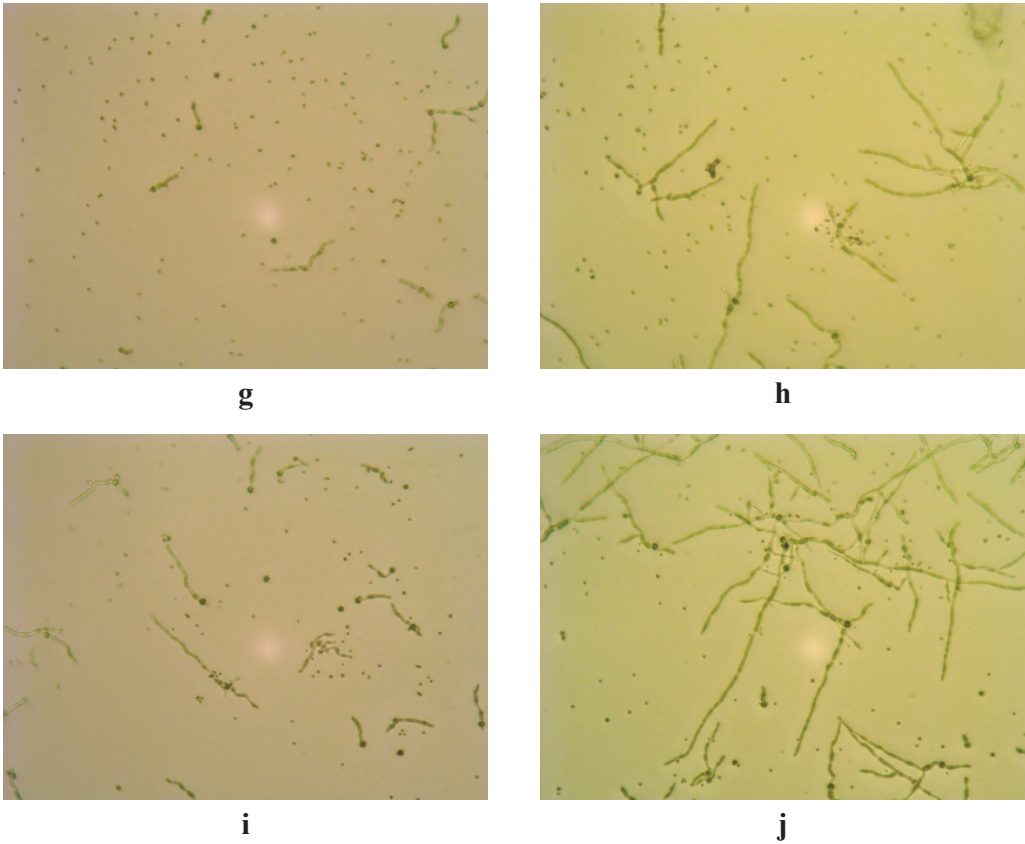


Fig. 4.16 (continuare). Germinarea conidiilor după expunerea la raze UV, examinare microscopică: g - 24 h, 30 min. UV; h - 30 h, 30 min. UV; i - 24 h, 40 min. UV; j - după 30 h, 40 min. UV

Este cunoscut faptul că radiațiile UV sunt un factor limitativ pentru creșterea și dezvoltarea tulpinilor fungice în condiții de câmp. Conidiile sunt extrem de sensibile la radiațiile UVB. Acestea cauzează deteriorări la nivelul acizilor nucleici, al proteinelor, lipidelor și membranelor (Tevini, 1993; Vega *et al.*, 2012). Expunerea subletală la radiațiile UV poate determina alterări fiziologice sau genetice, contribuind la reducerea virulenței prin faptul că întârzie sau inhibă germinarea (Vega *et al.*, 2012). O expunere cu durata de 5 minute poate reduce rata de germinare a conidiilor de *B. bassiana* de la 94 la 52% (Wenzel Rodrigues *et al.*, 2016). A fost stabilit faptul că expunerea de scurtă durată la razele UV cu $\lambda = 312$ nm inhibă puternic germinarea sporilor (figura 4.17).

Prezintă interes faptul că rata de germinare crește în timp. Studiile ulterioare vor avea drept scop de a extinde durata de expunere a conidiilor la raze UV pentru a determina efectul expunerilor de durată mai lungă (Moldovan *et al.*, 2022).

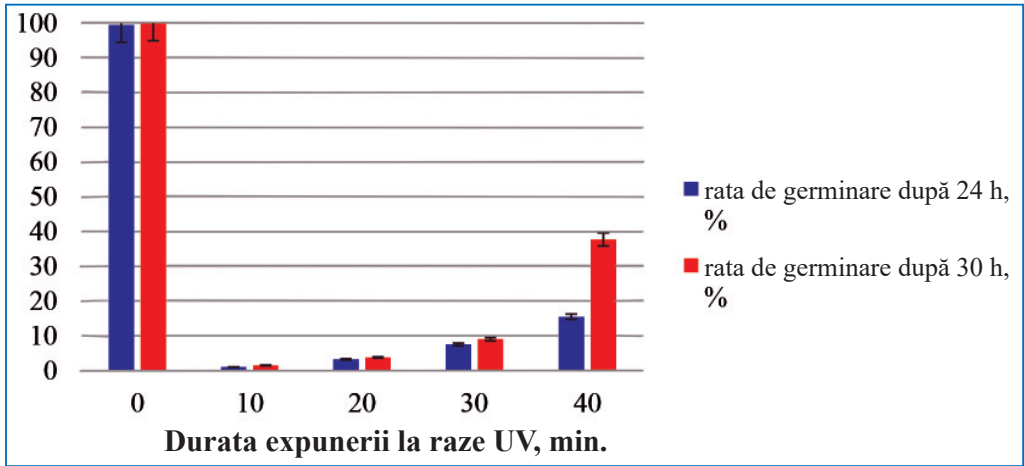


Fig. 4.17. Germinarea conidiilor tulpinii *B. bassiana* CNMN-FE-01 după iradierea cu raze UV timp de 10, 20, 30, 40 min.

Ulterior a fost cercetată viteza de creștere radială a tulpinii fungice după iradiere (figurile 4.18, 4.19).

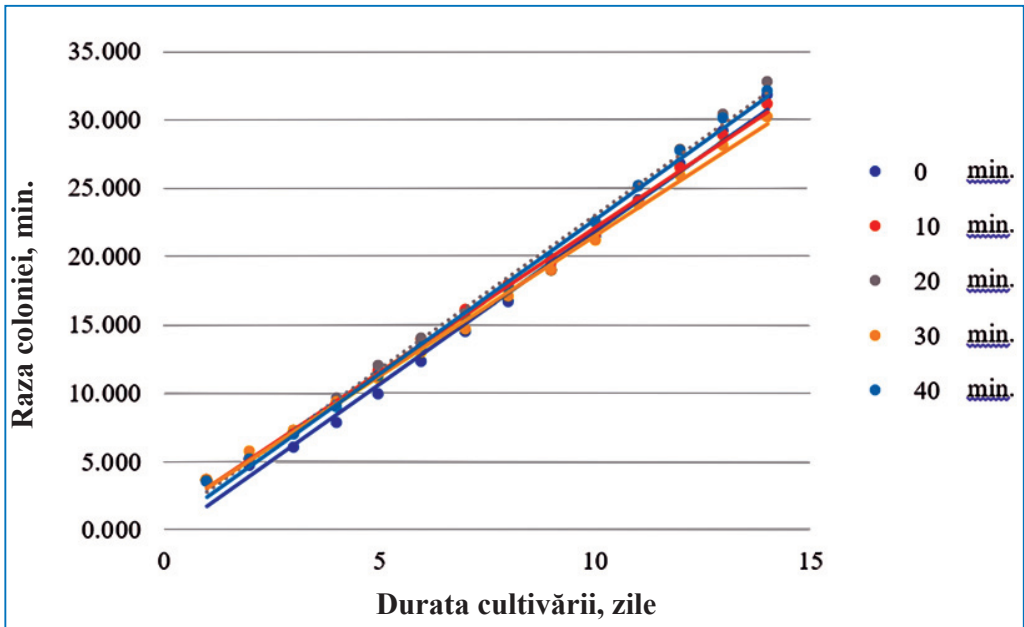


Fig. 4.18. Graficul care exprimă dependența dinamicii de creștere a coloniilor tulpinii *B. bassiana* CNMN-FE-01 (mm) de durata de expunere la UV

Viteza de creștere radială nu este afectată semnificativ de expunerea la raze UV ($\lambda = 312 \text{ nm}$) ($F(4,65) = 0,037, p = 0,827$). Din ecuația dreptei a fost dedusă viteza medie de creștere radială care este egală cu panta dreptei (figura 4.19).

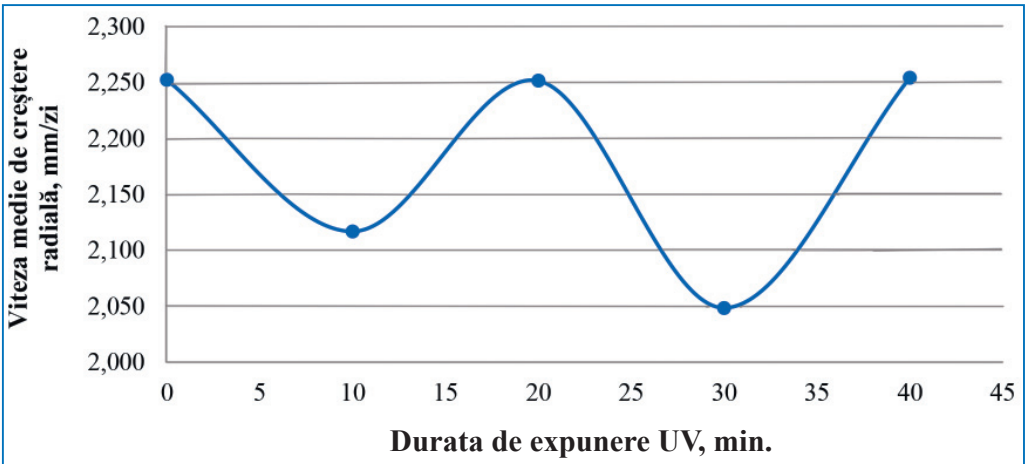


Fig. 4.19. Viteza medie de creștere radială a tulpinii de funghi *B. bassiana* CNMN-FE-01 pe mediu nutritiv PDA după expunere la UV, mm/zi

Pentru a evita efectele negative ale expunerii conidiilor la radiații UV, sunt întreprinse studii ample care vizează utilizarea ecranelor de protecție (de exemplu Tinopal) sau absorbantii UVA/UVB (coloranți ca, de exemplu, Congo roșu). Există numeroase studii privind eficiența ecranelor de protecție contra UV în formulele apoase sau pe bază de ulei a speciei *B. bassiana*, testate în laborator și în teren deschis (Vega *et al.*, 2012; Posadas *et al.*, 2012; Wenzel Rodrigues *et al.*, 2016). Pigmenții naturali care se conțin în uleiurile vegetale de asemenea pot proteja conidiile de radiația UV (Braga *et al.*, 2001). Stresul la nivel subletal (nutrițional, osmotic etc.) poate stimula toleranța conidiilor față de radiațiile UV (Rangel, Anderson, Roberts, 2008; Vega *et al.*, 2012).

4.4.3. Influența pH-ului mediului ambiant asupra creșterii și dezvoltării tulpinii de funghi *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01

Valoarea pH a solului este un factor abiotic important care poate influența persistența și virulența agenților de control fungici în condiții de câmp (Inglis *et al.*, 2001). Deci pH-ul solului poate influența germinarea conidiilor. În procesul de infecție, tulpinile entomopatogene produc proteaze și hidrolaze capabile de a degrada cuticula gazdei. Există date care confirmă faptul că acest proces poate fi afectat de valorile pH la suprafața cuticulei. Producția de toxine în cazul speciei *B. bassiana* este optimă la pH acid (Sharma, Agarwal, Rajak, 1992; St. Leger, Joshi, Roberts, 1998; Dias *et al.*, 2008).

Toleranța tulpinilor de *B. bassiana* față de diferite valori ale pH-ului a constituit obiectul investigațiilor științifice (Sharma *et al.*, 1992; Padmavathi, Devi, Rao, 2003; Karthikeyan, Shanthi, Nagasathya, 2008). Fiind studiate toleranța și intervalele optime ale pH pentru 29 de tulpini de *B. bassiana*, a fost stabilit faptul că un pH = 3 a inhibat creșterea tuturor tulpinilor. Toate tulpinile au tolerat un

pH de 5-13, unele tulpini prezentând un interval optim la larg, pe când altele mai restrâns (Padmavathi, Uma Devi, Uma Maheswara Rao, 2003). În linii generale, tulpinile de *Beuveria bassiana* pot crește vegetativ într-un interval larg de valori ale pH = 4-14, fiind constatate valori optime la pH = 6-7. Rezultate similare au fost constatate pentru tulpina *B. bassiana* CNMN-FE-01. Ca rezultat al analizei datelor privind viteza de creștere radială a fost determinat faptul că nu există diferențe din punct de vedere statistic dintre vitezele de creștere radială a tulpinii *B. bassiana* CNMN-FE-01 la pH 6, 7 și 8 ($F(2,42) = 0,049$, $p = 0,951$). În intervalul de valori ale pH 5-9, tulpina prezintă diferențe semnificative din punct de vedere statistic ale vitezei de creștere radială ($F(4,65) = 4,33$, $p = 0,004$), tulpina prezentând valori minime ale vitezei de creștere la pH = 5 (Moldovan, Munteanu-Molotievskiy, Toderăș, 2021).

De asemenea a fost evaluată cantitatea de spori produsă per unitate de suprafață și rata de germinare a tulpinii fungice după cultivare pe mediul nutritiv PDA cu valori diferite ale pH, timp de 90 de zile, la temperatura de 25°C. A fost constatat că, la valori ale pH mai mari de 6, se reduc cantitatea de spori produsă și viabilitatea sporilor (Moldovan, Munteanu-Molotievskiy, Toderăș, 2021).

Conform datelor obținute, viabilitatea conidiilor tulpinii *B. bassiana* CNMN-FE-01 scade cu aproximativ 150% la schimbarea valorii pH de la 6 la 7. Ulterior, rata de germinare crește la pH = 9 constituind 66% din rata de germinare la un pH = 5. Dacă multiplicăm concentrația conidiilor produse cu viabilitatea acestora, vom obține mai multe conidii viabile produse la pH = 6, chiar dacă viabilitatea totală este mai mică la valoarea pH = 6, comparativ cu viabilitatea la pH = 5. Astfel, pentru obținerea unui număr maxim de conidii viabile este recomandabil de a ajusta pH-ul mediului la valoarea 6. Cele mai răspândite tipuri de sol în Republica Moldova până la adâncimea de 40 cm au valori ale pH mai mari de 6, ceea ce presupune necesitatea ajustării dozelor de preparat aplicate de la caz la caz, în funcție de tipul de sol predominant. De asemenea, toleranța tulpinilor entomopatogene la diferite valori ale pH este importantă în cazul aplicării concomitente a preparatelor biologice cu preparatele chimice de control în scopul atingerii unui efect sinergic (Inglis *et al.*, 2001). Hemocelul insectelor expuse la pesticide chimice devine alcalin, astfel încât tulpinile de microorganisme entomopatogene utilizate trebuie să fie tolerante la aceste valori ale pH (Ferro, 1978).

4.4.4. Influența salinității și a presiunii osmotice asupra creșterii și dezvoltării tulpinii de fungi *Beuveria bassiana* CNMN-FE-01

Salinitatea solului poate avea efecte asupra eficacității agenților de control fungici, influențând rata de germinare și implicit procesul de patogeneză (Mert, Dizbay, 1997). Aspectul extern al coloniilor tulpinii fungice *B. bassiana* CNMN-FE-01, la a 5-a zi de la inoculare pe mediul nutritiv PDA, cu diferite concentrații de NaCl, este prezentat în imaginile de mai jos (figura 4.20).

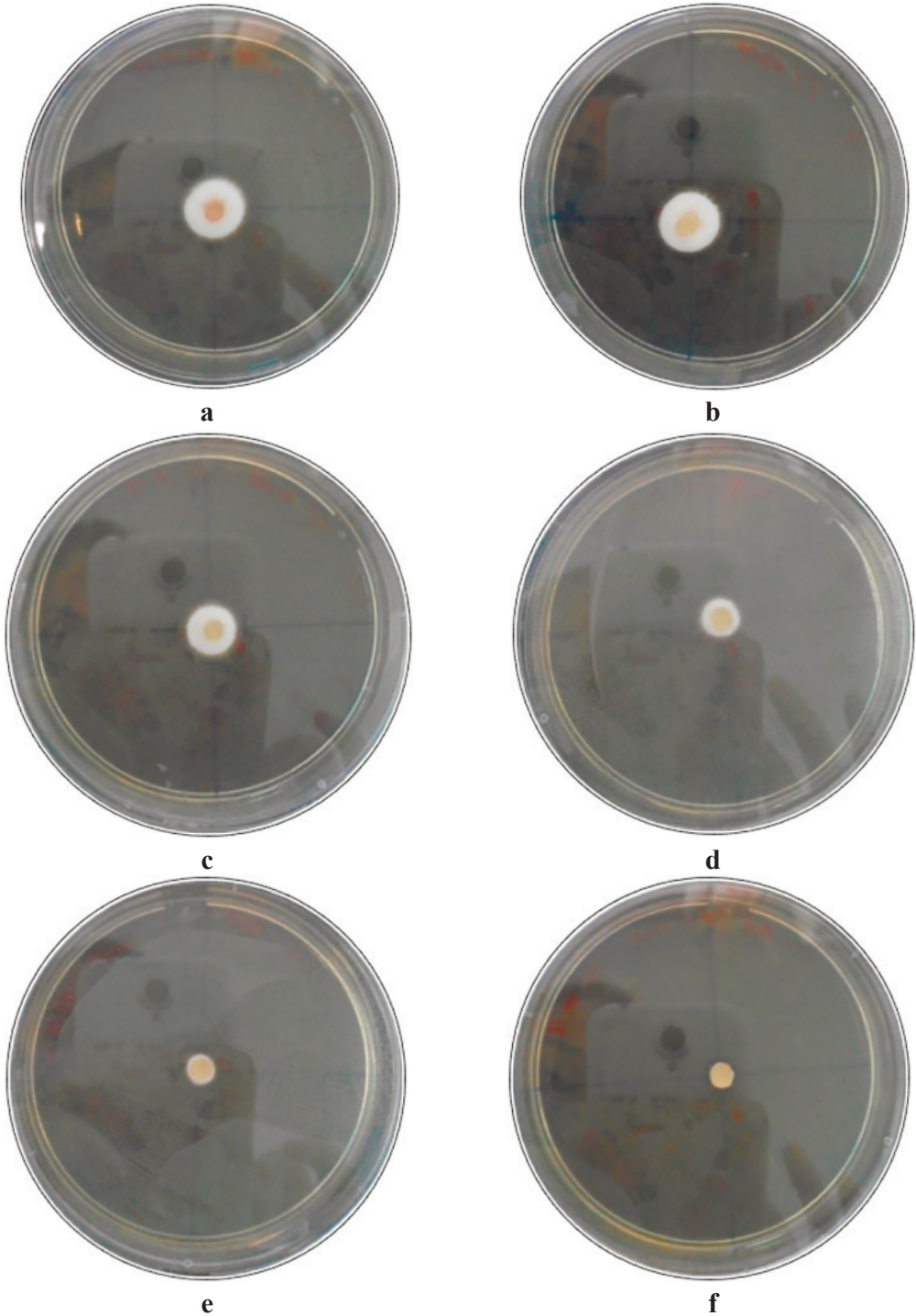


Fig. 4.20. Influența concentrației de NaCl asupra creșterii radiale a tulpinii fungice *B. bassiana* CNMN-FE-01, la a 5-a zi de la inoculare: a - 1% NaCl; b - 2% NaCl; c - 3% NaCl; d - 5% NaCl; e - 7% NaCl; f - 9% NaCl

Din imaginile prezentate (figura 4.20) poate fi observat efectul inhibitor al concentrațiilor de NaCl $\geq 3\%$, asupra creșterii vegetative a tulpinii fungice *B. bassiana* CNMN-FE-01. Acest efect se manifestă prin reducerea razei coloniilor tulpinii de funghi, odată cu creșterea concentrației de NaCl în mediul nutritiv. Analiza datelor a relevat faptul că creșterea radială a tulpinii fungice *B. bassiana* CNMN-FE-01 la diferite concentrații ale NaCl în mediul nutritiv urmează un model liniar. Nu există diferențe din punct de vedere statistic dintre valorile medii ale razei coloniei tulpinii CNMN-FE-01 la concentrațiile de 1-3% NaCl, comparativ cu martorul ($F(3,52) = 0,310, p = 0,818$).

Totodată, există diferențe semnificative din punct de vedere statistic dintre valorile medii ale razei coloniei tulpinii investigate în intervalul 0-9% NaCl în mediul de cultură ($F(6,91) = 7,307, p = 2,16 \times 10^{-6}$). Ca rezultat al analizei datelor privind viteza medie de creștere radială, a fost determinat faptul că, odată cu creșterea salinității mediului, viteza medie de creștere radială a tulpinii *B. bassiana* CNMN-FE-01 scade liniar.

Cultivarea timp de 90 de zile a tulpinii fungice pe medii nutritive cu concentrații 1-9% de NaCl a contribuit la reducerea cantității de conidii produse per unitate de suprafață, comparativ cu martorul. Soluția de 0,006M sporește cu 66% cantitatea de conidii produse și cu 29% viabilitatea acestora față de martor. Soluțiile de NaCl, cu concentrațiile de 0,06M și 0,6 M, reduc cantitatea de conidii produse și viabilitatea acestora față de martor. Însă viabilitatea sporilor este mai mică, comparativ cu celelalte cercetări efectuate în care conidiile au fost inoculate fără a fi menținute preventiv în soluții apoase timp de 24 h.

4.5. Dezvoltarea preparatelor insecticide pe baza tulpinilor autohtone de funghi entomopatogeni

Elaborarea și implementarea unor strategii alternative de combatere a insectelor dăunătoare constituie una dintre problemele stringente ale agriculturii contemporane și una din sarcinile majore înaintate biotehnologiilor verzi. Insecticidele chimice sunt aplicate extensiv, fiind cauza unor probleme semnificative ce țin de sănătatea umană, de poluarea mediului ambiant și reducerea biodiversității. Investigarea tulpinilor autohtone de micromicete entomopatogene în calitate de agenți de control biologic reprezintă o necesitate, în contextul dezvoltării sustenabile a agriculturii în Republica Moldova. Lista produselor de uz fitosanitar înregistrate în Republica Moldova include câteva preparate entomopatogene, de exemplu, Foray 48 B în baza bacteriei *Bacillus thuringiensis*, destinat pentru controlul lepidopterelor dăunătoare și produse autohtone de origine virală (VIRIN-KS, Virin-ABB-3, VIRIN-CP ș.a.) (Registrul de Stat al Produselor de Uz Fitosanitar și Fertilizanților). Chiar dacă se observă o tendință pozitivă, agenții microbieni de control biologic rămân o resursă insuficient utilizată pentru gestionarea dăunătorilor în Republica Moldova. Tulpinile autohtone de microorganisme, obținute din mediul natural, cu proprietăți fiziologice și biochimice avantajoase, pot reduce semnifi-

cativ costurile pentru a obține bioinsecticide și a 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. Din punctul 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.

În scopul dezvoltării agenților de control în baza tulpinilor autohtone de microorganismе entomopatogene, a fost elaborată și aplicată următoarea strategie experimentală (figura 4.21).

O etapă semnificativă care reprezintă baza oricărui program de control biologic al dăunătorilor pe bază de microorganismе este studiul aprofundat al agroecosistemului, biocenozei și biotopului, obținerea datelor cu privire la: fenologia dăunătorului, densitatea numerică maximă, pragul economic de dăunare, relațiile trofice existente, potențialii agenți naturali de control biologic, scopul fiind de a construi sinergii dintre biodiversitatea ecosistemului și tulpina de microorganismе aplicată în calitate de agent de control biologic (figura 4.21).

După definirea problemei, identificarea grupului de organismе, care pot fi utilizate cu succes în controlul biologic al dăunătorului, urmează etapa de obținere a agentului de control. Metodele de izolare a tulpinilor fungice trebuie să vizeze nu doar izolarea selectivă a entomopatogenilor, ci și caracterizarea complexelor de ciuperci din microflora fungică. Rezultatele obținute în cadrul cercetărilor din prezenta lucrare au demonstrat că o tulpină cu virulență maximă poate fi izolată în urma evidențierii spectrului deplin de fungi prezenți în microflora dăunătorului. Studiile recente au demonstrat că identificarea molecular-genetică este extrem de importantă pentru înțelegerea și valorificarea interacțiunilor gazdă-parazit. Multe specii de fungi prezintă caracteristici criptice, identificarea clasică nefiind capabilă de a face diferența dintre acestea (Vega *et al.*, 2012).

De la primele studii cu privire la izolarea și caracterizarea agenților fungici de control biologic până în prezent, în literatura de specialitate pot fi găsite date cu privire la izolarea tulpinilor de fungi entomopatogeni, identificarea acestora, informații cu privire la efectul insecticid, cerințele nutritive ale tulpinilor, persistența, eficacitatea în condiții de câmp. Însă puține dintre aceste tulpini au fost dezvoltate într-un preparat entomopatogen. Puține dintre studiile realizate la moment au o abordare holistică, multidisciplinară, orientată spre dezvoltarea unui agent de control biologic care poate fi aplicat cu succes. Scopul cercetărilor expuse în prezenta lucrare este de a depăși aceste impedimente, de a cerceta toate aspectele cheie în elaborarea unui preparat entomopatogen care și-ar păstra proprietățile insecticide în condiții de câmp.



Fig. 4.21. Strategia experimentală

Pentru elaborarea preparatelor sunt necesare următoarele acțiuni: de a selecta tulpinile de micromicete potențial entomopatogene, de a efectua testarea preliminară a susceptibilității dăunătorilor țintă la infecția cu aceste tulpini și identificarea tulpinilor cu activitate insecticidă maximă. Tulpinile selectate sunt caracterizate morfo-cultural, genotipic, fiziologic și biochimic, este determinată virulența acestora. Evaluarea activității insecticide în condiții de laborator permite de a determina momentul de aplicare, numărul de aplicări și doza necesară de a fi aplicată în condi-

ții de câmp pentru atingerea unui rezultat maxim. Astfel, ca rezultat al acestei etape, tulpinile sunt descrise și este caracterizat spectrul potențial de gazde.

Una dintre problemele majore ale aplicării entomopatogenilor este atenuarea virulenței drept rezultat al cultivării succesive *in vitro* (Butt, Goettel, 2000; Butt *et al.*, 2006). Astfel, o etapă importantă în obținerea preparatelor constă în elaborarea metodelor de cultivare, păstrare, multiplicare care să asigure menținerea proprietăților biotehnologice valoroase în timp.

De asemenea este important de a menține viabilitatea sporilor pe parcursul etapei de formulare, păstrare și aplicare a produsului final (Seaman, 1990; Boyetchko *et al.*, 1998; Lopez-Perez *et al.*, 2015; Muniz-Paredes *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2019). La etapele inițiale de dezvoltare a preparatelor entomopatogene, atenție maximă în schema tehnologică se acorda etapelor de izolare, identificare și caracterizare a entomopatogenilor din perspectiva producerii în masă a sporilor capabili de infecție. În funcție de tipul de spori (blastospori sau conidii) care posedă infectivitate maximă, se alege tipul de cultivare (la suprafață) sau în profunzime.

Odată ce tulpina este selectată și caracterizată, în baza ei este obținut un brevet de invenție (Kiewnick *et al.*, 2007). Datorită avansării științei în înțelegerea mecanismelor implicate și responsabile de activitatea microorganismelor în calitate de agenți de control biologic, la momentul actual, selectarea producătorului se bazează nu doar pe virulență, ci și pe anume trăsături care asigură supraviețuirea și infectivitatea în condiții de câmp (Kiewnick *et al.*, 2007; Lopez-Perez *et al.*, 2015; Muniz-Paredes *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2019). Caracterizarea tulpinilor urmează a fi realizată din perspectiva mediului în care acestea vor fi introduse, fiind selectate acele tulpini care pot supraviețui factorilor abiotici de stres și pot iniția procesul de patogenează în condițiile respective. Selectarea producătorului cu luarea în calcul a acestor particularități sporește semnificativ succesul etapelor ulterioare și simplifică procedura de formulare, astfel scăzând din costul produsului. Această etapă permite de a identifica factorii care pot limita eficiența agentului de control biologic în condiții de câmp și de a selecta aditivii necesari de a fi adăugați la spori fungici pentru a asigura stabilitatea produsului, protecția producătorului, sporind eficacitatea produsului (Kiewnick *et al.*, 2007; Lopez-Perez *et al.*, 2015; Muniz-Paredes *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2019). Astfel, biotehnologia nu doar oferă oportunitatea de a aplica entomopatogenii în calitate de agenți de control biologic, dar, de asemenea, oferă posibilități valoroase de a demonstra mecanismele de patogenitate, de a anticipa comportamentul agentului de control biologic în condiții de câmp deschis și de a oferi strategii de control al dăunătorilor eficiente și viabile.

Pentru a elabora tehnologia de producere și aplicare a preparatelor entomopatogene naturale pe bază de tulpini fungice autohtone, destinate controlului biologic al coleopterelor curculionide, au fost parcurse următoarele etape:

- a fost estimată susceptibilitatea insectelor țintă la infecția cu tulpinile fungice selectate;
- a fost evaluată activitatea insecticidă a tulpinii de funghi care a demonstrat proprietăți insecticide superioare;

- tulpina de fungi cu activitate insecticidă maximă a fost depusă în Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie în baza ei fiind obținut brevet de invenție;
- a fost evidențiată influența temperaturii asupra creșterii și dezvoltării tulpinii de fungi inclusiv influența asupra creșterii vegetative, influența temperaturii asupra sporulării și viabilității conidiilor după păstrare îndelungată;
- a fost caracterizată influența radiațiilor UV, pH-ului mediului, salinității și presiunii osmotice a mediului ambiant asupra creșterii și dezvoltării tulpinii de fungi selectate, inclusiv după păstrare îndelungată;
- a fost elaborată schema care sintetizează procedeul de producere și aplicare a agenților fungici de control biologic al coleopterelor curculionoide;
- au fost elaborate recomandări de aplicare a tulpinii de fungi în scopul controlului biologic al dăunătorilor.

Sunt cunoscute peste 750 de specii de micromicete entomopatogene, dar valorificate în scopuri industriale sunt de obicei câteva specii și de multe ori câteva tulpini. Marile companii producătoare de biopesticide preferă să recurgă la metodele de recombinare genetică pentru a crea tulpini cu spectru extins de acțiune și virulență sporită. La un pol este profitul companiilor, la celălalt pol sunt bunăstarea și siguranța financiară a fermierilor. În contextul celor menționate, selectarea tulpinilor autohtone virulente și producția locală de biopesticide reprezintă soluția orientată spre consumator care poate asigura o agricultură sustenabilă.

Rezultatele cercetărilor prezentate în această lucrare pot fi integrate într-un flux complex de proiectare, elaborare și producere a agenților fungici de control biologic al coleopterelor curculionoide. Primul pas a constat în realizarea cercetărilor științifice care au permis de a trece tulpina de fungi *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01 din potențial producător în producător confirmat (figura 4.22), iar al doilea pas a contribuit la elaborarea tehnologiei de producere a preparatului insecticid pe baza tulpinii *B. bassiana* CNMN-FE-01 (figura 4.22).

Selectarea tulpinii producător din componența preparatului bioinsecticid a presupus:

- screening-ul colecției de microorganisme entomopatogene privind activitatea insecticidă împotriva dăunătorilor *S. lineatus*, *H. postica* și *P. apricans*, în concentrație de 10^9 conidii/ml în intenția de a identifica tulpina potențial producătoare;
- confirmarea virulenței înalte în condiții controlate, valori ale parametruului LC50 mai mici, comparativ cu alte tulpini ($LC50 = 1,127 \times 10^4$ spori/ml), cantitatea de conidii/per individ mai redusă, comparativ cu alte tulpini ($0,969 \times 10^5$ conidii față de 1×10^7 conidii/per), viteza sporită de acțiune (atingerea valorii de 100% mortalitate la a 5-a zi, manifestarea simptomelor de patogeneză prin afectarea comportamentului trofic, încetarea hrănirii începând cu a doua zi din momentul aplicării suspensiei conidiale);
- depunerea tulpinii de fungi în Colecția Națională de Microorganisme Nepa-

togene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie și obținerea brevetului de invenție;

- elucidarea influenței temperaturii în scopul stabilirii necesității de utilizare în calitate de aditivi a agenților de umectare, absorbantilor, stabilirea temperaturii optime de cultivare pentru maximizarea producției de conidii, elaborarea recomandărilor de aplicare în teren deschis;
- elucidarea influenței radiațiilor UV în scopul stabilirii necesității utilizării agenților UV protectori, elaborarea recomandărilor de aplicare în teren deschis;
- elucidarea influenței valorii pH a mediului ambiant pentru identificarea pH-ului optim de cultivare pentru maximizarea producției de conidii, elaborarea recomandărilor de aplicare în teren deschis pe diferite tipuri de sol, în combinație cu pesticidele chimice;
- elucidarea influența salinității și osmolarității în scopul stabilirii regimului optim de cultivare, recomandări de aplicare în condiții de salinitate sporită a mediului ambiant;
- elucidarea condițiilor optime de păstrare și menținerea virulenței.

Rezultatele obținute au permis de a confirma tulpina de fungi *B. bassiana* CN-MN-FE-01 în calitate de tulpină producător.

Caracteristica producătorului: Tulpina de fungi *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill., 1912, CNMN-FE-01 prezintă colonii albe cu aspectul exterior lănos-flocoș sau catifelat spre pulverulent. Coloniile cu vârsta pot deveni de culoare gălbuie, uneori roșcate. Rareori produce exudat fără miros. Hifele submerse sunt hialine cu pereții netezi de aproximativ 1,5-3 μm lățime. Hifele miceliului aerian sunt, de asemenea, hialine cu pereții netezi de aproximativ 1-2 μm lățime, târătoare sau ascendente. Hifele poartă grupuri laterale de celule umflate cel mai des de 3-6 x 3-5 μm, care ulterior formează ramificații și dau naștere altor celule umflate mai mici sau 1-5 celule conidiogene. În cazul culturilor tinere, conidiile sunt strâns grupate, la culturile mai bătrâne ramurile devin mai răzlețe, celulele conidiogene apar în grupuri mici sau solitar pe celulele laterale elipsoidale sau cilindrice (de aproximativ 15 x 6 μm) sau direct din hife. Celulele conidiogene sunt globulare uneori alungite bazal (3-6 x 2,5-3,5 μm); celulele terminale cel mai des sunt subțiri cu axul central bine dezvoltat, de până la 20 μm lungime, geniculat sau neregulat îndoit, zimțat. Conidiile hialine uneori de culoare gălbuie, netede, globulare spre elipsoide uneori cu o bază apicală (1,5 -) 2 - 3 (- 4) x (1,5 -) 2 - 2,5 (- 3) μm. Clamidospori nu au fost observați. Poate fi cultivată pe mediul cartof-glucoză-agar. Coloniile timp de 8 zile ating diametrul de 3,05 ± 0,14 cm.

Caracteristica mediului nutritiv: Pentru cultivarea tulpinii este cu succes aplicat mediul PDA (cartof-glucoză-agar) care permite a produce o cantitate semnificativă de conidii. Temperatura optimă de cultivare este 25°C, valoarea optimă pH = 6. Ajustarea pH-ului mediului nutritiv permite de a spori cu 14% cantitatea de conidii viabile recoltate (de la 0,846 × 10⁸ la 0,962 × 10⁸ conidii/cm²). Deoarece conidiile (forma cu infectivitate maximă) se produc aerian, tulpina *B. bassiana* CN-MN-FE-01 urmează a fi cultivată pe mediu solid.

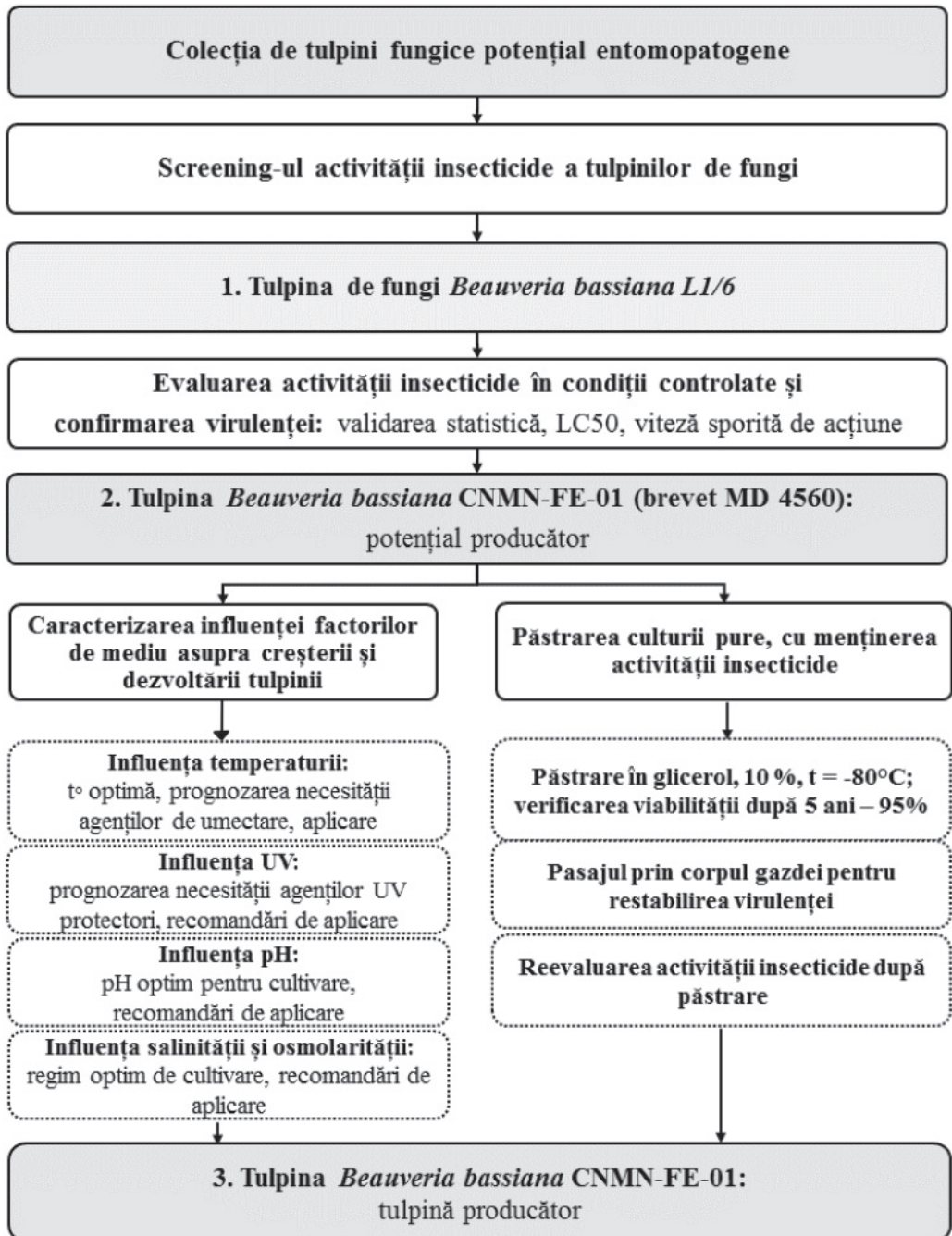


Fig. 4.22. Etapele procesului de selectare a tulpinii producător

Condiții de păstrare și menținere a virulenței: este obținută și menținută cultura pură fungică provenită dintr-un singur spor, astfel garantând existența unui singur genotip virulent și nu a unei comunități de tulpini din aceeași specie. Tulpina *B. bassiana* CNMN-FE-01 poate fi cu succes păstrată fără a-și pierde virulența și viabilitatea, în eprubete de 2-5 ml cu glicerol, 10%, timp de 5 ani, la $t^{\circ} = -80^{\circ}\text{C}$. Cultura starter poate fi menținută în frigider la $t^{\circ} = 4^{\circ}\text{C}$, evitând reinocularea repetată timp de 2 ani, cu menținerea virulenței și viabilității. Pentru a menține virulența, o dată la 2-3 reinoculări este efectuat pasajul prin corpul gazdei și recuperarea tulpinii.

Pentru a optimiza procesul de producție și a reduce costurile asociate urmează a fi evaluată producerea de conidii pe mediul nutritiv cartof-glucoză-agar, preparat din ingredientele inițiale de sinestătător sau substraturi solide precum, orz, orez, mazăre, grâu etc. După sporularea completă are loc deshidratarea mediului și recoltarea conidiilor. Pentru speciile din genul *Beauveria*, cultivarea pe substrat durează în medie 10 zile, se recoltează cu o spatulă și se separă de miceliu prin cernere (Wenzel Rodrigues *et al.*, 2016; Jaronski, Mascarin, 2017). Micromicetele entomopatogene cel mai des se produc sub formă de praf umectabil (WP), care conține 50-80% agent bioactiv, 15-45% agent de umplere, 1-10% agent dispersie și 3-5% surfactant (Burges, 1998). Acest tip de formulă se amestecă cu apa și poate fi aplicat cu ajutorul unor pulverizatoare standard sau pompe hidraulice. De asemenea, preparatul poate fi aplicat direct pe sol (Burges, 1998). Ținând cont de influența temperaturii și umidității asupra viabilității conidiilor în formula preparatului, urmează a fi introdus un absorbant (e.g. clorură de calciu, silicagel, sulfat de magneziu, cărbune alb, sulfat de sodiu). Conform datelor din literatura de specialitate, dintre toate materialele testate eficiența maximă posedă cărbunele alb, care asigură menținerea viabilității conidiilor la temperatura camerei timp de 60 de zile (Skinner, Parker, Kim, 2014). Astfel, cea mai simplă formulă a preparatului entomopatogen pe baza tulpinii locale de *B. bassiana* CNMN-FE-01 ar putea presupune utilizarea silicagelului sau cărbunelui alb în calitate de aditiv. Pentru a spori eficacitatea formulei poate fi cercetată în continuare posibilitatea adăugării uleiului vegetal, care va prelungi termenul de păstrare, va spori eficacitatea prin favorizarea aderării conidiilor la cuticula insectei și stimularea germinării (Batesman *et al.*, 1993). Acest lucru poate fi obținut prin simpla adăugare a uleiurilor vegetale, uleiului de parafină sau uleiului mineral la praful umectabil (Moore *et al.*, 1995; Morley-Davis, Moore, Prior, 1995; Skinner, Parker, Kim, 2014; de Oliveira *et al.*, 2018). De exemplu, biopesticidele Naturalis-L® (*B. bassiana*) și Green Muscle® (*M. anisopliae*) utilizează uleiul de soia în acest sens (McClatchie *et al.*, 1994). Uscarea conidiilor de *B. bassiana* prin adăugarea silicagelului la formula în ulei, sporește toleranța față de temperaturile înalte și termenul de valabilitate a produselor pe bază de ulei (Shimizu, Mitani, 2000; Lopes, Faria, 2019). A fost de asemenea studiată utilizarea metiloleatului în calitate de agent de umectare și emulsifiere și a uleiurilor de porumb, bumbac și parafină în calitate de aditivi (Kim *et al.*, 2011b; Skinner, Parker, Kim, 2014).

Recomandări de aplicare a preparatului entomopatogen pe baza tulpinii de fungi *B. bassiana* CNMN-FE-01

Metoda de aplicare utilizată influențează eficiența tratamentului. Trebuie luați în considerare mai mulți factori, inclusiv distribuția sporilor și acoperirea pentru a se asigura că dăunătorul vine în contact cu ciuperca și condițiile de mediu favorizează supraviețuirea și germinarea micromicetei înainte, în timpul și după aplicare. Principalele metode de aplicare sunt pulverizarea foliară, tratarea solului și scufundarea plantei sau rădăcinilor. Pulverizarea este metoda mai des utilizată pentru aplicarea bioinsecticidelor microbiene, deoarece presupune utilizarea echipamentului standard și este familiară pentru fermieri. În cazul aplicării preparatului în teren deschis, se va recomanda de a efectua pulverizarea dimineața devreme, beneficiind de umiditatea sporită, pentru a favoriza infecția, a proteja tulpina de razele UV și temperatura excesivă și de a asigura faptul că insectele în procesul deplasării vor intra în contact cu conidiile.

Studiile ulterioare vor urmări testarea diferitor formule ale preparatului entomopatogen în condiții de teren deschis, argumentarea detaliată a prețului de cost care va include cheltuielile legate de menținerea culturii, multiplicarea ei și costurile asociate aditivilor din formula preparatului. De asemenea vor fi elaborate recomandări detaliate privind aplicarea în diverse culturi agricole afectate de speciile de curculionide incluse în studiu.

CONCLUZII

Problemele de mediu și cele legate de sănătatea umană, asociate cu utilizarea la scară largă a insecticidelor chimice, pot fi soluționate prin orientarea spre metodele biologice de combatere a dăunătorilor. Unul dintre grupurile de agenți biologici de control al insectelor dăunătoare, aflat în vizorul cercetătorilor, sunt fungii entomopatogeni. Crearea unor colecții locale de tulpini fungice reprezintă una dintre etapele esențiale pentru asigurarea fermierilor cu preparate biologice de uz fitosanitar. Tulpina nouă de fungi *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01 posedă activitate insecticidă și virulență sporită asupra dăunătorului *Sitona lineatus*. La mortalitatea de 100%, cantitatea de conidii aplicată este de 100 de ori mai mică, iar viteza de acțiune mai mare, comparativ cu cea mai apropiată soluție, ceea ce ar permite reducerea prețului preparatului entomopatogen și minimizarea inputurilor în agroecosistem.

Cercetările urmează a fi continuate pentru a izola noi tulpini cu virulență sporită. Identificarea acestora, folosind metode molecular-genetice de analiză, va permite de a cunoaște identitatea exactă a producătorului și de a proteja ulterior drepturile de autor prin brevetare. Un pas important este determinarea spectrului fiziologic și ecologic de gazde pentru evaluarea beneficiilor și riscurilor asociate cu introducerea biopesticidelor în agroecosisteme, oferind fermierilor soluții viabile pe termen lung. Tulpinile producător urmează a fi caracterizate din prisma mediului potențial receptor, studiind proprietățile fiziologice ale acestora, dezvoltând strategii adecvate de aplicare în diverse condiții abiotice. Cercetările expuse în prezenta lucrare reprezintă o foaie de parcurs spre valorificarea potențialului fungilor entomopatogeni în asigurarea unei agriculturi sustenabile. Tulpina *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01 posedă proprietăți tehnologice avantajoase precum: păstrarea virulenței în timp, păstrarea viabilității în timp în diverse condiții ale mediului ambiant, servind drept bază pentru elaborarea procedurii de obținere și a recomandărilor de aplicare a preparatului insecticid, destinat controlului biologic al coleopterelor curculionoide.

BIBLIOGRAFIE

1. ABBOTT, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. In: *Journal of Economic Entomology*, vol. 18, nr. 2, pp. 265-267. e-ISSN 1938-291X.
2. ABROL, D. P., SHANKAR, U. 2012. Chapter 1. History overview and principles of ecologically based pest management. In: ABROL D. P., SHANKAR U., eds. *Integrated Pest Management: Principles and Practice*, pp. 1-26. ISBN 978-1-84593-808-6.
3. AESCHLIMANN, J.P. 1980. The *Sitona* [Col.: Curculionidae] species occurring on *Medicago* and their natural enemies in the Mediterranean region. In: *Entomophaga*, vol. 25, pp. 139-153. ISSN 0013-8959.
4. AFANDHI, A., WIDJAYANTI, T., EMI, A.A.L., TARNO, H., AFIYANTI, M., HAN-DOKO, R. S. N. 2019. Endophytic fungi *Beauveria bassiana* Balsamo accelerates growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In: *Journal of Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, vol. 6, nr. article 11. e-ISSN 2196-5641. Disponibil: <https://doi.org/10.1186/s40538-019-0148-1>
5. AIME, M. C., MATHENY, P. B., HENK, D. A., FRIEDERS, E. M., NILSSON, R. H., PIEPENBRING, M., MCLAUGHLIN, D. J., SZABO, L. J., BEGEROW, D., SAMPAIO, J. P., BAUER, R., WEIB, M., OBERWINKLER, F., HIBBETT, D. 2006. An overview of the higher level classification of Pucciniomycotina based on combined analyses of nuclear large and small subunit rDNA sequences. In: *Mycologia*, vol. 98, pp. 896-905. e-ISSN 1557-2536, ISSN 0027-5514.
6. AINSWORTH, G. C. 1976. *Introduction to the history of mycology*. Cambridge University Press, 359 p. ISBN 978-0521-21-013-3.
7. AIZAWA, K. 2001. Shigetane Ishiwata: his discovery of sotto-kin (*Bacillus thuringiensis*) in 1901 and subsequent investigations in Japan. In: *Proceedings of a Centennial Symposium Commemorating Ishiwata's Discovery of Bacillus thuringiensis*. Japan: Kurume. November 1-3.
8. ALEXOPOULOS, C. J., MIMS, C. W., BLACKWELL, M. 1996. *Introductory Mycology*. New York: eds. John Wiley & Sons. 880 p. ISBN 978-0-471-52229-4.
9. ALI, S., HUANG, Z., REN, S. 2010. Production of cuticle degrading enzymes by *Isaria fumosorosea* and their evaluation as a biocontrol agent against diamondback moth. In: *Journal of Pest Science*, vol. 83, pp. 361-370. e-ISSN 1612-4766, ISSN 1612-4758.
10. ALIMDZHANOV, R.A. 1951. *Klubenkovye dolgonosiki Uzbekistana*. Tashkent: Izd. AN UzSSR, 183 p.
11. ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W., LIPMAN, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. In: *Journal of Molecular Biology*, vol. 215, nr. 3, pp. 403-410. ISSN 0022-2836.
12. ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHAFFER, A.A., ZHANG, Z., MILLER, W., LIPMAN, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. In: *Nucleic Acids Research*, vol. 25, pp. 3389-3402. e-ISSN 1362-4962, ISSN 0305-1048.
13. *Anexa III, Convenția de la Rotterdam privind procedura de consimțământ prealabil în cunoștință de cauză aplicabilă anumitor produși chimici periculoși și pesticide care fac obiectul comerțului internațional* [online]. Secretariat of the Rotterdam Convention – FAO [citât 04.04.2020]. Disponibil: <http://www.pic.int/TheConvention/Chemicals/AnnexIIIChemicals/tabid/1132/language/en-US/Default.aspx>
14. ANTONELLI, A., RETAN, A., O'KEEFFE, L.E., JOHANSEN, C. 1985. Pea leaf weevil: its biology and control. In: *Extension Bulletin 0903E* [online]. Washington State University, 3 p. [citât 07.06.2017]. Disponibil: <https://research.wsulibs.wsu.edu/xmlui/bitstream/handle/2376/5245/eb0903e.pdf?sequence=1>

15. *Anuarul statistic al Republicii Moldova* [online]. Chișinău: Biroul Național de Statistică al Republicii Moldova (Tipogr. "MS Logo"), col. red. VALCOV V. (președinte) et al., 2019, 472 p. [citat 07.06.2020]. ISBN 978-9975-53-928-9. Disponibil: https://statistica.gov.md/public/files/publicatii_electronice/Anuar_Statistic/2019/Anuarul_statistic_2019.pdf
16. *Anuarul statistic al României* [online]. București: Institutul Național de Statistică al României, col. red.: TUDOREL A. (președinte) et al. 2019, 704 p. [citat 08.06.2020] ISSN 1220-3246. Disponibil: https://insse.ro/cms/sites/default/files/field/publicatii/anuarul_statistic_al_romaniei_carte_ro_1.pdf
17. ARBELI, Z., FUENTES, C. L. 2007. Improved purification and PCR amplification of DNA from environmental samples. In: *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 272, pp. 269-275. e-ISSN 1574-6968, ISSN 0378-1097. Disponibil: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00764.x>
18. ARIF, B. 2005. A brief journey with insect viruses with emphasis on baculoviruses. In: *Journal of Invertebrate Pathology* Vol. 89, pp. 39-45. e-ISSN 1096-0805, ISSN 0022-2011.
19. ARMBRUST, E. J., WHITE, C. E., DEWITT, J. B. 1969. Lethal limits of low temperatures for the alfalfa weevil in Illinois. In: *Journal of Economic Entomology*, vol. 69, pp. 464-467. e-ISSN 1938-291X.
20. ARNOLDI, L.V., ZASLAVSKIY, V.A., TER-MINASYAN, M.E. 1965. Semeystvo Curculionidae – Dolgonosiki. In: BEJ-BIJENKO, V.G. ed., *Opredeliteli nasekomykh Evropeiskoi ciasti SSSR. Vol 2. Zhestkokrylye i veerokrylye*. Moskva, Leningrad: Nauka, pp. 485-621. [în l. rusă].
21. ARTHURS, S.P., THOMAS, M.B., LAWTON, J.L. 2001. Seasonal patterns of persistence and infectivity of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* in grasshopper cadavers in the Sahel. In: *Entomologia Experimentalis et Applicata*, vol. 100, nr.1, pp. 69-76. e-ISSN 1570-7458.
22. ATHANASSIOU, C.G., KAVALLIERATOS, N.G., RUMBOS, C.I., KONTODIMAS, D.C. 2017. Influence of temperature and relative humidity on the insecticidal efficacy of *Metarhizium anisopliae* against larvae of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) on wheat. In: *Journal of Insect Science*, vol. 17, nr. 1, nr. article 22, 7 p. e-ISSN 1536-2442. Disponibil: <https://doi.org/10.1093/jisesa/iew107>
23. BACAL, S., COCÎRȚĂ, P., MUNTEANU, N. 2014. *Metode și echipament de colectare a artropodelor. Ghid științifico-practic*. Chișinău: Tipografia AȘM, 52 p. ISBN 978-9975-62-380-3.
24. BALANDINA, E.V. 2007. *Vidovoy sostav vreditel'ey kozlyatnika vostochnogo i priemy bori-by s nimi v Preduralie*: avtoreferat doktorskoj dissertatsii. Moskva, Spetsialnosti: Zashchita rasteniy, VAK 06.01.11. [în l. rusă].
25. BAMISILE, S.B. AKUTSE, K.S., SIDDIQUI, J.A., XU, Y. 2021. Model Application of Entomopathogenic Fungi as Alternatives to Chemical Pesticides: Prospects, Challenges, and Insights for Next-Generation Sustainable Agriculture. In: *Front. Plant Sci.*, vol. 12, art. 741804. e-1664-462X.
26. BARDNER, R., FLETCHER, K.E. 1979. Larvae of the pea and bean weevil, *Sitona lineatus*, and the yield of field beans. In: *The Journal of Agricultural Science*, vol. 92, pp. 109-112. e-ISSN 1469-5146, ISSN 0021-8596. Disponibil: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2021.741804/full>
27. BARDNER, R., FLETCHER, K.E., GRIFFITHS, D.C. 1983. Chemical control of the pea and bean weevil, *Sitona lineatus* L., and subsequent effects on the yield of field beans, *Vicia faba* L. In: *The Journal of Agricultural Science*, vol. 101, pp. 71-80. e-ISSN 1469-5146, ISSN 0021-8596.
28. BARNES, A. I., SIVA-JOTHY, M. T. 2010. Density-dependent prophylaxis in the mealworm beetle *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae): cuticular melanization is an indicator of investment in immunity. In: *Proc. R. Soc. Lond.* vol. 267, pp. 177-182. e-ISSN 1471-2954. Disponibil: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1690519/pdf/10687824.pdf>

29. BARRA-BUCAREI, L., FRANCE, A., MILLAS, P. 2019a. Crossing Frontiers: Endophytic Entomopathogenic Fungi for Biological Control of Plant Diseases, In: HODKINSON, T. *et al.* (Ed.), *Endophytes for a Growing World*, Cambridge: Cambridge University Press, pp. 67-92. E-ISBN 978-1108-607-667.
30. BASIGALUP, D., GILETTA, M., ODORIZZI, A., AROLFO, V., SANCHEZ, F., URRETS ZAVALIA, G. 2018. An overview of alfalfa (*Medicago sativa* L.) situation in Argentina. In: *Proceedings of Second World Alfalfa Congress*. 11-14 November, 2018, Cordoba, Argentina, pp. 25-29. Disponibil: <http://www.worldalfalfacongress.org/resumenenes.pdf>
31. BATEMAN, R.P., CAREY, M., MOORE, D., PRIOR, C. 1993. The enhanced infectivity of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations to desert locusts at low humidities. In: *Annals of Applied Biology*, vol. 12, pp. 145-152. e-ISSN 1744-7348.
32. BEAKES, G. W., SEKIMOTO, S. 2009. The evolutionary phylogeny of Oomycetes e insights gained from studies of holocarpic parasites of algae and invertebrates. In: K. LAMOUR & S. KAMOUN (Eds.), *Oomycete Genetics and Genomics. Diversity, Interactions and Research Tools*. New York: John Wiley & Sons. pp. 1-24.
33. BEDDING, R.A., MOLYNEUX, S. 1982. Penetration of insect cuticle by infective juveniles of *Heterorhabditis* spp. (Heterorhabditidae: Nematoda). In: *Nematologica*, vol. 28, pp. 354-359. e-ISSN 1875-2926, ISSN 0028-2596.
34. BEEGLE, C. C., YAMAMOTO, T. 1992. Invitation paper (C.P. Alexander Fund): History of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development. In: *Can. Entomol.*, vol. 124, pp. 587-616. e-ISSN 1918-3240, ISSN 0008-347X. Disponibil: <https://doi.org/10.4039/Ent124587-4>
35. BEGUIER, V., GUILLEMOT, E., JULIER, B. 2018. Alfalfa forage quality breeding in France: 30 years of common efforts from seed industry, dehydration industry and public research. In: *Proceedings of Second World Alfalfa Congress*. 11-14 November, 2018, Cordoba, Argentina, pp. 111-115. Disponibil: <http://www.worldalfalfacongress.org/resumenenes.pdf>
36. BELL, A. S., BLANFORD, S., JENKINS, N., THOMAS, M. B., READ, A. F. 2009. Real-time quantitative PCR for analysis of candidate fungal biopesticides against malaria: Technique validation and first applications. In: *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 100, pp. 160-168. e-ISSN 1096-0805, ISSN 0022-2011. Disponibil: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022201109000196?via%3Dihub>
37. BELYAEV, I.M. 1934. Gorokhovye sloniki. In: *Byull. Mosk. s.-kh. oblastnoy opyt. st. Polevodstva*, n. 2, s. 122-126. [în l. rusă]
38. BEN SAAD, A.A., BISHOP, G.W. 1969. Egg-laying by the alfalfa weevil in weeds. In: *Journal of Economic Entomology*, vol. 62, pp. 1226-1227. e-ISSN 1938-291X.
39. BENJAMIN, R. K., BLACKWELL, M., CHAPELA, I. H., HUMBER, R. A., JONES, K. G., KLEPZIG, K. D., LICHTWARDT, R. W., MALLOCH, D., NODA, H., ROEPER, R. A., SPATAFORA, J. W., WEIR, A. 2004. The search for diversity of insects and other arthropod associated fungi. In: G. M. MUELLER, G. F. BILLS, M. S. FOSTER (Eds.), *Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods*. New York: Elsevier Academic Press. pp. 395-433.
40. BENNETT, B.C. 2011. Twenty-five economically important plant families [online]. *Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)*. [citat 08.09.2018]. Disponibil: <http://www.eolss.net/sample-chapters/c09/e6-118-03.pdf>
41. BENZ, G. 1986. Introduction: historical perspectives. In: R. GRANADOS, B. A. FEDERICI (Eds.), *The Biology of Baculoviruses, Vol. 2. Practical Application for Insect Control*. Boca Raton: CRC Press. pp. 1-35.
42. BERBEE, M. 2001. The phylogeny of plant and animal pathogens in the Ascomycota. In: *Physiological and Molecular Plant Pathology*. vol. 59 (4), pp. 165-187. ISSN 0885-5765. Disponibil: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0885576501903558>

43. BERBEE, M. L., TAYLOR, J. W. 2010. Dating the molecular clock in fungi e how close are we? Fungal In: *Biol. Rev.*, vol. 24, pp. 1-16. e-ISSN 1469-185X. Disponibil: <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2010.03.001>
44. BERGOLD, G. 1947. Die Isolierung des Polyeder-virus und die Natur der Polyeder. In: *Z. Naturforsch.*, vol. 2 b, pp. 122-143. ISSN 0939-5075. Disponibil: https://zfn.mpg.de/data/Reihe_B/2/ZNB-1947-2b-0122.pdf
45. BERNY, P. 2007. Pesticides and the intoxication of wild animals. In: *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* [online], vol. 30, pp. 93-100 [citat 09.10.2018]. e-ISSN 1365-2885. Disponibil: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2007.00836.x>
46. BEZDICEK, D.F., QUINN, M.A., FORSE, L., HERON, D., KAHN, M.L. 1994. Insecticidal activity and competitiveness of *Rhizobium* spp. containing the *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* δ -endotoxin gene (cryIII) in legume nodules. In: *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 26, pp. 1637-1646. ISSN 0038-0717.
47. BEZVAL, V. 1912. *O vrednykh nasekomykh i merakh boriby s nimi*. Kishinev: Tip. gubern. Pravleniya, 9 s. [în l. rusă].
48. BIDOCHKA, M. J., CLARK, D. C., LEWIS, M. W., KEYHANI, N. O. 2010. Could insect phagocytic avoidance by entomogenous fungi have evolved via selection against soil amoeboid predators? In: *Microbiology*, vol. 156, pp. 2164-2171. e-ISSN 1465-2080, ISSN 1350-0872. Disponibil: <https://doi.org/10.1099/mic.0.038216-0>
49. BIDOCHKA, M. J., PFEIFER, T. A., KHACHATOURIANS, G. G. 1987. Development of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in liquid cultures. In: *Mycopathologia*, vol. 99, pp. 77-83. e-ISSN 1573-0832, ISSN 0301-486X.
50. BIDOCHKA, M. J., SMALL, C. L. 2005. Phylogeography of *Metarhizium*, an insect pathogenic fungus. In: F. E. VEGA, M. BLACKWELL (Eds.), *Insect-Fungal Associations: Ecology and Evolution* (. New York: Oxford University Press. pp. 28-50.
51. BILGRAMI, A.L., GAUGLER, R. 2007. Effects of various stress factors on heat tolerance by *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae*. In: *Nematology*, vol. 9, pp. 161-167. e-ISSN 1568-5411, ISSN 1388-5545.
52. BLACKWELL, M. 2011. The fungi: 1, 2, 3, . 5.1 million species? In: *Am. J. Bot.*, vol. 98, pp. 426-438. e-ISSN 1537-2197, ISSN 0002-9122.
53. BLACKWELL, M., HIBBETT, D. S., TAYLOR, J. W., SPATAFORA, J. W. 2006. Research coordination networks: a phylogeny for the kingdom Fungi (Deep Hypha). In: *Mycologia*, vol. 98, 829-837. e-ISSN 1557-2536, ISSN 0027-5514.
54. BONDARENCO, N.N. 1986. *Biologhicheskaja zashcita rastenij*. - 2-e izd., pererab. i dop. - M.: Agropromizdat, 1986. - 278 s., il. - (Uchebniki i ucheb. posobija dlja vyssh. ucheb. zavedenij). [în l. rusă].
55. BOOMSMA, J. J., JENSEN, A. B., MEYLING, N. V., EILENBERG, J. 2014. Evolutionary Interaction Networks of Insect Pathogenic Fungi. In: *Annual Review of Entomology*, vol. 59:1, pp. 467-485. e-ISSN 1545-4487. Disponibil: <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011613-162054>
56. BOSCH van den, R., MESSENGER, P.S., GUTIERREZ, A.P. 1982. *An introduction to biological control*. New York and London: Plenum Press, 247 p. ISBN 978-1-4757-9162-4.
57. BOTHA, J., HARDIE, D., CASELLA, F. 2004. The pea leaf weevil, *Sitona lineatus*: Exotic threat to Western Australia. In: *Plant Health Australia*. Disponibil: <https://www.planthealthaustralia.com.au/wp-content/uploads/2013/03/Pea-leaf-weevil-CP-2005.pdf>
58. BOUCIAS, D. G., PENDLAND, J. C. 1991. Attachment of mycopathogens to cuticle. The initial event of mycoses in arthropod hosts. In: G. T. COLE H. C. HOCH (Eds.), *The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals*. New York: Plenum Press. pp. 101-127. e-ISSN 978-1-4899-2635-7. Disponibil: https://doi.org/10.1007/978-1-4899-2635-7_5

59. BOUCIAS, D. G., STOKES, C., STOREY, G., PENDLAND, J. C. 1996. The effects of imidacloprid on the termite *Reticulitermes flavipes* and its interaction with the mycopathogen *Beauveria bassiana*. In: *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, vol. 49, pp. 103-144.
60. BOUCIAS, D.G., PENDLAND J.C. 1998. *Principles of insect pathology*. Kluwer Academic Publishers. 558 p. ISBN 978-1-4613-7229-5.
61. BOYETCHKO, S., PEDERSEN, E., PUNJA, Z., REDDY, M. 1999. Formulation of Biopesticides. In: HALL, F.R., Menn, J.J. eds., *Biopesticides: Use and Delivery Methods in Biotechnology*. Totowa, New Jersey, USA: Humana Press, pp.487-508. e-ISBN 978-1-59259-483-2, ISBN 978-0-89603-515-7.
62. BRAGA, G.U.L., FLINT, S.D., MESSIAS, C.L., ANDERSON, A.J., ROBERTS, D.W. 2001. Effects of UV-B irradiance on conidia and germinants of the entomopathogenic Hypomyces *Metarhizium anisopliae*: a study of reciprocity and recovery. In: *Photochemistry and Photobiology*, vol. 73, pp. 140-146. e-ISSN 1751-1097.
63. BROWN, A.H.S., SMITH, G. 1957. The genus *Paecilomyces* Bainier and its perfect stage *Byssochlamys* Westling. In: *Transactions of the British Mycological Society*, vol. 40, 1, pp. 17-89. ISSN 0007-1536.
64. BUCUREAN, E. 2008. Structure of the pest entomofauna of red clover seed and control of the clover weevils. In: *An. Univ. din Oradea, Fascicula: Protecția Mediului*, vol. 13, pp. 31-37. ISSN 1584-9864.
65. BURGESS, H.D. 1998. Formulation of mycoinsecticides. In: BURGESS, H.D. ed., *Formulation of Microbial Biopesticides: Beneficial Microorganisms, Nematodes and Seed Treatments*. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishing, pp. 131-186. ISBN 978-94-011-4926-6.
66. BUSTAMANTE de, O. M., LEIVA, S., MENDOZA, J.E., BOBADILLA, L., ANGULO, G., CALDERON, M.S. 2019. Phylogeny and species delimitations in the entomopathogenic genus *Beauveria* (Hypocreales, Ascomycota), including the description of *B. peruviensis* sp. nov. In: *MycKeys*, vol. 58, pp. 47-68. e-ISSN 1314-4049, ISSN 1314-4057.
67. BUTT, T.M. 2002. Use of entomogenous fungi for the control of insect pests. In: KEMPKEN F. ed., *The Mycota XI, Agricultural Applications*. Berlin: Springer, pp. 111-134. ISBN 978-3-662-03059-2.
68. BUTT, T.M., GOETTEL, M.S. 2000. Bioassays of Entomogenous Fungi. In: NAVON, A., ASCHER K. R. S. eds., *Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes*. Wallingford, United Kingdom: CABI Publishing, pp. 141-195. ISBN 978-0-851-99422-2.
69. BUTT, T.M., WANG, C., SHAH, F. A., HALL, R. 2006. Degeneration of entomogenous fungi. In: EILENBERG J., HOKKANEN H. M. T. eds., *An Ecological and Societal Approach to Biological Control*. Dordrecht, Netherlands: Springer, pp. 213-226. ISBN 978-1-4020-4401-4.
70. CAMPBELL, W.V., BUSBICE, T.H., FALTER, J.M., GLOVER, J.W. 1975. Alfalfa weevil and its management in North Carolina. North Carolina Agric. Exp. St. Tech. Bull. No. 234.
71. CANTOT, P. 1989. Action larvaire de *Sitona lineatus* L. sure quelques facteurs de production du pois proteagineux (*Pisum sativum* L.). In: *Agronomie*, vol.9, pp. 765-770. ISSN 0249-5627.
72. CARCAMO, H., VANKOSKY, M. Managing the pea leaf weevil in field peas. In: *Prairie Soils Crops*. 2011, vol. 4, pp. 77-85. Disponibil: <https://prairiesoilsandcrops.ca/articles/volume-4-9-screen.pdf>
73. CARCAMO, H.A., HERLE, C.E., LUPWAYI, N.Z. 2015. *Sitona lineatus* (Coleoptera: Curculionidae) larval feeding on *Pisum sativum* L. affects soil and plant nitrogen. In: *Journal of Insect Science*, vol. 15, nr. 1, article nr. 74, 5 p. e-ISSN 1536-2442. Disponibil: <https://doi.org/10.1093/jisesa/iev055>
74. CARCAMO, H.A., VANKOSKY, M.A., WIJERATHNA, A., OLFERT, O.O., MEERS, S.B., EVENDEN, M.L. 2018. Progress toward integrated pest management of pea leaf weevils.

- vil: a review. In: *Annals of the Entomological Society of America*, vol. 111, nr. 4, pp. 144-153. e-ISSN 1938-2901, ISSN 0013-8746.
75. CASSAGRANDE, R.A., STEHR, F.W. 1973. Evaluating the effects of harvesting alfalfa on alfalfa weevil (Coleoptera: Curculionidae) and parasite populations in Michigan. In: *Canadian Entomologist*, vol. 105, pp. 1119-1128. e-ISSN 1918-3240, ISSN 0008-347X.
76. CASTELLANOS-MOGUEL, J., MIER, T., REYES-MONTES, M., NAVARRO BARRANCO, H., ZEPEDA RODRÍGUEZ, A., PÉREZ-TORRES, A., TORIELLO, C. 2013. Fungal growth development index and ultrastructural study of whiteflies infected by three *Isaria fumosorosea* isolates of different pathogenicity. In: *Revista Mexicana de Micología*, vol. 38, pp. 23-33. ISSN 0187-3180.
77. CASTRILLO, L. A., THOMSEN, L., JUNEJA, P., HAJEK, A. E. 2007. Detection and quantification of *Entomophaga maimaiga* resting spores in forest soil using real-time PCR. In: *Mycol. Res.*, vol. 111, pp. 324-331. e-ISSN 1469-8102, ISSN 0953-7562. Disponibil: <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.01.010>
78. CASTRILLO, L., GRIGGS, M. H., VANDENBERG, J. D. 2008. Quantitative detection of *Beauveria bassiana* GHA (Ascomycota: Hypocreales), a potential microbial control agent of the emerald ash borer, by use of real-time PCR. In: *Biol. Control*, vol. 45, pp. 163-169. ISSN 1049-9644. Disponibil: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.01.005>
79. CHANDRA TEJA, K.N.P., RAHMAN, D.S.J. 2016. Characterisation and evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin strains for their temperature tolerance. In: *Mycology*, vol. 7, nr. 4, pp. 171-179. e-ISSN 2150-1211, ISSN 2150-1203.
80. CHANDRA, A. 2009. Screening global *Medicago* germplasm for weevil (*Hypera postica* (Gyll.) tolerance and estimation of genetic variability using molecular markers. In: *Euphytica*, vol. 169, nr. 3, pp. 363-374. e-ISSN 1573-5060, ISSN 0014-2336.
81. CHEN, W.H., MAN, L., HUANG, Z.X., YANG, G.M., HAN, Y.F., LIANG, J.D., LIANG, Z.Q. 2018. *Beauveria majiangensis*, a new entomopathogenic fungus from Guizhou, China. In: *Phytotaxa*, vol. 333, pp. 243-250. e-ISSN 1179-3163, ISSN 1179-3155.
82. CHO, E.-M., LIU, L., FARMERIE, W., KEYHANI, N. O. 2006. EST analysis of cDNA libraries from the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana*. I. Evidence for state-specific gene expression in aerial conidia, in vitro blastospores, and submerged conidia. In: *Microbiology*, vol. 152, pp. 2843-2854. e-ISSN 1465-2080, ISSN 1350-0872.
83. COLES, L.W., DAY, W. H. 1977. The fecundity of *Hypera postica* from three locations in the eastern United States. In: *Environmental Entomology*, vol. 6, pp. 211-212. e-ISSN 1938-2936, ISSN 0046-225X.
84. COMEY, C. T., KOONS, B. W., PRESLEY, K. W., SMERICK, J. B., SOBIERALSKI, C. A., STANLEY, D. M., BAECHEL, F. 1994. DNA extraction strategies for amplified fragment length polymorphism analysis. In: *J. Forensic Sci.*, vol. 39, pp. 1254-1269. e-ISSN 1556-4029. Disponibil: <https://archive.gfjc.fiu.edu/workshops/resources/articles/DNA%20Extraction%20Strategies.pdf>
85. COPPING, L.G. 2004. *The Manual of Biocontrol Agents (3rd ed.)*. Alton, UK: British Crop Protection, 702 p. ISBN 190-1396-355.
86. CORNALIA, E. 1856. Monografia del bomboce del gelso (*Bombyx mori* Linneo). Memorie del F I. R. Istituto Lombardo di Scienze. In: *Lettere ed Arti* vol. 6, pp.1-387 [Parte quarta: Patologia del baco. pp. 332-366.
87. CORRADI, N., KEELING, P. J. 2009. Microsporidia: a journey through radical taxonomical revisions. In: *Fungal Biol. Rev.*, vol. 23, pp. 1-8. ISSN 1749-4613.
88. CORRE-HELLOU, G., CROZAT, Y. 2005. N₂ fixation and N supply in organic pea (*Pisum sativum* L.) cropping systems as affected by weeds and pea weevil (*Sitona lineatus* L.). In: *European Journal of Agronomy*, vol. 22, pp. 449-458. ISSN 1161-0301.

89. CREMER, S., ARMITAGE, S. A. O., SCHMID-HEMPEL, P. 2007. Social immunity. In: *Curr. Biol.*, vol. 17, R693-R702. e-ISSN 1879-0445, ISSN 0960-9822. Disponibil: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.06.008>
90. CRISTEA, S. 2002. *Fitopatologie generală pentru studenții Facultății de Agricultură: lucrări practice*. 120 p.
91. DALY, H. V., DOYEN, J. T., PURCELL, A. H., III. 1998. *Introduction to Insect Biology and Diversity* (2nd ed.). Oxford: Oxford University Press. 680 p. ISBN 978-0195-100-334.
92. DAMALAS, C.A., ELEFTHEROHORINOS, I.G. 2011. Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. In: *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol. 8, nr. 5, pp. 1402-1419. ISSN 1661-7827.
93. DAVIDSON, E.W. 2012 Chapter 2. History of Insect Pathology. In: VEGA, F., KAYA, H.K., eds. *Insect Pathology. 2nd Edition*. San Diego, CA: Academic Press, p. 13-28. eBook ISBN 978-0-12384-9-854, ISBN 978-0-12384-9-847.
94. DEB, L. RAJESH, T., TOMBISANA, R.K., MAJUMDER, D. 2017. Antagonistic potential of *Beauveria* sp. against phytopathogens, In: *Bull. Env. Pharmacol. Life Sci.* vol. 6 nr. 3, pp. 207-212. e-ISSN 2277-1808.
95. DeBACH, P. 1974. *Biological control by natural enemies*. London, UK: Cambridge University Press, 323 p. ISBN 978-0521098359.
96. DESTEFANO, R. H. R., DESTEFANO, S. A. L., MESSIAS, C. L. 2004. Detection of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* within infected sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera, Pyralidae) using specific primers. In: *Genet. Mol. Biol.*, vol. 27, pp. 245-252. ISSN 0100-8455
97. DHALIWAL, G.S., JINDAL, V., MOHINDRU, B. 2015. Crop losses due to insect pests: Global and Indian scenario. In: *Indian Journal of Entomology*, vol. 77, nr. 2, pp. 165-168. e-ISSN 0974-8172, ISSN 0367-8288.
98. DIAS, B.A., NEVES, P.M., FURLANETO-MAIA, L., FURLANETO, M.C. 2008. Cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the presence of coffee berry borer cuticle. In: *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 39, nr. 2, pp. 301-306. ISSN 1517-8382.
99. DICK, M. W. 2001. *Straminipilous Fungi: Systematics of the Peronosporomycetes Including Accounts of the Marine Straminipilous Protists, the Plasmodiophorids and Similar Organisms*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 670 p. e-ISSN 978-94-015-9733-3. Disponibil: <https://doi.org/10.1007/978-94-015-9733-3>
100. DIECKMANN, L. 1982. Acales - Studien (Coleoptera, Curculionidae). In: *Entomol. Nachr. and Ber.*, vol. 26, nr. 5, pp. 195-209.
101. Directiva 2009/127/CE privind echipamentele tehnice de aplicare a pesticidelor [online, citat 22.10.2018]. Disponibil: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:310:0029:0033:RO:PDF>
102. Directiva 2009/128/CE privind utilizarea durabilă a pesticidelor [online, citat 22.10.2018]. Disponibil: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:309:0071:0086:RO:PDF>
103. DORE, T., MEYNARD, J.M. 1995. On-farm analysis of attacks by the pea weevil (*Sitona lineatus* L.; Col., Curculionidae) and the resulting damage to pea (*Pisum sativum* L.) crops. In: *Journal of Applied Entomology*, vol. 119, pp. 49-54. e-ISSN 1439-0418. Disponibil: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1439-0418.1995.tb01242.x>
104. DOUGLAS, A. E. 2007. Symbiotic microorganisms: untapped resources for insect pest control. In: *Trends Biotechnol.*, vol. 25, pp. 338-342. e-ISSN 1879-3096, ISSN 0167-7799.
105. DOUTT, R.L. 1964. The historical development of biological control. p. 21-42. In: DeBACH, P., ed. *Biological Control of Insect Pests and Weeds*. London, UK: Chapman and Hall Ltd, 844 pp. ISBN 978-0412074509.

106. DOWNES, W. 1938. The occurrence of *Sitona lineatus* in British Columbia. In: *Canadian Entomologist*, vol. 70, p. 22. e-ISSN 1918-3240, ISSN 0008-347X.
107. DRIESCHE van, R.G., BELLOWES, JR., T.S. 1996. *Biological control*. New York: Chapman and Hall, pp. 3-20, 539 p. ISBN 978-1461284901.
108. EDLIND, T. D., LI, J., VISVESBARA, G. S., VODKIN, M. H., MCLAUGHLIN, G. L., KATIYAR, S. K. 1996. Phylogenetic analysis of b-tubulin sequences from amitochondrial protozoa. In: *Molec. Phylogenet. Evol.*, vol. 5, pp. 359-367. e-ISSN 1095-9513, ISSN 1055-7903.
109. EILENBERG, J., MICHELSEN, V. 1999. Natural host range and prevalence of the genus *Strongwellsea* (Zygomycota: Entomophthorales) in Denmark. In: *Journal of Invertebrate Pathology*, v.73, p.189-198, e-ISSN 1096-0805, ISSN 0022-2011.
110. EILENBERG, J., PELL, J. K. 2007. Ecology. In: S. KELLER (Ed.). *Arthropod Pathogenic Entomophthorales: Biology, Ecology, Identification* (pp. 7-26). Brussels: Office des Publications Officielles des Communaute's Europeennes. ISBN 978-92-898-0037-2.
111. ELLIOT, S. L., BLANFORD, S., THOMAS, M. B. 2002. Hostpathogen interactions in a varying environment: temperature, behavioural fever and fitness. In: *Proc. R. Soc. Lond.*, vol. 269, pp. 1599-1607. e-ISSN 1471-2954. Disponibil: <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2067>
112. ENKERLI, J., WIDMER, F. 2010. Molecular ecology of fungal entomopathogens: molecular genetic tools and their applications in population and fate studies. In: *BioControl.*, vol. 55, pp. 17-37. e-ISSN 1573-8248, ISSN 1386-6141. Disponil: <https://doi.org/10.1007/s10526-009-9251-8>
113. ENTZ, S. C., JOHNSON, D. L., KAWCHUK, L. M. 2005. Development of a PCR-based diagnostic assay for the specific detection of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. In: *Mycol. Res.*, vol. 109, pp. 1302-1312. e-ISSN 1469-8102, ISSN 0953-7562.
114. ESCHERICH, K., MIYAJIMA, M. 1911. Studien uber die Wipfelkrankheit der Nonne. In: *Naturw. Z. Forst- u. Landw.* vol. 9, pp. 381-402. Disponibil: <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2067>
115. ESTER, A., JEURING, G. 1992. Efficacy of some insecticides used in coating faba beans to control pea and bean weevil (*Sitona lineatus*) and the relation between yield and attack. In: *FABIS Newsletter*, vol. 30, pp. 32-41. ISSN 0255-6448.
116. EVANS, H. C., SAMSON, R. A. 1982. *Cordyceps* species and their anamorphs pathogenic on ants (Formicidae) in tropical forest ecosystems. I. The Cephalotes (Myrmicinae) complex. In: *Trans. Br. Mycol. Soc.*, vol. 79, pp. 431-453.
117. FALKOW, S. 2004. Molecular Koch's postulates applied to bacterial pathogenicity - a personal recollection 15 years later. In: *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 2, pp. 67-72. e-ISSN 1740-1534, ISSN 1740-1526. Disponibil: <https://doi.org/10.1038/nrmicro799>
118. FAO, FAOSTAT [online]. 2019. Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistical Database [citat 07.09.2019]. Disponibil: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
119. FARGUES, J., GOETTEL, M., SMITS, N., OUEDRAOGO, A., ROUGIER, M. 1997. Effect of temperature on vegetative growth of *Beauveria bassiana* isolates from different origins. In: *Mycologia*, vol. 89, nr. 3, pp. 383-392. e-ISSN 1557-2536, ISSN 0027-5514.
120. FARIA de, M. R., WRAIGHT, S. P. 2007. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. In: *Biol. Control*, vol.43, pp. 237-256. ISSN 1049-9644.
121. FAUNA EUROPAEA, *Protapion apricans* (Herbst, 1797) [citat 17.06.2019]. Disponibil: https://fauna-eu.org/cdm_dataportal/taxon/f7105a9b-a29d-4b5f-af4c-5bdc46f2cc18
122. FAUNA EUROPAEA, *Sitona lineatus* (Linnaeus, 1758) [citat 17.06.2019]. Disponibil: https://fauna-eu.org/cdm_dataportal/taxon/71df01c1-672d-444d-a0c6-c8f0e61ef49c

123. FEDERICI, B.A. 1993. Viral pathobiology in relation to insect control. In: BECKAGE N.E., THOMPSON S.N., FEDERICI B.A. eds. *Parasites and pathogens of insects. Vol. 2.* San Diego, CA: Academic Press, pp. 81-101.
124. FEINSTEIN, L. M., SUL, W. J., BLACKWOOD, C. B. 2009. Assessment of bias associated with incomplete extraction of microbial DNA from soil. In: *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 75, pp. 5428-5433. e-ISSN 1098-5336, ISSN 0099-2240. Disponibil: <https://doi.org/10.1128/AEM.00120-09>
125. FERGUSON, A.W. 1994. Pests and plant injury on lupins in the south of England. In: *Crop Protection*, vol. 13, pp. 201-210. ISSN 0261-2194.
126. FERRON, P. 1978. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. In: *Annual Review of Entomology*, vol. 23, pp. 409-442. e-ISSN 1545-4487.
127. FICK, G.W. 1976. Alfalfa weevil effects on regrowth of alfalfa. In: *Agronomy Journal*, vol. 68, pp. 809-812. e-ISSN 1435-0645.
128. FICK, G.W., LIU, B.W.Y. 1976. Alfalfa weevil effects on root reserves, development rate, and canopy structure of alfalfa. In: *Agronomy Journal*, vol. 68, pp. 595-599. e-ISSN 1435-0645.
129. FISHER, J.R., O'KEEFFE, L.E. 1979a. Seasonal migration and flight of the pea leaf weevil, *Sitona lineatus* (Coleoptera: Curculionidae) in northern Idaho and eastern Washington. In: *Entomologia Experimentalis et Applicata*, vol. 26, pp. 189-196. e-ISSN 1570-7458.
130. FISHER, J.R., O'KEEFFE, L.E. 1979b. Host potential of some cultivated legumes for the pea leaf weevil, *Sitona lineatus* (Linnaeus) (Coleoptera: Curculionidae). In: *Pan Pacific Entomologist*, vol. 55, pp. 199-201. ISSN 0031-0603.
131. FISHER, J.R., O'KEEFFE, L.E. 1979c. Food plants of the pea leaf weevil *Sitona lineatus* (Linnaeus) (Coleoptera: Curculionidae) in northern Idaho and eastern Washington. In: *Pan Pacific Entomologist*, vol. 55, pp. 202-207. ISSN 0031-0603.
132. FRANCO, K., RODRÍGUEZ, S., CERVANTES, J., BARRANCO, J. 2011. Enzimas y toxinas de hongos entomopatógenos, su aplicación potencial como insecticidas y fungicidas. In: *Sociedades Rurales, Producción y Medio Ambiente*, v.11, p.22. ISSN 2007-7556. Disponibil: <https://sociedadesruralesojs.xoc.uam.mx/index.php/srpma/articulo/download/207/205>
133. FRIEDMAN, A.L., FREIDBERG, A. 2007. The Apionidae of Israel and the Sinai Peninsula (Coleoptera: Curculionidae). In: *Israel Journal of Entomology*, vol. 37, pp. 55-180. ISSN 0075-1243.
134. FRISVAD, J. C., ANDERSEN, B., THRANE, U. 2008. The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. In: *Mycol. Res.*, vol. 112, pp. 231-240. e-ISSN 1469-8102, ISSN 0953-7562.
135. FROSTEGARD, A., COURTOIS, S., RAMISSE, V., CLERC, S., BERNILLON, D., LE GALL, F., JEANNIN, P., NESME, X., SIMONET, P. 1999. Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils. In: *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 65, pp. 5409-5420. e-ISSN 1098-5336, ISSN 0099-2240. Disponibil: <https://doi.org/10.1128/AEM.65.12.5409-5420.1999>
136. GARDNER, D., PUTNAM, D. H. 2018. Alfalfa situation in the USA and Canada. In: *Proceedings of Second World Alfalfa Congress* [online]. 11-14 November, 2018, Cordoba, Argentina, pp. 30-33 [citad 05.03.2020]. Disponibil: <http://www.worldalfalfacongress.org/resumenes.pdf>
137. GARRIDO-JURADO, I., FERNANDEZ-BRAVO, M., CAMPOS, C., QUESADA-MORAGA, E. 2015. Diversity of entomopathogenic Hypocreales in soil and phylloplanes of five Mediterranean cropping systems. In: *J. of Inv. Pathology*. vol. 130, pp. 97-106. e-ISSN 1938-2936, ISSN 0046-225X.
138. GASIC, S., TANOVIC, B. 2013. Biopesticide formulations, possibility of application and

- future trends. In: *Pesticides and Phytomedicine*, vol. 28, nr. 2, pp. 97-102. e-ISSN 2406-1026, ISSN 1820-3949.
139. GEISER, D. M., DORNER, J. W., HORN, B. W., TAYLOR, J. W. 2000. The phylogenetics of mycotoxin and sclerotium production in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae*. In: *Fungal Genet. Biol.*, vol. 31, pp.169-179. e-ISSN 1096-0937, ISSN 1087-1845.
140. GEORGE, K.S. 1962. Root nodule damage by larvae of *Sitona lineatus* and its effect on yield of green peas. In: *Plant Pathology*, vol. 11, pp. 172-176. e-ISSN 1365-3059.
141. GEORGIS, R., GAUGLER, R. 1991. Predictability in biological control using entomopathogenic nematodes. In: *Journal of Economic Entomology*, vol. 84, pp. 713-720. e-ISSN 1938-291X.
142. GHIZDAVU, I., PASOL, P., PALAGESIU, I., BOBIRNAC, B., FILIPESCU, C., MATEI, I., GEORGESCU, T., BAICU, T., BARBULESCU, A. 1997. *Entomologie agricolă*. București: Editura Didactică și Pedagogică, R.A., 435 p. ISBN 973-40-0397-6.
143. GILES, K.L., OBRYCKI, J.J., DEGOOYER, T.A. 1994. Prevalence of predators associated with *Acyrtosiphon pisum* (Homoptera: Aphididae) and *Hypera postica* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae) during growth of the first crop of alfalfa. In: *Biological Control*, vol. 4, nr. 2, pp. 170-177. ISSN 1049-9644.
144. GÎDEI, P., POPESCU, I. 2014. *Ghidul coleopterelelor din România Vol II*. Iași: PIM, 531p. ISBN 978-606-13-2089-9.
145. GLASER, R. W. 1931. The cultivation of a nematode parasite of an insect. In: *Science*, vol. 73, pp. 614-615. e-ISSN 1095-9203, ISSN 0036-8075.
146. GLASER, R. W., CHAPMAN, J. W. 1913. The wilt disease of gypsy moth caterpillars. In: *J. Econ. Entomol.* vol. 6, pp. 479-488. e-ISSN 1938-291X, ISSN 0022-0493. Disponibil: https://ia800708.us.archive.org/view_archive.php?archive=/28/items/cross-ref-pre-1923-scholarly-works/10.1093%252Fjee%252F4.5.419.zip&file=10.1093%252Fjee%252F6.6.479.pdf
147. GLEASON, F. H., MARANO, A. V., JOHNSON, P., MARTIN, W. W. 2010. Blastocladian parasites of invertebrates. In: *Fungal Biol. Rev.*, vol. 24, pp. 56-67. ISSN 1749-4613.
148. GODFRAY, H.C.J. 1994. *Parasitoids: Behavioral and Evolutionary Ecology*. Princeton University Press, 488 p. ISBN 0-691-00047-6.
149. GOETTEL, M. S. 1995. The utility of bioassays in the risk assessment of entomopathogenic fungi. Biotechnology Risk Assessment: USEPA/ USDA/Environment Canada/Agriculture and Agri-Food Canada. Risk Assessment Methodologies (pp. 2-8). In: *Proceedings of the Biotechnology Risk Assessment Symposium*, June 6-8, 1995. College Park: University of Maryland Biotechnology. Pensacola, FL.
150. GOETTEL, M.S., POPRAWSKI, J.D., VANDERBERG, J.D., LI, Z., ROBERTS, D.W. 1990. Safety to nontarget invertebrates of fungal biocontrol agents. In: LAIRD, M., LACEY, L.A., DAVIDSON, E.W., eds. *Safety of microbial insecticides*. Boca Raton, Florida: CRC Press, pp. 209-231. ISBN 0-8493-4793-9.
151. GREIB, G., KLINGAUF, F. 1977. Untersuchungen zum Fraßpflanzenspektrum von *Sitona lineatus* L. (Curcul., Coleopt.). In: *Journal of Applied Entomology*, vol. 82, pp. 267-274. e-ISSN 1439-0418. Disponibil: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1439-0418.1976.tb03409.x>
152. GRIFFITHS, D.C., BARDNER, R., BATER, J. 1986. Control of *Sitona lineatus* in autumn-sown faba beans. In: *FABIS Newsletter*, vol. 14, pp. 30-33. ISSN 0255-6448.
153. GRIMALDI, D., ENGEL, M. S. 2005. *Evolution of the Insects*. New York: Cambridge University Press. 772 p. ISBN 978-0521821490.
154. GULLAN, P. J., CRANSTON, P. S. 2005. *The Insects: An Outline of Entomology* (3rd ed.). Oxford: Blackwell. 528 p. ISBN 978-1-405-11113-3.

155. HAGEN, K.S., FRANZ, J.M. 1973. A history of biological control. p. 433-476. In: SMITH, R. F. MITTLER, T. E., SMITH, C. N. eds. *A History of Entomology*. Palo Alto, California: Annu. Rev. Inc., 517 p. ISBN 978-0686092988.
156. HAJEK, A. E. 1997. Ecology of terrestrial fungal entomopathogens. In: JONES, J.G. (eds) *Advances in Microbial Ecology*, vol. 15, pp. 193-249. Springer, Boston, MA. ISBN 978-0-306-45559-9. Disponibil: https://doi.org/10.1007/978-1-4757-9074-0_5
157. HAJEK, A. E., BUTLER, L. 2000. Predicting the host range of entomopathogenic fungi. In: P. A. FOLLETT, J. J. DUAN (Eds.), *Nontarget Effects of Biological Control* (pp. 263-276). Boston: Kluwer Academic Publishers. ISBN 978-0-7923-7725-2
158. HALLSWORTH, J.E., NARESH, M. 1999. Water and temperature relations of growth of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces farinosus*. In: *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 74, pp. 261-266. e-ISSN 1096-0805, ISSN 0022-2011.
159. HAMON, N., BARDNER, R., ALLEN-WILLIAMS, L., LEE, J. B. 1987. Flight periodicity and infestation size of *Sitona lineatus*. In: *Annals of Applied Biology*, vol. 111, pp. 271-284. e-ISSN 1744-7348.
160. HAMON, N., BARDNER, R., ALLEN-WILLIAMS, L., LEE, J.B. 1990. Carabid populations in field beans and their effect on the population dynamics of *Sitona lineatus* (L.). In: *Annals of Applied Biology*, vol. 117, pp. 51-62. e-ISSN 1744-7348.
161. HANS, H. 1959. Beitrage zur Biologie von *Sitona lineatus*. In: *Journal of Applied Entomology*, vol. 44, pp. 343-386. e-ISSN 1439-0418. Disponibil: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1439-0418.1959.tb00933.x>
162. HANSEN, L.M., BOELT, B. 2008. Thresholds of economic damage by clover seed weevil (*Apion fulvipes* Geoff.) and lesser clover leaf weevil (*Hypera nigrirostris* Fab.) on white clover (*Trifolium repens* L.) seed crops. In: *Grass and Forage Science*, vol. 63, pp. 433-437. e-ISSN 1365-2494.
163. HARCOURT, D., GUPPY, G.M., MACLEOD, D.M., TYRELL, D. 1974. The fungus *Entomophthora phytonomi* pathogenic to the alfalfa weevil, *Hypera postica* (Coleoptera: Curculionidae). In: *Canadian Entomologist*, vol. 109, pp. 1521-1532. e-ISSN 1918-3240, ISSN 0008-347X.
164. HAVLICKOVA, H. 1980. Causes of different feeding rates of pea leaf weevil, *Sitona lineatus* on three pea cultivars. In: *Entomologia Experimentalis et Applicata*, vol. 27, pp. 287-292. e-ISSN 1570-7458.
165. HAVLICKOVA, H. 1982. Different response of alfalfa plants to artificial defoliation and to feeding by the pea leaf weevil (*Sitona lineatus* L.). In: *Experientia*, vol. 38, pp. 569-570. ISSN 0014-4754.
166. HAWKSWORTH, D. L., B. SUTTON, AND G. C. AINSWORTH. 1983. Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi. Seventh Edition. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.
167. HECKMAN, D. S., GEISER, D. M., EIDELL, B. R., STAUFFER, R. L., KARDOS, N. L., BLAIR HEDGES, S. 2001. Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants. In: *Science*, 293, 1129-1133. e-ISSN 1095-9203, ISSN 0036-8075.
168. HEDLUND, R.C., PASS, B.C. 1968. Infection of the alfalfa weevil, *Hypera postica*, by the fungus *Beauveria bassiana*. In: *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 11, nr. 1, pp. 25-34. e-ISSN 1096-0805, ISSN 0022-2011.
169. HELGESEN, R.G., COOLEY, N. 1976. Overwintering survival of the adult alfalfa weevil. In: *Environmental Entomology*, vol. 5, pp.180-182. e-ISSN 1938-2936, ISSN 0046-225X.
170. HIBBETT, D. S., BINDER, M., BISCHOFF, J. F., BLACKWELL, M., CANNON, P. F., ERIKSSON, O. E., HUHDORF, S., JAMES, T., KIRK, P. M., LU'CKING, R., LUMB-

- SCH, H. T., LUTZONI, F., MATHENY, P. B., MCLAUGHLIN, D. J., POWELL, M. J., REDHEAD, S., SCHOCH, C. L., SPATAFORA, J. W., STALPERS, J. A., VILGALYS, R., AIME, M. C., APTROOT, A., BAUER, R., BEGEROW, D., BENNY, G. L., CASTLEBURY, L. A., CROUS, P. W., DALI, Y. C., GAMS, W., GEISER, D. M., GRIFFITH, G. W., GUEIDAN, C., HAWKSWORTH, D. L., HESTMARK, G., HOSAKA, K., HUMBER, R. A., HYDE, K. D., IRONSIDE, J. E., KOLJALG, U., JYRTZNABM, C. P., LARSSON, K. H., LICHTWARDT, R., LONGCORE, J., MIADLIKOWSKA, J., MILLER, A., MONCALVO, J. M., MOZLEY-STANDRIDGE, S., OBERWINKLER, F., PARMASTO, E., REEB, V., ROGERS, J. D., ROUX, C., RYVARDEN, L., SAMPAIO, J. P., SCHUBLER, A., SUGIYAMA, J., THORN, R. G., TIBELL, L., UNTEREINER, W. A., WALKER, C., WANG, Z., WEIR, A., WEIß, M., WHITE, M. M., WINKA, K., YAO, Y. J., ZHANG, N. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. In: *Mycol. Res.*, vol. 111, pp. 509-547. e-ISSN 1469-8102, ISSN 0953-7562.
171. HILBURN, D.J. 1985. *Population dynamics of overwintering life stages of the alfalfa weevil, Hypera postica (Gyllenhal)*. Ph.D. Dissertation. Virginia Polytechnic Institute and State University, 119 p.
172. HOEBEKE, E.R., WHEELER JR, A.G. 1985. *Sitona lineatus (L.)*, the pea leaf weevil: First records in eastern North America (Coleoptera: Curculionidae). In: *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, vol. 87, pp. 216-220. ISSN 0013-8797.
173. HOFF, K.M., BREWER, M.J., BLODGETT, S.L. 2002. Alfalfa weevil (Coleoptera: Curculionidae) larval sampling: comparison of shake-bucket and sweep-net methods and effect of training. In: *Journal of Economic Entomology*, vol. 95, pp. 748-753. e-ISSN 1938-291X, ISSN 0022-0493.
174. HOLDER, D.J., KEYHANI, N.O. 2005. Adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana* to substrates. In: *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 71, pp. 5260-5266. e-ISSN 1098-5336, ISSN 0099-2240.
175. HOLDER, D.J.; KEYHANI, N.O. 2005. Adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana* to substrates. In: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, p. 5260-5266.
176. HOOG de, G.S. 1972. The genera *Beauveria*, *Isaria*, *Tritirachium* and *Acrodontium* gen. nov. In: *Studies in Mycology*, vol. 1, pp. 1-41. ISSN 0166-0616.
177. HOOG de, G.S. 2000. *Atlas of clinical fungi ed. 2*. p. 523. Amer Society for Microbiology, 1126p. ISBN 907-0351439.
178. HORAK A., BURYSKOVA, L. 1980. The use of soil insecticides for the protection of horse bean (*Faba vulgaris*). In: *Rostlinna Vyroba*, vol. 10, pp. 1069-1079. ISSN 0035-8371.
179. HOSSAIN, Z., GURR, G.M., WRATTEN, S.D., RAMAN, A. 2002. Habitat manipulation in lucerne *Medicago sativa*: Arthropod population dynamics in harvested and „refuge” crop strips. In: *Journal of Applied Ecology*, vol.39, pp. 445-454. e-ISSN 1365-2664.
180. Hotărârea Guvernului Republicii Moldova nr. 123 din 02.02.2018 cu privire la aprobarea Programului național de protecție integrată a plantelor pentru anii 2018-2027 și Planului de acțiuni privind implementarea acestuia, In: *Monitorul Oficial al Republicii Moldova*, 2018, Nr. 40-47, art nr 142 [citat 03.04.2019]. Disponibil: https://www.legis.md/cautare/getResults?doc_id=102113&lang=ro.
181. HOY, M., RAGHUWINDER, S., ROGERS, M. 2010. Evaluations of a novel isolate of *Isaria fumosorosea* for control of the asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). In: *Florida Entomologist*, vol. 93, nr. 1, pp. 24-32. e-ISSN 2163-632X, ISSN 1930-4013.
182. HSIAO, T.H. 1993. Geographic and genetic variation among alfalfa weevil strains. In: KIM, K. C., MCPHERON, B. A., eds. *Evolution of Insect Pests: Patterns of Variation*. New York: John Wiley & Sons Inc., pp. 311-327. ISBN 0-471-60077-6.

183. HSIEH, F., ROBERTS, S.J., ARMBRUST, E.J. 1974. Developmental rate and population dynamics of alfalfa weevil larvae. In: *Environmental Entomology*, vol. 3, pp. 593-597. e-ISSN 1938-2936, ISSN 0046-225X.
184. HUMBER, R. A. 2008. Evolution of entomopathogenicity in fungi. In: *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 98, pp. 262-266. e-ISSN 1096-0805, ISSN 0022-2011.
185. HUMBER, R.A. 2012. Chapter VI Identification of entomopathogenic fungi. In: LACEY, L., ed. *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology, 2nd Edition*. Academic Press, pp. 151-188. e-ISBN 978-0-12386-9-005, ISBN 978-0-12386-8-992.
186. HUMPHRIES, A.W., STEWART, A.G., NEWMAN, A.J., BALLARD, R.A. 2018. Overview of the economic utilization and traits of interest of lucerne in Australia. In: *Proceedings of Second World Alfalfa Congress* [online]. 11-14 November, 2018, Cordoba, Argentina, pp. 20-24 [citat 05.03.2020]. Disponibil: <http://www.worldalfalfacongress.org/resumenes.pdf>
187. HUNTER, M.D. 2001. Out of sight, out of mind: the impacts of root-feeding insects in natural and managed systems. In: *Agricultural and Forest Entomology*, vol. 3, pp. 3-9. e-ISSN 1461-9563.
188. IMOULAN, A., HUSSAIN, M., KIRK, P.M., el MEZIANE, A., YAO, Y.-J. 2017. Entomopathogenic fungus *Beauveria*: Host specificity, ecology and significance of morpho-molecular characterization in accurate taxonomic classification. In: *Journal of Asia-Pacific Entomology*, vol. 20, nr. 4, pp. 1204-1212. ISSN 1226-8615.
189. INGLIS, G.D., ENKERLLI, J., GOETTEL, M.S. 2012. CHAPTER VII. Laboratory techniques used for entomopathogenic fungi: Hypocreales. In: LACEY, L. eds. *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology, 2nd Edition*. Academic Press, pp. 189-254. e-ISBN 978-0-12386-9-005, ISBN 978-0-12386-8-992.
190. INGLIS, G.D., GOETTEL, M.S., BUTT, T.M., STRASSER, H. 2001. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In: BUTT, T., JACKSON, C., MAGAN, N. eds. *Fungi as Biocontrol Agents – Progress, Problems and Potential*. Wallingford, UK: CABI Press, CAB International, pp. 23-69. e- ISBN 978-1-84593-3-005.
191. ISHIMORI, N. 1934. Contribution a l'e'tude de la grasserie du ver a' soie (*Bombyx mori*). In: *C.R. Seances Soc. Biol. Soc Franco-Japonaise Biol.*, vol. 116, pp.1169-1170.
192. ISHIWATA, S. 1901. On a kind of severe flacherie (sotto disease). In: *Dainihon Sanshi Kaiho*, vol. 114, pp. 1-5.
193. ISHIWATA, S. 1905. About „Sottokin”, a bacillus of a disease of the silkworm. In: *Rept. Sericult. Assoc. Jpn.*, vol. 160, pp. 1-8.
194. JABER, L.R., KHOLOUD, M.A. 2018. Fungal entomopathogens as endophytes reduce several species of *Fusarium* causing crown and root rot in sweet pepper (*Capsicum annum* L.). In: *Biological Control*, vol. 126, pp. 117-126, ISSN 1049-9644. Disponibil: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1049964418303815>
195. JABER, L.R., OWNLEY, B.H. 2017. Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control of insect pests and plant pathogens. In: *Biological Control*, vol. 116, pp. 36-45. ISSN 1049-9644. Disponibil: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1049964417300543>
196. JACCOUD, D. B., HUGHES, W. O. H., JACKSON, C. W. 1999. The epizootiology of a *Metarhizium* infection in mini-nests of the leafcutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. In: *Entomol. Exp. Appl.*, vol. 93, pp. 51-61. e-ISSN 1570-7458 Disponibil: <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.1999.00561.x>
197. JACKSON, D.J. 1920. Bionomics of weevils of the genus *Sitones* injurious to leguminous crops in Britain. In: *Annals of Applied Biology*, vol. 7, pp. 269-298. e-ISSN 1744-7348.
198. JACKSON, M. A., DUNLAP, C. A., JARONSKI, S. T. 2010. Ecological considerations

- in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. In: *BioControl*, vol. 55, pp. 129-145. e-ISSN 1573-8248, ISSN 1386-6141.
199. JACKSON, M. A., JARONSKI, S. T. 2009. Production of microsclerotia of the fungal entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and their potential for use as a biocontrol agent for soil-inhabiting insects. In: *Mycol. Res.*, vol.113, pp. 842-850. e-ISSN 1469-8102, ISSN 0953-7562.
 200. JACOBSON, E. S. 2000. Pathogenic roles for fungal melanins. In: *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 13, pp. 708-717. e-ISSN 1098-6618, ISSN 0893-8512. Disponibil: <https://doi.org/10.1128/CMR.13.4.708>
 201. JAMES, T. Y., KAUFF, F., SCHOCH, C. L., MATHENY, P. B., HOFSTETTER, V., COX, C. J., CELIO, G., GUEIDAN, C., FRAKER, E., MIADLIKOWSKA, J., LUMBSCH, H. T., RAUHUT, A., REEB, V., ARNOLD, A. E., AMTOFT, A., STAJICH, J. E., HOSAKA, K., SUNG, G. H., JOHNSON, D., O'ROURKE, B., CROCKETT, M., BINDER, M., CURTIS, J. M., SLOT, J. C., WANG, Z., WILSON, A. W., SCHUSSLER, A., LONGCORE, J. E., O'DONNELL, K., MOZLEY-STANDRIDGE, S., PORTER, D., LETCHER, P. M., POWELL, M. J., TAYLOR, J. W., WHITE, M. M., GRIFFITH, G. W., DAVIES, D. R., HUMBER, R. A., MORTON, J. B., SUGIYAMA, J., ROSSMAN, A. Y., ROGERS, J. D., PFISTER, D. H., HEWITT, D., HANSEN, K., HAMBLETON, S., SHOEMAKER, R. A., KOHLMAYER, J., VOLKMANN-KOHLMEYER, B., SPOTTS, R. A., SERDANI, M., CROUS, P. W., HUGHES, K. W., MATSUURA, K., LANGER, E., LANGER, G., UNTEREINER, W. A., LUCKING, R., BUDEL, B., GEISER, D. M., APTROOT, A., DIEDERICH, P., SCHMITT, I., SCHULTZ, M., YAHR, R., HIBBETT, D. S., LUTZONI, F., MCLAUGHLIN, D. J., SPATAFORA, J. W., VILGALYS, R. 2006b. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. In: *Nature*, vol. 443, pp. 818-822. e-ISSN 1476-4687, ISSN 0028-0836. Disponibil: <https://doi.org/10.1038/nature05110>
 202. JAMES, T. Y., LETCHER, P. M., LONGCORE, J. E., MOZLEY-STANDRIDGE, S. E., PORTER, D., POWELL, M. J., GRIFFITH, G. W., & VILGALYS, R. 2006a. A molecular phylogeny of the flagellated fungi (Chytridiomycota) and description of a new phylum (Blastocladiomycota). In: *Mycologia*, vol. 98, pp. 860-871. e-ISSN 1557-2536, ISSN 0027-5514.
 203. JARONSKI, S. T., GOETTEL, M. S., LOMER, C. L. 2003. Regulatory requirements for ecotoxicological assessments of microbial insecticides e how relevant are they? In H. M. T. HOKKANEN, A. E. HAJEK (Eds.), *Environmental Impacts of Microbial Insecticides* (pp. 237-260) Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
 204. JARONSKI, S.T. 2010. Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. In: *BioControl*, vol. 55, pp. 159-185. e-ISSN 1573-8248, ISSN 1386-6141.
 205. JARONSKI, S.T., MASCARIN, G.M. 2017. Chapter 9 - Mass Production of Fungal Entomopathogens In: LACEY, L. A., ed. *Microbial Control of Insect and Mite Pests*. Academic Press, pp 141-155. ISBN 978-0-12803-5-276.
 206. JAWORSKA, M. 1998. Laboratory preference of annual legumes by pea weevil *Sitona lineatus* L. (Col., Curculionidae) and their effect on susceptibility of weevils to entomogenous nematodes. In: *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 71, pp. 248-250. e-ISSN 1096-0805, ISSN 0022-2011.
 207. JAWORSKA, M., ROPEK, D. 1994. Influence of host-plant on the susceptibility of *Sitona lineatus* L. (Col., Curculionidae) to *Steinernema carpocapsae* Welsler. In: *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 64, pp. 96-99. e-ISSN 1096-0805, ISSN 0022-2011.
 208. JENKINS, N. E., PRIOR, C. 1993. Growth and formation of true conidia by *Metarhizium flavoviride* in a simple liquid medium. In: *Mycol. Res.*, vol. 97, pp. 1489-1494. e-ISSN 1469-8102, ISSN 0953-7562.

209. JESSICA, J. J., PENG, T. L., SAJAP, A. S., LEE, S. H., SYAZWAN, S. A. 2019. Evaluation of the virulence of entomopathogenic fungus, *Isaria fumosorosea* isolates against subterranean termites *Coptotermes* spp. (Isoptera: Rhinotermitidae). In: *Journal of Forestry Research*, vol. 30, pp. 213-218. e-ISSN 1993-0607, ISSN 1007-662X.
210. JIROVEC, O. 1936. Studien u̇ber Microsporidien. In: *Vestn. Cesk. Spol. Zool.*, vol. 4, pp. 1-75.
211. JONES, M.D.M., RICHARDS, T.A., HAWKSWORTH, D.L., BASS, D. 2011. Validation and justification of the phylum name Cryptomycota phyl. nov. In: *IMA Fungus*, vol. 2, pp. 173-175. Disponiibl: <https://doi.org/10.5598/imafungus.2011.02.02.08>.
212. JORGENSEN, R. A., CLUSTER, P. D. 1989. Modes and tempos in evolution of nuclear ribosomal DNA: new characters for evolutionary studies and new markers for genetic and population studies. In: *Annals of the Missouri Botanical Garden*, vol. 75, pp. 1238-1247. ISSN 0026-6493.
213. KABIR, S., RAJENDRAN, N., AMEMIYA, T., ITOH, T. 2003. Quantitative measurement of fungal DNA extracted by three different methods using real-time polymerase chain reaction. In: *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 96, pp. 337-343. e-ISSN 1389-1723, ISSN 1347-4421.
214. KALSBECK, V., MULLENS, B. A., JESPERSEN, J. B. 2001. Field studies of Entomophthora (Zygomycetes: Entomophthorales)-induced behavioral fever in *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) in Denmark. In: *Biol. Control*, vol. 21, pp. 264-273. ISSN 1049-9644.
215. KARTHIKEYAN, A., SHANTHI, V., NAGASATHYA, A. 2008. Effect of different media and pH on the growth of *Beauveria bassiana* and its parasitism on leaf eating caterpillars. In: *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, vol. 4, nr. 2, pp. 117-119. ISSN 1816-1561. Disponibil: <http://www.aensiweb.net/AENSIWEB/rjabs/rjabs/2008/117-119.pdf>
216. KASSA, A., STEPHAN, D., VIDAL, S., ZIMMERMANN, G. 2004. Production and processing of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* submerged conidia for locust and grasshopper control. In: *Mycol. Res.*, vol. 108, pp. 93-100. e-ISSN 1469-8102, ISSN 0953-7562.
217. KAVKOVA, M., CURN, V. 2005. *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hypomycetes) as a potential mycoparasite on *Sphaerotheca fuliginea* (Ascomycotina: Erysiphales). In: *Mycopathologia*, vol. 159, nr. 1, pp. 53-63. e-ISSN 1573-0832, ISSN 0301-486X.
218. KAYA, H. K., VEGA, F. E. 2012. Scope and basic principles of insect pathology. In: VEGA, F. E., KAYA, H. K., eds., *Insect Pathology*. San Diego, CA: Academic Press, pp. 1-12. eBook ISBN 978-0-12384-9-854, ISBN 978-0-12384-9-847.
219. KECHANG, L., PING, Z., CASH, D. 2009. Biology and management of major alfalfa diseases and pests. In: CASH, D., YUEGAO, H., KECHANG, L., SUQIN, W., PING, Z., RONG, G., eds. *Alfalfa management guide for ningxia*. China: China Agricultural Press, p. 37-62.
220. KEPLER, R.M., LUANGSA-ARD, J.J., HYWEL-JONES, N.L., QUANDT, C.A., SUNG, G.H., REHNER, S.A., AIME, M.C., HENKEL, T.W., SANJUAN, T., ZARE, R., CHEN, M., LI, Z., ROSSMAN, A.Y., SPATAFORA, J. W., SHRESTHA, B. 2017. A phylogenetically-based nomenclature for *Cordycipitaceae* (Hypocreales). In: *IMA Fungus*, vol. 8, pp. 335-353. Disponibil: <https://doi.org/10.5598/imafungus.2017.08.02.08>
221. KERWIN, J. L., PETERSEN, E. E. 1997. Fungi: Oomycetes and Chytridiomycetes. In L. A. Lacey (Ed.), *Manual of Techniques in Insect Pathology* (pp. 251-268). New York: Academic Press. e-ISBN 978-0080535777.
222. KESKIN, S., OZKAYA, H. 2015. Effect of storage and insect infestation on the technological properties of wheat. In: *CyTA - Journal of Food*, vol. 13, nr. 1, pp. 134-139. Disponibil: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19476337.2014.919962>

223. KHANJANI, M. 2005. Alfalfa pests. In: KHANJANI, M., ed. *Crop pests in Iran*. Iran: Ali Sina University Press, p. 121-138.
224. KIEWNICK, S. 2007. Practicalities of developing and registering microbial biological control agents. In: *CAB Reviews: Perspectives in Agr., Vet. Sc., Nutrit. and Nat. Resources*, vol. 2, nr. 13, 11 p. e-ISSN 1749-8848. Disponibil: <https://www.cabi.org/bni/FullTextPDF/2007/20073085842.pdf>
225. KIM, J.J., LEE, S.-S., RA, J.-B., LEE, H., HUH, N., KIM, G.-H. 2011 a. Fungi associated with bamboo and their decay capabilities. In: *Holzforschung*, vol. 65, nr. 2, pp. 271-275. e-ISSN 1437-434X, ISSN 0018-3830.
226. KIM, J.S., JE, Y.H., WOO, E.O., PARK, J.S. 2011 b. Persistence of *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae) SFP-198 conidia in corn oil-based suspension. In: *Mycopathologia*, vol. 171, pp. 67-75. e-ISSN 1573-0832, ISSN 0301-486X.
227. KING, J.M. 1981. Experiments for the control of pea and bean weevil (*Sitona lineatus*) in peas using granular and liquid insecticides. In: *Proceedings 1981 BCPC Pest and Diseases, 16-19 November 1981, Brighton, England*. pp. 327-331.
228. KIRBY, W. 1826. Diseases of insects. In: W. KIRBY, W. SPENCE (Eds.), *An introduction to entomology or elements of the natural history of insects*. Vol. 4. (pp. 197-232). Hurst, Rees, Orme and Brown, London: Longman. 634 p. Disponibil: <https://www.biodiversitylibrary.org/item/79774#page/13/mode/1up>
229. KNOWLES, A. 2005. New developments in crop protection product formulation. In: *Agrow Reports*. UK: T and F Informa UK Ltd., pp. 153-156.
230. KNOWLES, A. 2006. Adjuvants and additives. In: *Agrow Reports*. UK: T&F Informa UK Ltd., pp. 126-129.
231. KNOWLES, A. 2008. Recent developments of safer formulations of agrochemicals. In: *Environmentalist*, vol. 28, nr. 1, pp. 35-44. ISSN 0251-1088.
232. KOCH, E., ZINK, P., ULLRICH, C. I., KLEESPIES, R. G. 2018. Light microscopic studies on the development of *Beauveria bassiana* and other putative endophytes in leaf tissues. In: *Journal für Kulturpflanzen*, vol. 70, nr. 3, pp. 95-107. ISSN 1867-0938.
233. KOEHLER, C. S., ROSENTHAL, S. S. 1975. Economic injury levels of the Egyptian alfalfa weevil or the alfalfa weevil. In: *Journal of Economic Entomology*, vol. 68, pp. 71-75. e-ISSN 1938-291X, ISSN 0022-0493.
234. KOEHLER, P. G., PIMENTEL, D. 1973. Economic injury levels of the alfalfa weevil. In: *Canadian Entomologist*, vol. 105, pp. 61-74. e-ISSN 1918-3240, ISSN 0008-347X.
235. KOLARIK, P., ROTREKL, J. 2013. Regulation of the abundance of clover seed weevils, *Apion* spp. (Coleoptera: Curculionidae) in a seed stand of red clover (*Trifolium pratense* L.). In: *Journal of Entomological and Acarological Research*, vol. 45, 19 p. e-ISSN 2279-7084, ISSN 2038-324X. Disponibil: <https://www.pagepressjournals.org/index.php/jear/article/view/jear.2013.e19/5527>
236. KORDAN, B., SLEDZ, D. 1994. Food preferences of pea weevil (*Sitona lineata* L.) and its survival on different pea (*Pisum sativum* L.) cultivars in laboratory conditions. In: *Acta Academiae Agriculturae ac Technicae Olstenensis*, vol. 59, pp. 107-113. ISSN 0860-2832.
237. KOROTYAEV, B.A. 1990. Materialy po faune zhukov nadsemeistva Curculionoidea (Coleoptera) Mongolii i sopredelnykh stran. In: KERZHNER, I.M., ed., *Insects of Mongolia. Vol. 11*. Leningrad: Zoological Institute, pp. 216-234. [în l. rusă].
238. KRASILSHCHIK, I.M. 1916. Organizatsiya bor'by s vreditelyami sel'skogo khozyaystva na mestakh v 1915 godu. In: *Otchet o deyatel'nosti bio-entomologicheskoy stantsii za 1914- 1915 gg.* Kishinev, c. 69-94. [în l. rusă].
239. KRASNOPOLSKAYA, L.F. 1968. Damage caused to leguminous crops by root-nodule

- weevils of the genus *Sitona* (abstract). In: *The Review of Applied Entomology Series A*, vol. 56, p. 2288. ISSN 0305-0076.
240. KRUESS, A., TSCHARNTKE, T. 1994. Habitat fragmentation, species loss, and biological control. In: *Science*, vol. 264, pp. 1581-1584. e-ISSN 1095-9203, ISSN 0036-8075.
241. KUDELA, V., HAVLICKOVA, H., VACKE, J. 1984. *Sitona lineatus* as a vector of *Corynebacterium michiganense* p.v. *insidiosum*. In: *Ochrana Rostlin (Plant Protection Science)*, vol. 20, pp. 267-271. e-ISSN 1805-9341, ISSN 1212-2580.
242. KUDO, R. 1924. *A biologic and taxonomic study of the Microsporidia*. Illinois Biol. Monog. (Vol. 9). Univ. of Illinois. Nos. 1 and 2. Disponibil: <https://www.biodiversitylibrary.org/part/327250>
243. KUHAR, T. P., YOUNGMAN, R. R., LAUB, C. A. 2000. Alfalfa weevil (Coleoptera: Curculionidae) population dynamics and mortality factors in Virginia. In: *Environmental Entomology*, vol. 29, pp. 1295-1304. e-ISSN 1938-2936, ISSN 0046-225X.
244. KUMAR, S., STECHER, G., TAMURA, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. In: *Molecular Biology and Evolution*, vol. 33, pp. 1870-1874. e-ISSN 1537-1719, ISSN 0737-4038.
245. KUWATA, R., TOKUDA, M., YAMAGUCHI, D., YUKAWA, J. 2005. Coexistence of two mitochondrial DNA haplotypes in Japanese populations of *Hypera postica* (Col., Curculionidae). *Journal of Applied Entomology*, vol. 129, pp. 191-197. e-ISSN 1439-0418. Disponibil: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1439-0418.2005.00954.x>
246. LACEY, L.A., GRZYWACZ, D., SHAPIRO-ILAN, D.I., FRUTOS, R., BROWNBRIDGE, M., GOETTEL, M.S. 2015. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. In: *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 132, pp. 1-41. e-ISSN 1096-0805, ISSN 0022-2011.
247. LACEY, L.A., SOLTER, L.F. 2012. Chapter I. Initial handling and diagnosis of diseased invertebrates. In: LACEY, L., ed. *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology, 2nd Edition*. Academic Press, pp. 1-14. e-ISBN 978-0-12386-9-005, ISBN 978-0-12386-8-992.
248. LAMBERTH, C., JEANMART, S., LUKSCH, T., PLANT A. 2013. Current challenges and trends in the discovery of agrochemicals. In: *Science* [online], vol. 341, nr. 6147, pp. 742-746 [citat 25.09.2018]. e-ISSN 1095-9203, ISSN 0036-8075.
249. LANDA, B.B., LOPEZ-DIAZ, C., JIMENEZ-FERNANDEZ, D., MONTES-BORREGO, M., MUNOZ-LEDESMA, F. J., ORTIZ-URQUIZA, A., QUESADA-MORAGA, E. 2013. In-plant detection and monitorization of endophytic colonization by a *Beauveria bassiana* strain using a new-developed nested and quantitative PCR-based assay and confocal laser scanning microscopy. In: *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 114, nr. 2, pp. 128-138. e-ISSN 1096-0805, ISSN 0022-2011.
250. LANDIS, D. A., WRATTEN, S. D., GURR, G. M. 2000. Habitat management to conserve natural enemies of arthropod pests in agriculture. In: *Annual Review of Entomology*, vol. 45, pp. 175-201. e-ISSN 1545-4487.
251. LANDON, F., LEVIEUX, J., HUIGNARD, J., ROUGAN, D., TAUPIN, M. P. 1995. Feeding activity of *Sitona lineatus* L. (Col., Curculionidae) on *Pisum sativum* L. (Leguminosae) during its imaginal life. In: *Journal of Applied Entomology*, vol. 119, pp. 515-522. e-ISSN 1439-0418.
252. LECATO, G. L., PIENKOWSKI, R. L. 1972. High- or low-temperature treatments affecting alfalfa weevil fecundity, egg fertility, and longevity. In: *Journal of Economic Entomology*, vol. 65, pp. 146-148. e-ISSN 1938-291X, ISSN 0022-0493.
253. LEE, J.Y., WOO, R.M., CHOI, C.J., SHIN, T.Y., GWAK, W.S., WOO, S.D. 2019. *Beauveria bassiana* for the simultaneous control of *Aedes albopictus* and *Culex pipiens* mosquito

- adults shows high conidia persistence and productivity. In: *AMB Express*, vol. 9, nr. 1, art. nr. 206, 9 p. e-ISSN: 2191-0855. Disponibil: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6925604/>
254. LERIN, J. 2004. Modeling embryonic development in *Sitona lineatus* (Coleoptera: Curculionidae) in fluctuating temperatures. In: *Environmental Entomology*, vol. 33, pp. 107-112. e-ISSN 1938-2936, ISSN 0046-225X.
255. LEWIS, M. W., ROBALINO, I. V., KEYHANI, N. O. 2009. Uptake of fluorescent probe FM4-64 by hyphae and haemolymph-derived in vivo hyphal bodies of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. In: *Microbiology*, vol. 155, pp. 3110-3120. e-ISSN 1465-2080, ISSN 1350-0872.
256. LINNAEI, C. 1758. *Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera species, cum characteribus differentiis, synonymis, locis*. Editio Decima, Reformata. L. Salvii, Homiae.
257. LITSINGER, J. A., APPLE, J. W. 1973. Thermal requirements for embryonic and larval development of the alfalfa weevil in Wisconsin. In: *Journal of Economic Entomology*, vol. 66, pp. 309-311. e-ISSN 1938-291X, ISSN 0022-0493.
258. LONG, R.F., NETT, M., PUTNAM, D.H., SHAN, G. SCHMIERER, J., REED, B. 2002. Insecticide choice for alfalfa may protect water quality. In: *California Agriculture*, vol. 56, p. 163-169. Disponibil: <https://scholarship.uc/item/16t77932#main>
259. LOPES, R.B., FARIA, M. 2019. Influence of two formulation types and moisture levels on the storage stability and insecticidal activity of *Beauveria bassiana*. In: *Biocontrol Science and Technology*, vol. 29, nr. 5, pp. 437-450. Disponibil: <https://doi.org/10.1080/09583157.2019.1566436>
260. LOPEZ, D.C., SWORD, G.A. 2015. The endophytic fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Purpureocillium lilacinum* enhance the growth of cultivated cotton (*Gossypium hirsutum*) and negatively affect survival of the cotton bollworm (*Helicoverpa zea*). In: *Journal of Biological Control*, vol. 89, pp. 53–60. e-ISSN 2230-7281, ISSN 0971-930X.
261. LOPEZ-PEREZ, M., RODRIGUEZ-GOMEZ, D., LOERA, O. 2015. Production of conidia of *Beauveria bassiana* in solid-state culture: current status and future perspectives. In: *Critical Reviews in Biotechnology*, vol. 35, nr. 3, pp. 334-341. e-ISSN 1549-7801, ISSN 0738-8551.
262. LORD, J.C., ANDERSON, S., STANLEY, D.W. 2012. Eicosanoids mediate *Manduca sexta* cellular response to the fungal pathogen *Beauveria bassiana*: a role for the lipoxygenase pathway. In: *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, vol. 51, pp. 46-54. e-ISSN 1520-6327.
263. LOVERA, A., BELAICH, M., VILLAMIZAR, L., PATARROYO, M.A., BARRERA, G. 2020. Enhanced virulence of *Beauveria bassiana* against *Diatraea saccharalis* using a soluble recombinant enzyme with endo- and exochitinase activity. In: *Biological Control*, vol. 144, art. nr. 104211. ISSN 1049-9644. Disponibil: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104211>
264. LUANGSA-ARD, J. J., TASANATHAI, K., MONGKOLSAMRIT, S., HYWEL-JONES, N. L. 2010. *Atlas of Invertebrate-Pathogenic Fungi of Thailand, Vol. 3*. Thailand: National Center for Genetic Engineering and Biotechnology. ISBN 978-9746428507.
265. LUANGSA-ARD, J.J., BERKAEW, P., RIDKAEW, R., HYWEL-JONES, N.L., ISAKA, M. 2009. A beauvericin hot spot in the genus *Isaria*. In: *Mycological Research*, vol. 113, pp. 1389-1395. ISSN 0953-7562.
266. LUKYANOVICH, F.K., TER-MINASYAN, M.E. 1955. Semeystvo Curculionidae – Dolgonosiki, ili sloniki. In: *Vrediteli lesa*. Moscva, Leningrad.-L. T.2, pp. 592 - 648. [în l. rusă].

267. LUNDIN, O., RUNDLOF, M., SMITH, H.G., BOMMARCO, R. 2012. Towards integrated pest management in red clover seed production. In: *Journal of Economic Entomology*, vol. 105, nr. 5, pp. 1620-1628. e-ISSN 1938-291X.
268. LYKOURESSIS, D.P., EMMANOUEL, N.G. 1991. Biological aspects of some arthropod pests of lucerne in Greece. In: *Journal of Applied Entomology*, vol. 111, pp. 526-532. e-ISSN 1439-0418.
269. MAESTRI, A. 1856. Frammenti anatomici, fisiologici e patologici sul baco da seta. Pavia: Fratelli Fusi.
270. MAHARACHCHIKUMBURA, S.S.N., HYDE, K.D., JONES, E.B., JONES, G. E. B., MCKENZIE, E. H. C., BHAT, J.D., DAYARATHNE, M.C., HUANG, S.-K., NORPHANPHOUN, C., SENANAYAKE, I.C., PERERA, R.H., SHANG, Q.-J., XIAO, Y., D'SOUZA, M. J., HONGSANAN, S., JAYAWARDENA, R.S., DARANAGAMA, D.A., KONTA, S., GOONASEKARA, I.D., ZHUANG, W.-Y., JEEWON, R., PHILLIPS, A.J.L., ABDEL-WAHAB, M.A., AL-SADI, A.M., BAHKALI, A.H., BOONMEE, S., BOONYUEN, N., CHEEWANGKON, R., DISSANAYAKE, A.J., KANG, J., LI, Q.-R., LIU, J.K., LIU, X.Z., LIU, Z.Y., LUANGSA-ARD, J.J., PANG, K.-L., PHOOKAMSAK, R., PROMPUTHA, I., SUETRONG, S., STADLER, M., WEN, T., WIJAYAWARDENE, N.N. 2016. Families of Sordariomycetes. In: *Fungal Diversity*, vol. 79, pp. 1-317. e-ISSN 1878-9129, ISSN 1560-2745. Disponibil: <https://doi.org/10.1007/s13225-016-0369-6>.
271. MAJEED, M.Z., FIAZ, M., MA, C.-S., AFZAL, M. 2017. Entomopathogenicity of three muscardine fungi, *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea* and *Metarhizium anisopliae*, against the asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Psyllidae). In: *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, vol. 27, pp. 211-215. e-ISSN 2536-9342.
272. MALEVANCIUC, N., MUNTEANU, N. 2010. Fauna and ecology of the weevils (Coleoptera: *Curculionidae*) associated with leguminous plants in the Republic of Moldova. In: *Oltenia. Studii și comunicări. Științele naturii*, vol. 26, nr. 2, pp. 151-154. ISSN 1454-6914.
273. MARKKULA, M., KOPPA, P. 1960. The composition of the *Sitona* (Col., Curculionidae) population on grassland legume and some other leguminous plants. In: *Annales Entomologici Fennici*, vol. 26, pp. 246-263. ISSN 0003-4428.
274. MARONI, M., FANETTI, A.C., METRUCCIO, F. 2006. Risk assessment and management of occupational exposure to pesticides in agriculture. In: *La Medicina del Lavoro*, vol. 97, pp. 430-437. e-ISSN 2532-1080, ISSN 0025-7818.
275. MATTES, O. 1927. Parasita`re Krenkheiten der Mehlmottenlarven und Versuch u`ber ihre Verwendbarkeit als biologisches Beka`mpfungsmittel. In: *Ges. Beford. Gesamte Naturwiss. Marburg*, vol. 62, pp. 381-417.
276. MCCARTHY, C.G.P. FITZPATRICK, D.A. 2017. Multiple approaches to phylogenomic reconstruction of the fungal kingdom. In: *Advances in Genetics*, vol. 100, pp. 211-266. Disponibil: <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2017.09.006>.
277. MCCLATCHIE, G.V., MOORE, D., BATEMAN, R.P., PRIOR, C. 1994. Effect of temperature on the viability of the conidia of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations. In: *Mycological Research*, vol. 98, pp. 749-756. ISSN 0953-7562.
278. MCCOY, C.W., SAMSON, R.A., BOUCIAS, D.G. 1988. Entomogenous fungi. In: IGNOFFO, C.M., MANDAVA, N.B., eds. *Handbook of natural pesticides. Vol. 5. Microbial pesticides. Part A: entomogenous protozoa and fungi*. Boca Raton, Florida: CRC Press, pp. 151-236. ISBN 978-0849336607.
279. MCKINNON, A.C., SAARI, S., MORAN-DIEZ, M.E., MEYLING, N.V., RAAD, M., GLARE, T.R. 2017. *Beauveria bassiana* as an endophyte: a critical review on associated methodology and biocontrol potential. In: *BioControl*, vol. 62, pp. 1-17. e-ISSN 1573-8248, ISSN 1386-6141. Disponibil: <https://doi.org/10.1007/s10526-016-9769-5>

280. MCLAUGHLIN, D.J., HIBBETT, D.S., LUTZONI, F., SPATAFORA, J.W., VILGALYS, R. 2009. The search for the fungal tree of life. In: *Trends in Microbiology*, vol. 17, pp. 488-497. Disponibil: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.08.001>.
281. MCLAUGHLIN, D.J., SPATAFORA, J.W. (eds). 2014. *The Mycota Systematics and Evolution, VII part A*: (2nd ed.). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. 461 p. ISBN 978-3-642-55317-2. Disponibil: <https://doi.org/10.1007/978-3-642-55318-9>
282. MCLAUGHLIN, D.J., SPATAFORA, J.W. (eds). 2015. *The Mycota Systematics and Evolution, VII part B*: (2nd ed.). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. 311 p. ISBN 978-3-662-46010-8. Disponibil: <https://doi.org/10.1007/978-3-662-46011-5>.
283. MEDLIN, L., ELWOOD, H. J., STICKEL, S., SOGIN, M. L. 1988. The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA - coding regions. In: *Gene*, vol. 71, pp. 491-499. ISSN 0378-1119.
284. MERT, H.H., DIZBAY, M. 1977. The effect of osmotic pressure and salinity of the medium on the growth and sporulation of *Aspergillus niger* and *Paecilomyces lilacinum* species. In: *Mycopathologia*, vol. 61, pp. 125-127. e-ISSN 1573-0832, ISSN 0301-486X.
285. MEYLING, N. V., THORUP-KRISTENSEN, K., EILENBERG, J. 2011. Below- and aboveground abundance and distribution of fungal entomopathogens in experimental conventional and organic cropping systems. In: *Biol. Control*, vol. 59, pp. 180-186. ISSN 1049-9644. Disponibil: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.07.017>
286. MEYLING, N.V., EILENBERG, J. 2007. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. In: *Biological Control*, vol. 43, nr. 2, pp. 145-155. ISSN 1049-9644, Disponibil: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.07.007>
287. MICHELbacher, A.E. 1943. The present status of the alfalfa weevil in California. In: *Univ. Calif., Berkeley, Agric. Exp. Stn., Bull.*, vol. 677, pp. 12-16.
288. MIETKIEWSKI, R., TKACZUK, C., ZUREK, M., van der GEEST, L.P.S. 1994. Temperature requirements of four entomopathogenic fungi. In: *Acta Mycologica*, vol. 29, nr. 1, pp. 109-120. e-ISSN 2353-074X, ISSN 0001-625X (anulat din 2015).
289. MIHALACHE, G., PÎRVESCU, D. 1980. *Microorganismele în combaterea biologică a dăunătorilor forestieri*. București: Editura CERES. 271 p.
290. MILLER, G.T. 2004. *Sustaining the Earth: An Integrated Approach*. Thomson, Brooks Cole, , pp. 211-216. ISBN 978-0-534-40088-0.
291. MILNER, R. J. 1994. History of *Bacillus thuringiensis*. In: *Agric. Ecosyst. Environ.*, vol. 49, pp. 9-13.
292. MISHRA, S., KUMAR, P., MALIK, A. 2015. Effect of temperature and humidity on pathogenicity of native *Beauveria bassiana* isolate against *Musca domestica* L. In: *Journal of Parasitic Diseases*, vol. 39, pp. 4, pp. 697-704. e-ISSN 0975-0703, ISSN 0971-7196.
293. MOHAMMADPOUR, K., JAFARLU, M., SOLTANI, H. 2018. Studying the efficacy of fipronil (WG 80%) against alfalfa weevil, *Hypera postica* (Coleoptera: Curculionidae). In: *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, vol. 53, nr. 2, pp. 241-245. ISSN 0238-1249.
294. MOLDOVAN, A. 2018. Managementul dăunătorilor, bolilor și buruienilor. In: CIUBOTARU, V. et al. *Manualul de instruire pentru formatori și fermieri: Sistemul de Agricultură Ecologică*. Chișinău: pp. 56-66. ISBN 978-9975-89-095-3.
295. MOLDOVAN, A. 2019. Controlul biologic al Coleopterelelor Curculionoide (Coleoptera, Curculionoidea): probleme, realizări și perspective. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții*, vol. 337, nr. 1, pp. 131-142. ISSN 1857-064X.
296. MOLDOVAN, A., DONI, E., MUNTEANU-MOLOTIEVSKIY, N., TODERAȘ, I. 2022. Influența radiațiilor UV asupra tulpinilor de fungi entomopatogeni *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01 și *Cordyceps fumosorosea* CNMN-FE-02. In: *Revista de Știință, Inovare*,

- Cultură și Artă Akademos*, vol. 1, pp. 30-36. e-ISSN 2587-3687, ISSN 1857-0461. Disponibil: <https://doi.org/10.52673/18570461.22.1-64.04>
297. MOLDOVAN, A., MUNTEANU-MOLOTIEVSKIY, N. 2017. Evidențierea microflorei fungice a coleopterelor curculionide – dăunători ai lucernei în Republica Moldova. In: Rezumate ale comunicărilor. *Științe ale naturii și exacte. Științe economice. Conferința științifică națională cu participare internațională „Integrare prin Cercetare și Inovare”, 9-10 noiembrie, 2017, Universitatea de Stat din Moldova, Chișinău, Republica Moldova.* pp. 74-77. ISBN 978-9975-71-929-2.
298. MOLDOVAN, A., MUNTEANU-MOLOTIEVSKIY, N. 2019. New *Beauveria bassiana* strain (Bals.-Criv.) Vuill., pathogenicity against weevil pests and physiological characterization. In: *Book of abstracts. International Congress on Invertebrate Pathology and Microbial Control & 52nd Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology & 17th Meeting of the IOBC-WPRS Working Group „Microbial and Nematode Control of Invertebrate Pests”, 28th July - 1st August, 2019, Valencia, Spain*, p. 100.
299. MOLDOVAN, A., MUNTEANU-MOLOTIEVSKIY, N., TODERAȘ, I. 2018. *Tulpină de fungi Beauveria bassiana – bioinsecticid pentru combaterea coleopterelor curculionide*. Brevet de invenție MD 4560 (13) B1, Int. Cl.: A01N 63/00 (2006.01); A01N 63/04 (2006.01); C12N 1/14 (2006.01); C12R 1/645 (2006.01); A01P 7/04 (2006.01). Institutul de Zoologie al Academiei de Științe a Moldovei. Nr. depozit a 2017 0057. Data depozit 23.05.2017. Publicat 30.04.2018. In: *BOPI*, vol. 4, pp. 51-52.
300. MOLDOVAN, A., MUNTEANU-MOLOTIEVSKIY, N., TODERAȘ, I. 2021. Influența pH-ului mediului nutritiv asupra creșterii și dezvoltării tulpinii de fungi *Beauveria bassiana* CNMN-FE-01. In: *Biotehnologii moderne - soluții pentru provocările lumii contemporane*. 20-21 mai 2021, Chișinău. Chișinău, Republica Moldova: Tipografia „Artpoligraf”, p. 151. ISBN 978-9975-3498-7-1.
301. MOLDOVAN, A., MUNTEANU-MOLOTIEVSKIY, N., TODERAȘ, I. Studii preliminare privind agenții de control biologic al dăunătorilor tomatelor în Republica Moldova. In: *Functional Ecology of Animals 70th anniversary from the birth of academician I.Toderas*. 21 septembrie 2018, Chișinău. Chișinău, Republica Moldova: Institutul de Zoologie, 2018, pp. 287-289. ISBN 978-9975-3159-7-5.
302. MOLDOVAN, A., MUNTEANU-MOLOTIEVSKIY, N., TODERAȘ, I. 2022. Temperature effects on the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* strain CNMN-FE-01: vegetative growth, sporulation, germination rate. In: *Current Trends in Natural Sciences*. Vol. 11, Issue 21, pp. 332-338. ISSN 2284-953X. Disponibil: <https://doi.org/10.47068/ctns.2022.v11i21.036>
303. MOLDOVAN, A., TODERAS, I., LECLERQUE, A., MUNTEANU-MOLOTIEVSKIY, N. 2017. Isolation and identification of fungal community of alfalfa pest weevils (Coleoptera: Curculionidae) in the Republic of Moldova. In: *IOBC WPRS Bulletin*, vol. 129, pp. 70-73. ISSN 1027-3115.
304. MOLDOVAN, A., TODERAS, I., MUNTEANU-MOLOTIEVSKIY, N. 2018. Virulence of *Beauveria bassiana* against pe leaf weevil *Sitona lineatus* L. (Coleoptera Curculionidae) a new strain from the Republic of Moldova. In: *Book of abstracts. International Conference on Microbial Biotechnology (4th edition), October 11-12, 2018, Chisinau, Republic of Moldova*. p. 106. ISBN 978-9975-3178-8-7.
305. MOLDOVAN, A., TODERAȘ, I., MUNTEANU-MOLOTIEVSKIY, N. Noi agenți bacterieni de control biologic al insectelor dăunătoare în Republica Moldova. In: *Actual Problems of Zoology and Parasitology: Achievements and Prospects*. 13 octombrie 2017, Chișinău. Chișinău, Republica Moldova: Institutul de Zoologie, 2017, pp. 303-309. ISBN 978-9975-66-590-2.

306. MOLLET, H., GRUBENMANN, A. 2001. *Formulation technology*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag, pp. 389-397, 421 p. ISBN 3-527-30201-8.
307. MOORE, D., BATEMAN, R.P., CAREY, M., PRIOR, C. 1995. Longterm storage of *Metarhizium flavoviride* conidia in oil formulation for the control of locusts and grasshoppers. In: *Biocontrol Science and Technology*, 5, 193-199. Disponibil: <https://doi.org/10.1080/09583159550039918>
308. MOORE, D., ROBSON, G. D., TRINCI A. P. J. 2020. *21st Century Guidebook to Fungi*. 2nd edition Cambridge University Press. 610 p. ISBN 978-1108745680.
309. MORA, M.A.E., CASTILHO, A.M.C., FRAGA, M.E. 2017. Classification and infection mechanism of entomopathogenic fungi. In: *Arquivos do Instituto Biológico*, vol. 84, nr. article e0552015. Disponibil: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1808-16572017000100403&lng=en&nrm=iso
310. MORDOR INTELLIGENCE. *Alfalfa hay market - growth, trends, and forecast (2020 - 2025)*. © 2020. [citat 07.06.2020]. Disponibil: <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/alfalfa-hay-market>
311. MORLEY-DAVIS, J., MOORE, D., PRIOR, C. 1995. Screening of *Metarhizium* and *Beauveria* spp. conidia with exposure to stimulated sunlight and a range of temperatures. In: *Mycological Research*, vol. 100, pp. 31-38. ISSN 0953-7562.
312. MULLER-KOGLER, E., STEIN, W. 1970. Greenhouse studies with *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. on the infection of *Sitona lineatus* (L.) (Coleopt., Curcul.) in the soil. In: *Journal of Applied Entomology*, vol. 65, nr. 1, pp. 59-76. e-ISSN 1439-0418.
313. MUNIZ-PAREDES, F., MIRANDA-HERNANDEZ, F., LOERA, O. 2017. Production of conidia by entomopathogenic fungi: from inoculants to final quality tests. In: *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 33, nr. 3, p 57. e-ISSN 1573-0972, ISSN 0959-3993.
314. MUNTEANU MOLOTIEVSKIY, N., BACAL, S., MOLDOVAN, A. 2015. Occurrence of *Sitona* weevils (Coleoptera, Curculionidae) in alfalfa crops in the Republic of Moldova. In: *Materialele Conferinței științifico-practice „Rezultatele cercetărilor la cultura plantelor de câmp în Republica Moldova”, 19 iunie 2015, Bălți, Republica Moldova*. pp. 240-245.
315. MUNTEANU, N., BACAL, S., MOLDOVAN, A., MALEVANCIUC, N., TODERAS, I. 2014 a. Beetle communities of alfalfa (*Medicago sativa* L.) in the Republic of Moldova. In: *APCBEE Procedia*, vol. 8, pp. 21-26. ISSN 2212-6708.
316. MUNTEANU, N., MALEVANCIUC, N., TODERAS, I., MOLDOVAN, A., BACAL, S. 2012. Raspredelenie i biologiceskie osobennosti razvitiya vida *Sitona lineatus* (Coleoptera: Curculionidae) v Respublike Moldova. In: *Buletinul Academiei de Științe. Științele vieții*, vol. 3(318), pp. 131-138. ISSN 1857-064X. [în l. rusă].
317. MUNTEANU, N., TODERAȘ, I., MOLDOVAN A., MALEVANCIUC, N., TODERAȘ, L., RAILEAN, N. 2013. *Tulpina Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki – insecticid biologic pentru combaterea coleoptelilor curculionide*. Brevet de invenție 4196 (13) C1. Int. Cl.: A01N 63/00 (2006.01); C12N 1/20 (2006.01); C12R 1/07 (2006.01); A01P 7/04 (2006.01). Institutul de Zoologie al Academiei de Științe a Moldovei. Nr. depozit a 2012 0040. Data depozit 2012.04.27. Publicat 2013.02.28. In: *BOPI*, 2013, vol. 2., p. 19.
318. MUNTEANU, N.V., DANISMAZOGLU, M., MOLDOVAN, A.I., TODERAS, I.K., NALCACIOGLU, R., DEMIRBAG, Z. 2014 b. The first study on bacterial flora of pest beetles *Sciaphobus squalidus*, *Tatianaerhynchites aequatus* and *Byctiscus betulae* in the Republic of Moldova. In: *Biologia*, vol. 69, nr. 5, pp. 681-690. e-ISSN 1336-9563, ISSN 0006-3088.
319. MURRAY, P.J., CLEMENTS, R.O. 1992. Studies on the feeding of *Sitona lineatus* L. (Coleoptera: Curculionidae) on white clover (*Trifolium repens* L.) seedlings. In: *Annals of Applied Biology*, vol. 121, pp. 233-238. e-ISSN 1744-7348.

320. MURRAY, P.J., CLEMENTS, R.O. 1994. Investigations of the host feeding preferences of *Sitona* weevils found commonly on white clover (*Trifolium repens*) in the UK. In: *Entomologia Experimentalis et Applicata*, vol. 71, pp. 73-79. e-ISSN 1570-7458.
321. MURRAY, P.J., CLEMENTS, R.O. 1995. Distribution and abundance of three species of *Sitona* (Coleoptera: Curculionidae) in grassland England. In: *Annals of Applied Biology*, vol. 127, pp. 229-237. e-ISSN 1744-7348.
322. MUSTAFA, R.A.M, LAZGEEN, H.A., ABDULLAH, S.K. 2014. Comparative pathogenicity of *Beauveria bassiana*, *Clonostachys rosea*, *Metarhizium anisopliae*, and *Lecanicillium lecanii* to adult, alfalfa weevil *Hypera postica* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae). In: *International Conference on Applied Life Sciences (ICALS2014) Malaysia, 18-20 September, 2014*. p. 11. ISSN 2304-0513.
323. MUSTAFA, U., GURVINDER, K. 2008. UV-B radiation and temperature stress causes variable growth response in *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* isolates. In: *The Internet Journal of Microbiology*, vol. 7, nr. 1, 8p. Disponibil: <https://print.ispub.com/api/0/ispub-article/11494>
324. MUTCH, L.A., YOUNG, P.W. 2004. Diversity and specificity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* on wild and cultivated legumes. In: *Molecular Ecology*, vol. 13, pp. 2435-2444. e-ISSN 1365-294X.
325. MWAMBURI, L.A., LAING, M.D., MILLER, R.M. 2015. Effect of surfactants and temperature on germination and vegetative growth of *Beauveria bassiana*. In: *Brazilian Journal of Microbiology*, vol.46, n. 1. pp. 67-74. ISSN 1678-4405. Disponibil: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822015000100067&lng=en&nrm=iso
326. NAZARENKO, V.I. 2013. K izuceniyu zhukov nadsemeystva Curculionoidea (Coleoptera) Natsional'nogo prirodnogo parka „Desnyansko-Starogutskiy”. In: *Ukrains'kiy entomologichniy zhurnal*, vol.1, nr. 6, pp. 12-32. ISSN 2226-4272 [in l. rusă].
327. NIELSEN, B.S., JENSEN, T.S. 1993. Spring dispersal of *Sitona lineatus*: the use of aggregation pheromone traps for monitoring. In: *Entomologia Experimentalis et Applicata*, vol. 66, pp. 21-30. e-ISSN 1570-7458.
328. NIEMCZYK, H. D., FLESSEL, J. K. 1970. Population dynamics of alfalfa weevil eggs in Ohio. In: *Journal of Economic Entomology*, vol. 63, pp. 242-247. e-ISSN 1938-291X, ISSN 0022-0493.
329. NIKOLOVA, I. 2018. Insect pests in forage crops and integrated plant protection. In: *Agricultural Research & Technology: Open Access Journal*, vol. 17, nr. 5, article nr. 556038, 14p. Disponibil: <https://juniperpublishers.com/artoaj/pdf/ARTOAJ.MS.ID.556038.pdf>
330. NISHIMOTO, R. 2019. Global trends in the crop protection industry. In: *Journal Pesticide Science*, vol. 44, nr. 3, pp. 141-147. e-ISSN 1349-0923, ISSN 1348-589X. Disponibil: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jpestics/44/3/44_D19-101/_pdf/-char/en
331. OBERPRIELER, R.G. 2014. 3.7 Curculionidae Latreille, 1802. In: LESCHEN, R.A.B., BEUTEL, R.G., eds. *Handbook of zoology, Vol. IV: Arthropoda: Insecta. Part 38 Coleoptera, beetles, Vol. III: Morphology and systematics (Phytophaga)*. Berlin, Germany: Walter de Gruyter, pp. 423-424. ISBN 978-3-11-027370-0, e-ISBN 978-3-11-027446-2.
332. OERKE, E.C. 2006. Centenary review, crop losses to pests. In: *The Journal of Agricultural Science*, vol. 144, pp. 31-43. e-ISSN 1469-5146, ISSN 0021-8596.
333. OKUMURA, M., SHIRAIISHI, A. 2002. Establishment of alfalfa weevil parasitoid and its potential for biological control. In: *Plant Protection*, vol. 56, nr. 8, pp. 329-333. ISSN 2617-1287.
334. OLIVEIRA de, D. G. P., LOPES, R. B., REZENDE, J. M., DELALIBERA, I. 2018. Increased tolerance of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* conidia to high tempe-

- ature provided by oil-based formulations. In: *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 151, pp. 151-157. e-ISSN 1096-0805, ISSN 0022-2011.
335. OSBORNE, L., LANDA, Z. 1992. Biological control of whiteflies with entomopathogenic fungi. In: *Florida Entomologist*, vol. 75, pp. 456-471. e-ISSN 2163-632X, ISSN 1930-4013.
336. OUAYOGODE, B., DAVIS, D. 1981. Feeding by selected predators on alfalfa weevil larvae. In: *Environmental Entomology*, vol. 10, pp. 62-64. e-ISSN 1938-2936, ISSN 0046-225X.
337. PADMAVATHI, J., UMA DEVI, K., UMA MAHESWARA RAO, C. 2003. The optimum and tolerance pH range is correlated to colonial morphology in isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* – a potential biopesticide. In: *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 19, pp. 469-477. e-ISSN 1573-0972, ISSN 0959-3993.
338. PAILLOT, A. 1933. L'infection chez les insectes: immunité' et symbiose. Tre'voux: G. Patissier.
339. PAL, S., ST. LEGER, R.J., WU, L.P. 2007. Fungal peptide destruxin A plays a specific role in suppressing the innate immune response in *Drosophila melanogaster*. In: *Journal Biological Chemistry*, vol. 282, pp. 8969-8977. e-ISSN 1083-351X, ISSN 0021-9258. Disponibil: <https://doi.org/10.1074/jbc.M605927200>
340. PARSA, S., ORTIZ, V., VEGA, F.E. 2013. Establishing fungal entomopathogens as endophytes: towards endophytic biological control. In: *JOVE Journal of Visualized Experiments*, vol. 74, article nr. 50360, 5p. Disponibil: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3654456/pdf/jove-74-50360.pdf>
341. PASS, B.C. 1967. Observations on the oviposition by the alfalfa weevil. In: *Journal of Economic Entomology*, vol. 60, p. 288. e-ISSN 1938-291X, ISSN 0022-0493.
342. PATOCKA, J. 2016. Bioactive metabolites of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*. I: *Military Medical Science Letters (Voj. Zdrav. Listy)*, vol. 85, nr. 2, pp. 80-88. ISSN 0372-7025.
343. PATWARDHAN, A., GANDHE, R., GHOLE, V., MOURYA, D. 2005. Larvicidal activity of the fungus *Aphanomyces* (Oomycetes: Saprolegniales) against *Culex quinquefasciatus*. In: *J. Commun. Dis.*, vol. 37, pp. 269-274. e-ISSN 2581-351X, ISSN 0019-5138.
344. PAVA-RIPOLL, M., ANGELINI, C., FANG, W., WANG, S., POSADA, F.J., ST. LEGER, R. 2011. The rhizosphere-competent entomopathogen *Metarhizium anisopliae* expresses a specific subset of genes in plant root exudate. In: *Microbiology*, vol. 157, pp. 47-55. e-ISSN 1465-2080, ISSN 1350-0872.
345. PAVLOVSKY, E. N. 1952. The place of insect pathology and entomology in the development of Soviet science. Pp. 1-15 în rusă edition of Principles of insect pathology. E. A. Steinhuas. McGraw-Hill, New York. 757 pp. Publications of Foreign Literature, Moscow.
346. PEDIGO, L. P., RICE, M. E. 2009. *Entomology and Pest Management* (6th ed.). Upper Saddle River: Pearson Prentice Hall. ISBN 978-1478622857.
347. PEDRINI, N., CRESPO, R., JUAREZ, M. P. 2007. Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. In: *Physiol C Toxicol Pharmacol*. Vol. 146, pp. 124-137. ISSN 1532-0456. Disponibil: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.08.003>
348. PELLISSIER, M.E., NELSON, Z., JABBOUR, R. 2017. Ecology and management of the alfalfa weevil (Coleoptera: Curculionidae) in Western United States alfalfa. In: *Journal of Integrated Pest Management*, vol. 8, nr. 1, pp. 1-7. e-ISSN 2155-7470. Disponibil: <https://academic.oup.com/jipm/article/8/1/5/3064074>
349. PERJU, T. 1995. *Entomologie agricolă, componentă a protecției integrate a agroecosistemelor*. București: Editura Ceres, 309 p. ISBN 973-40-0312-7.

350. PETRUKHA, O.I. 1969. Kluben'kovye dolgonosiki roda *Sitona* Germ. fauny SSSR, vredeyashchie bobovym kul'turam. Leningrad: Nauka, 255 s. [in l. rusă].
351. PHILIPS, C.R., ROGERS, M.A., KUHAR, T.P. 2014. Understanding farmscapes and their potential for improving IPM programs. In: *Journal of Integrated Pest Management*, vol. 5, nr. 1, pp. 1-9. e ISSN 2155-7470. Disponibil: <https://academic.oup.com/jipm/article/5/3/C1/2194144>
352. PHILLIPS, A. J., ANDERSON, V. L., ROBERTSON, E. J., SECOMBES, C. J., van WEST, P. 2008. New insights into animal pathogenic oomycetes. In: *Trends Microbiol.*, vol. 16, pp. 13-19. e-ISSN 1878-4380, ISSN 0966-842X.
353. PIATKOWSKI, J., KRZYZEWSKA, A. 2007. Influence of some physical factors on the growth and sporulation of entomopathogenic fungi. In: *Acta Mycologica*, vol. 42, nr. 2 pp. 255-265, 2007. e-ISSN 2353-074X, ISSN 0001-625X (anulat din 2015).
354. PIMENTEL, D. 2002. Introduction: non-native species in the world. In: PIMENTEL, D. ed. *Biological invasions economic and environmental costs of alien plant, animal, and microbe species*. New York: CRC Press, pp. 3-8. ISBN 978-0849308369.
355. PIMENTEL, D. 2005. Environmental and economic costs of the application of pesticides primarily in the United States. In: *Environment, Development and Sustainability*, vol. 7, pp. 229-252. e-ISSN 1573-2975, ISSN 1387-585X.
356. POINAR, G.O. JR, GREWAL, P.S. 2012. History of entomopathogenic nematology. In: *Journal of Nematology*, vol. 44, nr. 2, pp. 153-161. e-ISSN 2640-396X, ISSN 0022-300X.
357. POIRAS, A.A. 2006. *Zhestokrylye nadsemeystva Curculionidae (Insecta, Coleoptera) Republicii Moldova ih raznoobrazie i znacenie*. Avtoreferat, dokt. dis. Kishinau. [in l. rusă].
358. POPRAWSKI, T.J., MARCHAL, M., ROBERT, P.H. 1985. Comparative susceptibility of *Otiorhynchus sulcatus* and *Sitona lineatus* (Coleoptera: Curculionidae) early stages to five entomopathogenic Hyphomycetes. In: *Environmental Entomology*, vol. 14, pp. 247-253. e-ISSN 1938-2936, ISSN 0046-225X.
359. POSADAS, J.B., ANGULO, L. M., MINI, J.I., LECUONA, R.E. 2012. Natural tolerance to UV-B and assessment of photoprotectants in conidia of six native isolates of *Beauveria bassiana* (Bals-Criv) Vuillemin. In: *World Applied Sciences Journal*, vol. 20, nr. 7, pp. 1024-1030. e-ISSN 1991-6426, ISSN 1818-4952.
360. POWELL, M.J., LETCHER, P.M. 2014. Chytridiomycota, Monoblepharidomycota, and Neocallimastigomycota. In: *The Mycota Systematics and Evolution*, VII part A: (2nd ed.), (eds D.J. MCLAUGHLIN & J.W. SPATAFORA), pp. 141-176. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. ISBN 978-3-642-55317-2. Disponibil: https://doi.org/10.1007/978-3-642-55318-9_6
361. PRESCOTT, H.W., REEHER, M.H. 1961. The pea leaf weevil, an introduced pest of legumes in the Pacific Northwest. In: *U.S. Department of Agriculture Technological Bulletin*, vol. 1233, 12 p.
362. PRIYATNO, T. P., IBRAHIM, Y. B. 2002. Free fatty acids on the integument of the striped flea beetle, *Phyllotreta striolata* F., and their effects on conidial germination of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus*. In: *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.*, vol. 25, pp. 115-120. ISSN 1511-3701. Disponibil: [http://www.pertanika.upm.edu.my/resources/files/Pertanika%20PAPERS/JTAS%20Vol.%2025%20\(2\)%20Sep.%202002/06%20JTAS%20Vol.25%20\(2\)%202002%20\(Pg%20115-120\).pdf](http://www.pertanika.upm.edu.my/resources/files/Pertanika%20PAPERS/JTAS%20Vol.%2025%20(2)%20Sep.%202002/06%20JTAS%20Vol.25%20(2)%202002%20(Pg%20115-120).pdf)
363. PROWAZEK, S. von. 1907. Chlamydozoa. 2. Gelbsucht der Seidenraupen. In: *Arch. Protistenk.* Vol. 10, pp. 358-364. ISSN 0003-9365.
364. PROWAZEK, S. von. 1912. Untersuchungen tiber die Gelbsucht der Seidenraupen. In:

- Zentrabl. Bakteriolog. Parasitenk. Infektionskr., 1 Orig. vol. 67, pp. 268-284. ISSN 0044-4057.
365. QUESADA-MORAGA, E., NAVAS CORTES, J. MARANHÃO, E., ORTIZ-URQUIZA, A., CANDIDO, S. 2007. Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils. In: *Mycological Research*, vol. 111, pp. 947-966. ISSN 0953-7562.
366. QUINN M.A., BEZDICEK D.F. 1996. Effect of cryIIIa protein production in nodules on pea-pea leaf weevil (Coleoptera: Curculionidae) interactions. In: *Journal of Economic Entomology*, vol., pp. 550-557. e-ISSN 1938-291X.
367. QUINN, M.A., BEZDICEK, D.F., SMART, L.E., MARTIN, J. 1999. An aggregation pheromone system for monitoring pea leaf weevil (Coleoptera: Curculionidae) in the Pacific Northwest. In: *Journal of the Kansas Entomological Society*, vol. 72, pp. 315-321. e-ISSN 1937-2353, ISSN 0022-8567.
368. RADCLIFFE, E.B., FLANDERS, K.L. 1998. Biological control of alfalfa weevil in North America. In: *Integrated Pest Management Reviews*, vol. 3, pp. 225-242. ISSN 1572-9745.
369. RANGEL, D.E.N., ANDERSON, A.J., ROBERTS, D.W. 2008. Evaluating physical and nutritional stress during mycelial growth as inducers of tolerance to heat and UV-B radiation in *Metarhizium anisopliae* conidia. In: *Mycological Research*, vol. 112, pp. 1362-1372. ISSN 0953-7562.
370. RANGEL, D.E.N., BRAGA, G.U.L., ANDERSON, A.J., ROBERTS, D.W. 2005. Variability in conidial thermotolerance of *Metarhizium anisopliae* isolates from different geographic regions. In: *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 88, pp. 116-125. e-ISSN 1096-0805, ISSN 0022-2011.
371. RATH, S., SAHU, M.C., DUBEY, D., DEBATA N.K., PADHY R.N. 2011. Which value should be used as the lethal concentration 50 (LC₅₀) with bacteria? In: *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences*, vol. 3, pp. 138-143. e-ISSN 1867-1462, ISSN 1913-2751.
372. RÉAUMUR R.A.F., 1742 Mémoires pour Servir à L'histoire des Insectes 6. L'imprimerie Royale, Paris.
373. REDDY, G.V.P., SHRESTHA, G., MILLER, D.A., OEHLISCHLAGER, A.C. 2018. Pheromone-trap monitoring system for pea leaf weevil, *Sitona lineatus*: effects of trap type, lure type and trap placement within fields. In: *Insects*, vol. 9, article nr. 75, 11 p. Disponibil: <https://doi.org/10.3390/insects9030075>
374. Registrul de Stat al Produselor de Uz Fitosanitar și Fertilizanților [citât 08.07.2020]. Disponibil: <http://www.pesticide.md/indice-de-produse/>
375. Regulamentul (CE) Nr. 1107/2009 al Parlamentului European și al Consiliului din 21 octombrie 2009 privind introducerea pe piață a produselor fitosanitare și de abrogare a Directivelor 79/117/CEE și 91/414/CEE ale Consiliului [citât 19.11.2020]. Disponibil: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/RO/TXT/PDF/?uri=CELEX:02009R1107-20140630&qid=1500813608053&from=RO>
376. REHNER, S. A. 2009. Molecular systematics of entomopathogenic fungi. In S. P. STOCK, J. VANDENBERG, I. GLAZER, N. BOEMARE (Eds.), *Insect Pathogens: Molecular Approaches and Techniques* (pp. 145-165). Wallingford: CABI. ISBN 978-1845934781.
377. REHNER, S.A., BUCKLEY, E. 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-alpha sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. In: *Mycologia*, vol. 97, nr. 1, pp. 84-98. e-ISSN 1557-2536, ISSN 0027-5514.
378. REHNER, S.A., MINNIS, A.M., SUNG, G.H., LUANGSA-ARD, J.J., DEVOTTO, L., HUMBER, R.A. 2011. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic

- genus *Beauveria*. In: *Mycologia*, vol. 103, nr. 5, pp. 1055-1073. e-ISSN 1557-2536, ISSN 0027-5514.
379. REKALO, E.P. 1888. O vrednykh nasekomykh Bessarabii v 1887 g. In: *Iz otchetov Bessarabskoy gubernskoy Zemskoy Upravy*. Kishinev, 42 s. [în l. rusă].
380. RIEDEL, W., STEENBERG, T. 1998. Adult polyphagous coleopterans overwintering in cereal boundaries: winter mortality and susceptibility to the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. In: *BioControl*, vol. 43, pp. 175-188. e-ISSN 1573-8248, ISSN 1386-6141.
381. ROBENE-SOUSTRADE, I., JOUEN, E., PASTOU, D., PAYET HOAREAU, M., GOBLE, T., LINDERME, D., LEFEUVRE, P., CALMÈS, C., REYNAUD, B., NIBOUCHE, S., COSTET, L. 2015. Description and phylogenetic placement of *Beauveria hoplocheli* sp. nov. used in the biological control of the sugarcane white grub, *Hoplochelus marginalis*, in Reunion Island. In: *Mycologia*, vol. 107, pp. 1221-1232. e-ISSN 1557-2536, ISSN 0027-5514.
382. ROBERTS, D. W., & HUMBER, R. A. 1981. Entomogenous fungi. In G. T. Cole & B. Kendrick (Eds.), *Biology of Conidial Fungi*, Vol. 2 (pp. 201-236). New York: Academic Press.
383. ROBERTS, S. J., DEWITT, J. R., ARMBRUST, E. J. 1970. Predicting spring hatch of the alfalfa weevil. In: *Journal of Economic Entomology*, vol. 63, pp. 921-923. e-ISSN 1938-291X, ISSN 0022-0493.
384. RODRIGUEZ, M., GERDING, M., FRANCE, A. 2009. Selection of entomopathogenic fungi to control *Varroa destructor* (Acari: Varroidae). In: *Chilean Journal of Agricultural Research*, vol. 69, nr. 4, pp. 534-540. e-ISSN 0718-5839. Disponibil: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392009000400008>.
385. ROHRLICH, C., MERLE, I., MZE HASSANI, I., VERGER, M., ZUIN, M., BESSE, S., ROBENE, I., NIBOUCHE, S., COSTET, L. 2018. Variation in physiological host range in three strains of two species of the entomopathogenic fungus *Beauveria*. In: *PLoS One*, vol. 13, nr. 7, article nr. e0199199. e-ISSN 1932-6203. Disponibil: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0199199>
386. ROLFF, J., REYNOLDS, S. E. (Eds.). 2009. *Insect Infection and Immunity: Evolution, Ecology and Mechanisms*. Oxford: Oxford University Press. 256 p. ISBN 978-0199551354.
387. ROPEK, D., JAWORSKA, M. 1994. Effect of an entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae* Weiser (Nematoda, Steinernematidae), on carabid beetles in field trials with annual legumes. In: *Journal of Pest Science*, vol. 64, pp. 97-100. e-ISSN 1612-4766, ISSN 1612-4758.
388. ROTREKL, J., CEJTCHAML, J. 2008. Control by seed dressing of leaf weevils of the genus *Sitona* (Col.: Curculionidae) feeding on sprouting alfalfa. In: *Plant Protection Science*, vol. 44, pp. 61-67. e-ISSN 1805-9341, ISSN 1212-2580.
389. ROY, H. E., STEINKRAUS, D., EILENBERG, J., HAJEK, A. E., PELL, J. K. 2006. Bizarre interactions and endgames: entomopathogenic fungi and their arthropod hosts. In: *Annu. Rev. Entomol.*, vol. 51, pp. 331-357. e-ISSN 1545-4487, ISSN 0066-4170.
390. RUBTZOVA, I. A. 1948. Biologhiceskij metod boriby s vrednymi nasekomymi. M.-L.: SHGIZ, 412 s. [în l. rusă].
391. RUEDA, M.E., TAVARES, I., LOPEZ, C.C., GARCIA, J. 2019. *Leptolegnia chapmanii* como alternativa biológica para el control de *Aedes aegypti*. In: *Biomedica*. vol. 39(4), pp. 798-810. e-ISSN 2590-7379, ISSN 0120-4157. Disponibil: <https://doi.org/10.7705/biomedica.4598>
392. SAMSON, R.A. 1974. *Paecilomyces* and some allied Hyphomycetes. In: *Studies in Mycology*, vol. 6, p. 38. ISSN 0166-0616.

393. SANJUAN, T., TABIMA, J., RESTREPO, S., LAESOE, T., SPATAFORA, J.W., FRANCO-MOLANO, A.E. 2014. Entomopathogens of Amazonian stick insects and locusts are members of the *Beauveria* species complex (*Cordyceps* sensu stricto). In: *Mycologia*, vol. 106, pp. 260–275. e-ISSN 1557-2536, ISSN 0027-5514.
394. SARANRAJ, P., JAYAPRAKASH, A. 2017. Agrobeneficial entomopathogenic fungi – *Beauveria bassiana*: a review. In: *Indo – Asian Journal of Multidisciplinary Research (IAJMR)*, vol. 3, nr. 2, pp. 1051-1087. ISSN 2454-1370.
395. SCHEEPMAKER, J. W. A., BUTT, T. M. 2010. Natural and released inoculum levels of entomopathogenic fungal biocontrol agents in soil in relation to risk assessment and in accordance with EU regulations. In: *Biocontrol Sci. Technol.*, vol. 20, pp. 503-552. e-ISSN 1360-0478, ISSN 0958-3157. Disponibil: <https://doi.org/10.1080/09583150903545035>
396. SCHITEA, M. 2010. Rezultate în ameliorarea lucernei la I.N.C.D.A. Fundulea în perioada 2000-2009. In: *An. I.N.C.D.A. Fundulea*, vol. LXXVIII, (2).
397. SCHNEIDER, S., REHNER, S. A., WIDMER, F., ENKERLI, J. 2011. A PCR-based tool for cultivation-independent detection and quantification of *Metarhizium* clade 1. In: *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 108, pp. 106-114. e-ISSN 1938-2936, ISSN 0046-225X.
398. SCHOTZKO, D.J., O'KEEFFE, L.E. 1986 a. Reproductive system maturation and changes in flight muscles of female pea leaf weevils (Coleoptera: Curculionidae). In: *Annals of the Entomological Society of America*, vol. 79, pp. 109-111. e-ISSN 1938-2901, ISSN 0013-8746.
399. SCHOTZKO, D.J., O'KEEFFE, L.E. 1986 b. Ovipositional rhythms and egg melanization rate of *Sitona lineatus* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). In: *Environmental Entomology*, vol. 15, pp. 601-606. e-ISSN 1938-2936, ISSN 0046-225X.
400. SCHOTZKO, D.J., O'KEEFFE, L.E. 1988. Effects of food type, duration of hibernation quiescence, and weevil density on longevity of *Sitona lineatus* (Coleoptera: Curculionidae). In: *Journal of Economic Entomology*, vol. 81, pp. 1631-1636. e-ISSN 1938-291X.
401. SEAMAN, D. 1990. Trends in the formulation of pesticides: An overview. In: *Pest Management Science*, vol. 29, nr. 4, p. 437-449. e-ISSN 1526-4998.
402. SEIDENGLANZ, M., ROTREKL, J., SMYKALOVA, I., POSLUSNA, J., KOLARIK, P. 2010. Differences between the effects of insecticidal seed and foliar treatments on pea leaf weevils (*Sitona lineatus* L.) in the field pea (*Pisum sativum* L.). In: *Plant Protection Science*, vol. 46, nr. 1, pp. 19-27. e-ISSN 1805-9341, ISSN 1212-2580. Disponibil: https://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/34_2009-PPS.pdf.
403. SHADE, R.E., HINTZ, T.R. 1983. Factors influencing alfalfa weevil (Coleoptera: Curculionidae) egg hatch and larval establishment. In: *Environmental Entomology*, vol. 12, pp. 1129-1132. e-ISSN 1938-2936, ISSN 0046-225X.
404. SHAH, N.K., AZMI, M.I., TYAGI, P.K. 2011. Pathogenicity of Rhabditid nematodes (Nematoda: Heterorhabditidae and Steinernematidae) to the grubs of alfalfa weevil, *Hypera postica* (Coleoptera: Curculionidae). In: *Range Management and Agroforestry*, vol. 32, pp. 64-67. ISSN 0971-2070.
405. SHARMA, A., KUMAR, S., BHATNAGAR, R.K. 2011. *Bacillus thuringiensis* Protein Cry6B (BGSC ID 4D8) is toxic to larvae of *Hypera postica*. In: *Current Microbiology*, vol. 62, pp. 597-605. e-ISSN 1432-0991, ISSN 0343-8651.
406. SHARMA, S., AGARWAL, G.P., RAJAK, R.C. 1992. Effect of temperature, pH and light on toxin production by *Beauveria bassiana* (Bal) Vuill. *Indian Journal of Experimental Biology*, vol. 30, pp. 918-919. e-ISSN 0975-1009, ISSN 0019-5189.
407. SHIMIZU, S., MITANI, T. 2000. Effects of temperature on viability of conidia from *Beauveria bassiana* in oil formulations. In: *Journal of Applied Entomology and Zoology*, vol. 44, nr. 1, pp. 51-53. e-ISSN 1347-605X, ISSN 0003-6862.

408. SHIN, S., CLARKE, D.J., LEMMON, A.R., MORIARTY LEMMON, E., AITKEN, A.I., HADDAD, S., FARRELL, B.D., MARVALDI, A.E., OBERPRIELER, R.G., MCKENNA, D.D. 2018. Phylogenomic data yield new and robust insights into the phylogeny and evolution of weevils. In: *Molecular Biology and Evolution*, vol. 35, nr. 4, pp. 823-836. e-ISSN 1537-1719, ISSN 0737-4038.
409. SHTERNISHIS, M.V., ISSI, I.V. VORONINA, A.G., GLUPOV, V.V. 2001. Istoriceskaja spravka. In: *Patogeny nasekomyh: strukturnye i funkcional'nye aspekty : [Monografiya]*; Pod red. V.V. GLUPOVA. - M.: Kruglyj stol, 2001. 725 s.: il., tabl.; 23 sm.; ISBN 5-88671-047-7. [in l. rusă]
410. SIMMONDS, F.J., FRANZ, J. M., SAILER, R. I. 1976. History of biological control. In: HUFFAKER, C. B., MESSENGER, P. S., eds. *Theory and Practice of Biological Control*. New York: Academic Press, 788 pp. ISBN 978-0-12-360350-0.
411. SINGH, D., RAINAB, T. K., SINGHA, J. 2017. Entomopathogenic Fungi: An Effective Biocontrol Agent for Management of Insect Populations Naturally In: *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, vol. 9, nr. 6, pp. 830-839, ISSN 0975-1459.
412. SKINNER, M., PARKER, B.L., KIM, J.S. 2014. Chapter 10 - Role of entomopathogenic fungi in Integrated Pest Management. In: ABROL, D.P., ed. *Integrated Pest Management*. Academic Press, pp. 169-191, ISBN 978-0-12-398529-3. Disponibil: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398529-3.00011-7>
413. SKOT, L., TIMMS, E. E., MYTTON, L.R. 1994. The effect of toxin-producing *Rhizobium* strains on larvae of *Sitona flavescens* feeding on legume roots and nodules. In: *Plant and Soil*, vol. 63, pp. 141-150. e-ISSN 1573-5036, ISSN 0032-079X.
414. SKUHROVEC, J. 2006. Identification of instars of *Hypera postica* using chaetotaxy. In: *Journal of Economic Entomology*, vol. 99, nr. 6, pp. 2216-2218. e-ISSN 1938-291X.
415. SMITH, K. M., WYCKOFF, R. W. G. 1950. Structure within polyhedra associated with insect virus diseases. In: *Nature*, vol. 166, pp. 861-862. e-ISSN 1476-4687, ISSN 0028-0836.
416. SMITH, P. 1993. Control of *Bemisia tabaci* and the potential of *Paecilomyces fumosoroseus* as a biopesticide. In: *Biocontrol News and Information*, vol. 14, pp. 71-78.
417. SOSA-GOMEZ, D. R., BOUCIAS, D. G., NATION, J. L. 1997. Attachment of *Metarhizium anisopliae* to the southern green stink bug *Nezara viridula* cuticle and fungistatic effect of cuticular lipids and aldehydes. In: *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 69, pp. 31-39. e-ISSN 1096-0805, ISSN 0022-2011.
418. SPAINK, H.P. 1994. The molecular basis of the host specificity of the *Rhizobium* bacteria. In: *Antoine van Leeuwenhoek*, vol. 65, pp. 81-98. e-ISSN 1572-9699, ISSN 0003-6072.
419. SPATAFORA, J. W., SUNG, G.-H., SUNG, J.-M., HYWEL-JONES, N., WHITE, J. F., JR. 2007. Phylogenetic evidence for an animal pathogen origin of ergot and the grass endophytes. In: *Mol. Ecol.*, vol. 16, pp. 1701-1711. e-ISSN 1365-294X, ISSN 0962-1083. Disponibil: <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03225.x>
420. SPATAFORA, J.W., CHANG, Y., BENNY, G.L., LAZARUS, K., SMITH, M.E., BERBEE, M.L., BONITO, G., CORRADI, N., GRIGORIEV, I., GRYGANSKYI, A., JAMES, T.Y. O'DONNELL, K., ROBERSON, R.W., TAYLOR, T.N., UEHLING, J., VILGALYS, R., WHITE, M.M. & STAJICH, J.E. 2016. A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. In: *Mycologia*, vol. 108, pp. 1028-1046. e-ISSN 1557-2536, ISSN 0027-5514. Disponibil: <https://doi.org/10.3852/16-042>
421. St. LEGER, R. J., WANG, C. 2009. Entomopathogenic fungi and the genomics era. In S. P. Stock, J. Vandenberg, I. Glazer & N. Boemare (Eds.), *Insect Pathogens: Molecular Approaches and Techniques* (pp. 365-400). Wallingford: CABI. ISBN 978-1845934781.
422. ST. LEGER, R.J. 1991. Integument as a barrier to microbial infections. In: BINNING-

- TON, K.; RETNAKARAN, A. (Eds.). *Physiology of the Insect Epidermis*. Australia: CSIRO, p. 284-306. ISBN 0643052291.
423. ST. LEGER, R.J., JOSHI, L., ROBERTS, D. 1998. Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. In: *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 64, pp. 709-713. e-ISSN 1098-5336, ISSN 0099-2240.
424. STARODUB, V. 2008. *Tehnologii în fitotehnie*. Chişinău: Centrul Ed. UASM, 399 p. ISBN 978-9975-64-121-0.
425. STEENBERG, T., RAVN, H.P. 1996. Effect of *Beauveria bassiana* against overwintering pea leaf weevil, *Sitona lineatus*. In: *IOBC WPRS Bulletin*, vol. 19, nr. 9. pp. 183-185. ISSN 1027-3115.
426. STEENE van de, F., VULSTEKE, G., de PROFT, M., CALLEWAERT, D. 1999. Seed coating to control the pea leaf weevil, *Sitona lineatus* (L.) in pea crops. In: *Journal of Plant Diseases and Protection*, vol. 106, pp. 633-637. ISSN 1861-3829.
427. STEINER, G. 1923. *Aplectana krausseii* n.sp., eine in der Blattwespe *Lyda* sp. parasitierende Nematodenform, nebst Bemerkungen über das Seitenorgan der parasitischen Nematoden. 59. In: *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene*, vol. 59, 14-18. ISSN 0323-6056.
428. STEINHAUS E. A. 1956. Microbial control-the emergence of an idea. A brief history of insect pathology through the nineteenth century. In: *Hilgardia*, vol. 26(2), pp. 107-160. Disponibil: <http://doi.org/10.3733/hilg.v26n02p107>
429. STEINHAUS, E. A. 1949. Principles of Insect Pathology New York: McGraw-Hill. [în rusă] prevod s englijskogo V. V. Hvosstovoj i I. V. Coglinoj pod redakciej i so vstupil'noj stat'ej akad. E. N. Pavlovskogo. 1952. 840 p.
430. STEINHAUS, E. A. 1963. Introduction. In E. A. Steinhaus (Ed.), *Insect Pathology: Vol. 1. An Advanced Treatise* (pp. 1-27). New York: Academic Press.
431. STEINHAUS, E. A. 1975. *Disease in a Minor Chord*. Columbus: Ohio State University Press. 508 p.
432. STERN, V.M., SMITH, R.F., VAN DEN BOSCH, R., HAGEN, K.S. 1959. The integration of chemical and biological control of the spotted alfalfa aphid: The integrated control concept. In: *Hilgardia*, vol. 29, pp. 81-101. Disponibil: <https://hilgardia.ucanr.edu/Abstract/?a=hilg.v29n02p081> <https://hilgardia.ucanr.edu/Abstract/?a=hilg.v29n02p081>
433. SUNG, G.-H., HYWEL-JONES, N. L., SUNG, J.-M., LUANGSA-ARD, J. J., SRESTHA, B., SPATAFORA, J. W. 2007. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. In: *Stud. Mycol.*, vol. 57, pp. 5-59. e-ISSN 1872-9797, ISSN 0166-0616.
434. SWEETMAN, H.L. 1936. *The biological control of insects : with a chapter on weed control*. Ithaca, N. Y. : Comstock Pub. Co., 461 p.
435. TADROS, F. 2005. *Applied surfactants, principles and applications*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA, pp. 187-256. e-ISBN 9783527604814, ISBN 9783527306299.
436. TALWAR, N. 2015. Trophic relationship, annual cycle, seasonal diapause and pest potentiality of alfalfa weevil, *Hypera postica* (Gyll.) (Hyperinae: Curculionidae: Coleoptera). In: *ÇOMÜ Zir. Fak. Derg. (COMU J. Agric. Fac.)*, vol. 3, nr. 1, pp. 9-13. Disponibil: <http://dergi.comu.edu.tr/dosyalar/Ziraat/cilt-3-sayi-1.pdf#page=16>
437. TANABE, Y., WATANABE, M. M., SUGIYAMA, J. 2002. Are Microsporidia really related to Fungi? A reappraisal based on additional gene sequences from basal fungi. In: *Mycol. Res.*, vol. 106, pp. 1380-1391. e-ISSN 1469-8102, ISSN 0953-7562.
438. TANADA, Y., KAYA, H.K. 1993. *Insect Pathology*. San Diego: Academic Press, 1993, 666 p. e-ISBN 978-0080926254.
439. TAYLOR, J. W. 1995. Making the Deuteromycota redundant: a practical integration of

- mitosporic and meiosporic fungi. In: *Can. J. Bot.*, vol. 73, pp. 754-759. Disponibil: <https://doi.org/10.1139/b95-319>
440. TEDERSOO, L., SANCHEZ-RAMIREZ, S., KOLJALG, U., BAHRAM, M., DORING, M., SCHIGEL, D., MAY, T., RYBERG M., ABARENKOV, K. 2018. High-level classification of the Fungi and a tool for evolutionary ecological analyses. In: *Fungal Diversity*, vol. 90, pp. 135-159. e-ISSN 1878-9129, ISSN 1560-2745. Disponibil: <https://doi.org/10.1007/s13225-018-0401-0>
441. TEFERA, T., VIDAL, S. 2009. Effect of inoculation method and plant growth medium on endophytic colonization of sorghum by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. In: *Biocontrol*, vol. 54, pp. 663-669. e-ISSN 1573-8248, ISSN 1386-6141.
442. TELLEZ-JURADO, A., CRUZ, R.M.G., FLORES, M.Y., ASAFF, T.A., ARANA CUENCA, A. 2009. Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. In: *Revista Mexicana de Micología*, v.30, p.73-80. ISSN 0187-3180.
443. TESFAYE, M., SAMAC, D.A., LAMB, J.F.S. 2009. Alfalfa. In: CHITTARANJAN, K., TIMOTRY, C.H., eds. *Compendium of transgenic crop*. New York: Wiley, pp. 199-210, 2776 p. ISBN 978-1-405-16924-0.
444. TEVINI, M. 1993. Molecular biological effects of ultraviolet radiation. In: TEVINI, M., ed. *UV-B radiation and ozone depletion: effects on humans, animals, plants, microorganisms, and materials*. Boca Raton: Lewis Publishers, pp. 1-15, 256 p. ISBN 978-0873719117.
445. TOHIDFAR, M., NASER, Z., GHOLAMREZA, S.J., SEIDE, M.E. 2013. *Agrobacterium*-mediated transformation of alfalfa (*Medicago sativa*) using a synthetic cry3a gene to enhance resistance against alfalfa weevil. In: *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol.113, pp. 227-235. e-ISSN 1573-5044, ISSN 0167-6857.
446. TONG, S., FENG, M. 2020. Phenotypic and molecular insights into heat tolerance of formulated cells as active ingredients of fungal insecticides. In: *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 104, pp. 5711-5724. e-ISSN 1432-0614, ISSN 0175-7598.
447. TUCKER, D.L., BERESFORD, C.H., SIGLER, L., ROGERS, K. 2004. Disseminated *Beauveria bassiana* infection in a patient with acute lymphoblastic leukemia. In: *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 42, nr. 11, pp. 5412-5414. e-ISSN 1098-660X, ISSN 0095-1137.
448. TURAEV, N.S. 1957. Gorokhovyie sloniki (*S. lineatus* i *S. crinitus* Hbst.). In: *Trudy Sverdlovskogo SKhI*. Sverdlovsk, t. 1, s. 125-250. [in l. rusă].
449. TYSOWSKY, M., DORSEY, C.K. 1970. Hibernation and estivation habits of the alfalfa weevil in West Virginia. In: *Journal of Economic Entomology*, vol. 63, pp. 347-350. e-ISSN 1938-291X, ISSN 0022-0493.
450. URBAN, J. 2015. Occurrence, biology and harmfulness of *Byctiscus betulae* (L.) (Coleoptera, Rhynchitidae). In: *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, vol. 63, nr. 5, pp. 1601-1624. ISSN 1211-8516.
451. USANMAZ-BOZHUYUK, A., KORDALI, S., KESDEK, M., SIMSEK, D., ALTINOK, M.A., ALTINOK, H.H., KOMAKI, A. 2018. Mortality effects of six different entomopathogenic fungi strains on rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). In: *Fresenius Environmental Bulletin*, vol. 27, pp. 4373-4380. ISSN 1018-4619.
452. van VEEN, F. J. F., MUELLER, C. B., PELL, J. K., GODFRAY, H. C. J. 2008. Food web structure of three guilds of natural enemies: predators, parasitoids and pathogens of aphids. In: *J. Anim. Ecol.*, vol. 77, pp. 191-200.
453. VANKOSKY, M., CARCAMO, H.A., DOSDALL, L.M. 2011. Identification of potential natural enemies of the pea leaf weevil, *Sitona lineatus* L. in western Canada. In: *Journal of Applied Entomology*, vol. 135, pp. 293-301. e-ISSN 1439-0418 Disponibil: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1439-0418.2010.01542.x>
454. VANKOSKY, M.A., CARCAMO, H.A., DOSDALL, L.M. 2009. Distribution, biology and

- integrated management of the pea leaf weevil, *Sitona lineatus* L. (Coleoptera: Curculionidae), with an analysis of research needs. In: *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, vol. 4, nr. 7, pp. 1-18. ISSN 1749-8848.
455. VEGA, F. E., MEYLING, N.V., LUANGSA-ARD J.A., BLACKWELL, M. 2012. Chapter 6. Fungal Entomopathogens. In: VEGA, F., KAYA, H.K., eds. *Insect Pathology. 2nd Edition*. San Diego, CA: Academic Press, p. 13-28. eBook ISBN 978-0-12384-9-854, ISBN 978-0-12384-9-847.
456. VEGA, F.E., GOETTEL, M.S., BLACKWELL, M., CHANDLER, D., JACKSON, M.A., KELLER, S. *et al.* 2009. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology, In: *Fungal Ecology*, vol. 2, nr. 4, pp. 149-159. ISSN 1754-5048.
457. VEGA, F.E., MEYLING, N.V., LUANGSA-ARD, J.J., BLACKWELL, M. 2012. Fungal Entomopathogens. In: VEGA, F., KAYA, H.K., eds. *Insect Pathology. 2nd Edition*. San Diego, CA: Academic Press, p. 171-220. eBook ISBN 978-0-12384-9-854, ISBN 978-0-12384-9-847.
458. VELAZQUEZ DE CASTRO, A.J., ALONSO-ZARAZAGA, M.A., OUTERELO, R. 2007. Systematics of Sitonini (Coleoptera: Curculionidae: Entiminae), with a hypothesis on the evolution of feeding habits. In: *Systematic Entomology*, vol. 32, pp. 312-331. e-ISSN:1365-3113.
459. VERESHCHAGIN, B.V. 1968. O nekotorykh kompleksakh, sistematicheskikh gruppakh i diagnostike dendrofil'nykh nasekomykh Moldavii. In: *Vrednaya i poleznaya fauna bespozv. Moldavii. Vyp.3*. Kishinev: Shtiintsa, pp. 3-28. [în rusă].
460. VERKLEIJ, F.N., van AMELSVOORT, P.A.M., SMITS, P.H. 1992. Control of the pea weevil (*Sitona lineatus* L.) (Col., *Curculionidae*) by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* in field beans. In: *Journal of Applied Entomology*, vol. 113, pp. 183-193. e-ISSN 1439-0418.
461. VIDAL, S., JABER, L.R. 2015. Entomopathogenic fungi as endophytes: plant-endophyte-herbivore interactions and prospects for use in biological control. In: *Current Science*, vol. 109, pp. 46-54. ISSN 0011-3891.
462. VITKOVSKIY, N. 1913. Kratkiy obzor glavneyshikh vreditel'ey i bolezney kul'turnykh i dikorastushchikh rasteniy, nablyudavshikhsya v 1912 g. v Bessarabskoy gubernii. In: *Trudy Bessarab. ob-va estestvoispytat. i lyubit. estestvoznaniya. T.4*, c. 263-277. [în rusă].
463. VOLOȘCIUC, L. 2015. Realizări în protecția microbiologică a plantelor. In: *Revista de Știință, Inovare, Cultură și Artă „Akademos”*, nr. 3(38), pp. 57-64. ISSN 1857-0461.
464. VOLOȘCIUC, L., JOSU, V. 2017. Soluționarea problemelor fitosanitare în agricultura durabilă a Republicii Moldova. In: *Agricultura durabilă în Republica Moldova: provocări actuale și perspective*. Culegere de articole științifice Filiala Bălți a Acad. de Științe a Moldovei. Bălți : Indigou Color. pp. 266-270. ISBN 978-9975-3156-2-3.
465. VOLOȘCIUC, L.T., JOSU, V. 2016. Conceptul de agricultură ecologică – suport al agriculturii durabile în Republica Moldova. In: *Noosfera*. Nr. 17. pp. 89-98. ISSN 1857-3517.
466. WAGNER, B.L., LEWIS, L.C. 2000. Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. In: *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 66, nr. 8, pp. 3468-3473. e-ISSN 1098-5336, ISSN 0099-2240.
467. WANG, C.; ST. LEGER, R.J. 2007. The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesion enables attachment to plants. In: *Cell eukaryotic*, vol. 6, pp. 808-816. e-ISSN 1535-9786, ISSN 1535-9778.
468. WANG, D. Y.-C., KUMAR, S., BLAIR HEDGES, S. 1999. Divergence time estimates for the early history of animal phyla and the origin of plants, animals and fungi. In: *Proc. R. Soc. Lond. B*, vol. 266, pp. 163-171. e-ISSN 1471-2954.

469. WANG, J.B., ST. LEGER, R.J., WANG, C. 2016. Advances in genomics of entomopathogenic fungi. In: *Advances in Genetics*, vol. 94, pp. 67-105. ISSN 0065-2660.
470. WANNER, K.W. 2016. Pea Leaf Weevil. Bozeman, MT, USA: MontGuide; Montana State University, pp. 1-2. Disponibil: <https://agresearch.montana.edu/wtarc/producerinfo/entomology-insect-ecology/PeaLeafWeevil/MontGuide.pdf>
471. WATANABE, T. 2010. *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi. Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species* (3rd ed.). Boca Raton: CRC Press. 426 p. ISBN 978-1439804193
472. WATSON, D.W., GEDEN, C.J., LONG, S.J., RUTZ, D.A. 1995. Efficacy of *Beauveria bassiana* for controlling the house fly and stable fly (Diptera: Muscidae). In: *Biological Control*, vol. 5, pp. 405-411. ISSN 1049-9644.
473. WEAVER, J.E., BALASKO, J.A., TOWNSEND, E.C. 1993. Effects of alfalfa weevil (Coleoptera: Curculionidae) larval population densities on yield and quality of alfalfa. In: *Journal of Agricultural Entomology*, vol. 10, nr. 1, pp. 35-43. ISSN 0735-939X. Disponibil: <http://scentoc.org/Volumes/JAE/v10/1/00101035.pdf>
474. WEISER, J. 2005. Microsporidia and the Society for Invertebrate Pathology: a personal point of view. In: *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 89, pp. 12-18. e-ISSN 1096-0805, ISSN 0022-2011.
475. WEISER, J., BRIGGS, J. D. 1971. Identification of pathogens. In H. BURGESS, N. W. HUSSEY (Eds.), *Microbial Control of Insects and Mites* (pp. 13-66). New York, NY: Academic Press.
476. WENZEL RODRIGUES, I.M., FORIM, M.R., SILVA, M.F., FERNANDES, J.B., BATISTA FILHO, A.B. 2016. Effect of ultraviolet radiation on fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, pure and encapsulated, and bio-insecticide action on *Diatraea saccharalis*. In: *Advances in Entomology*, vol. 4, pp. 151-162. e-ISSN 2331-2017, Print 2331-1991 Disponibil: <https://www.scirp.org/journal/paperinformation.aspx?paperid=68528>
477. WERF van der, H.M. 1996. Assessing the impact of pesticides on the environment. In: *Agriculture, Ecosystems and Environment*, vol. 60, pp. 81-96. ISSN 0167-8809.
478. WERNER, M., SAAR, K., DIETRICH, S. 2015. Establishing of the entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* as an endophyte in *Triticum aestivum* and molecular detection of strain JKI-BI-1496. In: *JKI (Hrsg.): Achetes Nachwuchswissenschaftlerforum. 19-21 Oktober 2015, in Quedlinburg. Abstracts (Berichte aus dem Julius-Kühn-Institut 181), Quedlinburg, Ribbesbüttel, 17.*
479. WHITE, C.E., ARMBRUST, E.J., DEWITT, J.R., ROBERTS, S.J. 1969. Evidence of a second generation of the alfalfa weevil in southern Illinois. In: *Journal of Economic Entomology*, vol. 62, pp. 509-510. e-ISSN 1938-291X, ISSN 0022-0493.
480. WHITE, M. M., JAMES, T. Y., O'DONNELL, K., CAFARO, M. J., TANABE, Y., SUGIYAMA, J. 2006a. Phylogeny of the Zygomycota based on nuclear ribosomal sequence data. In: *Mycologia*, vol. 98, pp. 872-884. e-ISSN 1557-2536, ISSN 0027-5514.
481. WHITE, T.J., BRUNS, T., LEE, S., TAYLOR, J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A., GELGARD, D.H., SNINSKY, J.J., WHITE, T.J., eds.. *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. California, USA: Academic Press Inc., 482 p. ISBN 0-12-372181-4.
482. WHITFORD, F., QUISENBERRY, S. S. 1990. Population dynamics and seasonal biology of the alfalfa weevil (Coleoptera: Curculionidae) on alfalfa in Louisiana. In: *Environmental Entomology*, vol. 19, pp. 1443-1451. e-ISSN 1938-2936, ISSN 0046-225X.
483. WIDMER, F., SHAFFER, B. T., PORTEOUS, L. A., SEIDLER, R. J. 1999. Analysis of nifH gene pool complexity in soil and litter at a Douglas fir forest site in the Oregon cascade mountain range. In: *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 65, pp. 374-380. e-ISSN 1098-5336, ISSN 0099-2240.

484. WIECH, K., JAWORSKA, M. 1990. Susceptibility of *Sitona* weevils (Col., Curculionidae) to entomogenous nematodes. In: *Journal of Applied Entomology*, vol. 110, pp. 214-216. e-ISSN 1439-0418. Disponibil: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1439-0418.1990.tb00115.x>
485. WILLIAMS, L., SCHOTZKO, D.J., O'KEEFFE, L.E. 1995. Pea leaf weevil herbivory on pea seedlings: effects on growth response and yield. In: *Entomologia Experimentalis et Applicata*, vol. 76, pp. 255-269. e-ISSN 1570-7458.
486. WILLIAMS, L., SCHOTZKO, D.J., O'KEEFFE, L.E. 1998. Herbivory, seed priming, and tillage systems: impacts on the growth response of *Pisum sativum* L. In: *Journal of Entomological Science*, vol. 33, pp. 196-211. ISSN 0749-8004.
487. WILSON, C., TISDELL, C. 2001. Why farmers continue to use pesticides despite environmental, health and sustainability costs. In: *Ecological Economics*, vol. 39, pp. 449-462. ISSN 0921-8009.
488. WILSON, K., COTTER, S. C., REESON, A. F., PELL, J. K. 2001. Melanism and disease resistance in insects. In: *Ecol. Lett.*, vol. 4, pp. 637-649. e-ISSN 1461-0248. Disponibil: <https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2001.00279.x>
489. WILSON, K., REESON, A. F. 1998. Density-dependent prophylaxis: evidence from Lepidopteraebaculovirus interactions? In: *Ecol. Entomol.*, vol. 23, pp. 100-101. e-ISSN 1365-2311 Disponibil: <https://www.lancaster.ac.uk/staff/wilsonk4/publications-files/ECOLENT1998ddp.pdf>
490. WINKELHOFF van, A. J., McCOY, C. W. 1984. Conidiation of *Hirsutella thompsonii* var. *synnematos*a in submerged culture. In: *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 43, pp. 59-68. e-ISSN 1096-0805, ISSN 0022-2011.
491. WOESE, C.R., OLSEN, G.J. 1986. Arhaebacterial phylogeny: perspectives on urkingdoms. In: *Systematic and Applied Microbiology*, vol. 7, pp. 161-167. ISSN 0723-2020.
492. WOJCIECHOWICZ-ZYTKO, E., MLYNARCZYK, M. 2002. The preference of different broad bean cultivars by *Sitona lineatus* L. (Coleoptera: Curculionidae). In: *Journal of Plant Protection Research*, vol. 42, pp. 81-89. e-ISSN 1899-007X, ISSN 1427-4345.
493. WOODSIDE, A. M., BISHOP, J. L., PIENKOWSKI, R. L. 1968. Winter oviposition by the alfalfa weevil in Virginia. In: *Journal of Economic Entomology*, vol. 61, pp. 1230-1232. e-ISSN 1938-291X, ISSN 0022-0493.
494. XAVIER, I.J., KHACHATOURIANS, G.G. 1996. Heat-shock response of the entomopathogenic fungus *Beauveria brongniartii*. In: *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 42, pp. 577-585, E-ISSN 1480-3275, ISSN 0008-4166.
495. YANAGAWA, A., YOKOHARI, F., SHIMIZU, S. 2008. Defense mechanism of the termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki, to entomopathogenic fungi. In: *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 97, pp. 165-170. e-ISSN 1096-0805, ISSN 0022-2011.
496. YEK, S.-H., MUELLER, U. G. 2011. The metapleural gland of ants. In: *Biol. Rev.*, vol. 91, pp. 201-224. e-ISSN 1469-185X.
497. YOUSEF, M., ALBA-RAMIREZ, C., GARRIDO JURADO, I., MATEU, J., RAYA DIAZ, S., VALVERDE-GARCIA, P. AND QUESADA-MORAGA, E. 2018. *Metarhizium brunneum* (Ascomycota, Hypocreales) treatments targeting olive fly in the soil for sustainable crop production. In: *Front. Plant Sci.* vol. 9, p. 1. e-ISSN 1664-462X. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00001>
498. YUCEL, B., GOZUACIK, C., GENCER, D., DEMIR, I., DEMIRBAG, Z. 2018. Determination of fungal pathogens of *Hypera postica* (Gyllenhal) (Coleoptera: Curculionidae): isolation, characterization, and susceptibility. In: *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, vol. 28, article nr. 39, 8p. Disponibil: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1186/s41938-018-0043-2.pdf>

499. YUN, H.G., KIM, D.J., GWAK, W.S., SHIN, T.Y., WOO, S.D. 2017. Entomopathogenic fungi as dual control agents against both the pest *Myzus persicae* and phytopathogen *Botrytis cinerea*. In: *Mycobiology*, vol. 45, nr. 3, pp. 192-198. e-ISSN 2092-9323, ISSN 1229-8093.
500. ZABRINSKIY, P.A. 1890. Ob ambarnom dolgonosike (*Sitophilus granarius* L.) i sposobakh bor'by s nim (v Bessarab. i dr. guberniy yuga Rossii). In: *Tr. 9-go obl. entomologicheskogo s"ezda, sozyvavshegosya v aprele 1888 g. v Odesse*, s. 117-127. [in l. rusă].
501. ZAHIRI, B., FATHIPOUR, Y., KHANJANI, M., ZALUCKI, M.P. 2014. Alternatives to key factor analyses for assessing the population dynamics of *Hypera postica* (Coleoptera: Curculionidae). In: *Population Ecology*, vol. 56, pp. 185-194. e-ISSN 1438-390X, ISSN 1438-3896.
502. ZANDER, E. 1909. Tierische Parasiten als Krankheitserreger bei der Biene. In: *Leipziger Bienenzeitung*, vol. 24, pp. 147-150, 164-166.
503. ZHANG, W., ZHANG, X., LI, K., WANG, C., CAI, L., ZHUANG, W., XIANG, M., & LIU, X. 2018. Introgression and gene family contraction drive the evolution of lifestyle and host shifts of hypocrealean fungi. In: *Mycology*, vol. 9(3), pp. 176-188. Disponibil: <https://doi.org/10.1080/21501203.2018.1478333>.
504. ZIMMERMANN, G. 2008a. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. In: *Biocontrol Science and Technology*, vol. 17, nr. 6, pp. 553-596. Disponibil: <https://doi.org/10.1080/09583150701309006>
505. ZIMMERMANN, G. 2008b. The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): biology, ecology and use in biological control. In: *Biocontrol Science and Technology*, vol. 18, nr. 9, pp. 865-901. Disponibil: <https://doi.org/10.1080/09583150802471812>
506. ZLATANOV, S. 1968. The bioecological factors governing the numerical distribution of some insect pests under the influence of shelter belts (abstract). In: *The Review of Applied Entomology Series A*, vol. 56, p. 911. ISSN 0305-0076.

ANEXA I

**Medii nutritive utilizate pentru izolarea și cultivarea
fungilor entomopatogeni
(Inglis, Enkerliy, Goettel, 2012)**

a. Medii selective pentru speciile din genurile *Beauveria*

Chase *et al.*, 1986

- ✓ 2% infuzie din ovăs
- ✓ 2% agar
- ✓ 550 mg/ml dodine (N-dodecylguanidine monoacetate)
- ✓ 5 mg/ml chlortetracycline
- ✓ 10 mg/ml crystal violet

Shimazu și Sato, 1996

- ✓ 0,3% bactopectone
- ✓ 1,5% agar
- ✓ 0,2 mg/ml CuCl₂
- ✓ 2 mg/ml crystal violet

Notă: pH 10.

Rangel *et al.*, 2010

- ✓ Soluție stock: 1.5% Dodine (2.3 g Cyprex/Syllitt 65 w la 97.7 ml H₂O, or 95-100% etanol
- ✓ PDA + 1g/l yeast extract
- ✓ Adăugăm 10 ml soluție stock la 990 ml mediu

mediu selectiv pentru *B. brongniartii* (Strasser *et al.*, 1996)

- ✓ 10% peptonă
- ✓ 20% glucoze
- ✓ 12% agar
- ✓ 600 mg/ml streptomycin
- ✓ 50 mg/ml tetracycline
- ✓ 100 mg/ml dodine (N-dodecylguanidine monoacetate)
- ✓ 50 mg/ml cycloheximide (actidione)

Notă: pH 6.3 ajustat folosind 1M HCl.

b. Medii selective pentru speciile din genurile *Metarhizium*

Veen, Ferron, 1966; Liu *et al.*, 1993

- ✓ 1% glucoză
- ✓ 1% peptonă
- ✓ 1,5% oxgall
- ✓ 3,5% agar
- ✓ 10 mg/ml dodine (n-dodecilguanidin monoacetate)
- ✓ 250 mg/ml cicloheximidă (actidione)
- ✓ 500 mg/ml cloramfenicol

mediu selectiv pentru *M. acridum* (Fernandes *et al.*, 2010)

- ✓ PDA suplementat cu:
 - 0,5 g/l cholamphenicol g/l thiabendazole
 - 0,25 g/l cycloheximide

c. Mediu selectiv pentru *Paecilomyces lilacinus* (Mitchell *et al.*, 1987)

- ✓ 3,9% potato dextrose agar
- ✓ 1-3% NaCl
- ✓ 0,1% Tergitol
- ✓ 500 mg/ml pentachloronitrobenzene
- ✓ 500 mg/ml benomyl
- ✓ 100 mg/ml streptomycin sulphate
- ✓ 50 mg/ml chlortetracycline hydrochloride

d. Mediu selectiv pentru speciile din genul *Lecanicillium* (Kope *et al.*, 2006)

- ✓ 2 g L-sorbose
- ✓ 2 g L-aparagine
- ✓ 1 g K₂HPO₄
- ✓ 1 g KCl
- ✓ 0,5 g MgSO₄ × 7H₂O
- ✓ 0,01g FeNaEDTA
- ✓ 20 g agar
- ✓ 1 litru apă
- ✓ 0,3 g streptomycin SO₄
- ✓ 0,05 g chlorotetracycline HCl
- ✓ 0,8 g pentachloronitrobenzene
- ✓ 1 g NaB₄O₇ · 10H₂O

Notă: pH 4,0 ajustat cu 10% H₃PO₄.

Metode de izolare a fungilor entomopatogeni din sol (Inglis, Enkerliy, Goettel, 2012)

Fungii entomopatogeni sunt de obicei distribuiți heterogen în sol, prezumtiv în sau lângă cadavrele de insecte. Astfel, combinarea probelor de sol, de obicei, crește frecvența de izolare. Solul poate fi colectat cu diferite instrumente, dar sonda de sol este utilizată cel mai frecvent, deoarece permite prelevarea unui volum determinat de sol. Adâncimea este de obicei limitată la stratul superior organic de 10-15 cm și/sau la orizontul A al profilului de sol. Instrumentul de colectare trebuie să fie sterilizat pentru colectarea eşantioanelor ca să se evite cross-contaminarea. După colectare, probele de sol sunt de obicei plasate într-un mediu rece (5°C). Deși fungii entomopatogeni pot rămâne viabili în sol pentru perioade relativ lungi, se recomandă ca probele să fie prelucrate cât mai repede posibil, de obicei, în termen de 5 zile de la colectare. Metodele descrise mai jos favorizează izolarea propagulelor. Pentru a izola ciuperci prezente în sol ca stadiu de creștere activă sau sub formă de hife latente, au fost concepute o serie de metode (de exemplu, izolarea hifală directă și metodele de spălare succesivă). Pentru un rezumat al acestora, a se vedea Parkinson (1994).

a. Metoda diluției și însămânțării pe cutii Petri

Fungii entomopatogeni din ordinul Hypocreales sunt considerați a fi concurenți slabi în sol în raport cu alte micromicete de sol. Astfel, izolarea directă a ciupercilor entomopatogene din sol se bazează de obicei pe utilizarea unui mediu selectiv. Cea mai populară metodă de izolare este metoda diluției și însămânțării pe cutii Petri. O procedură frecvent utilizată este de a plasa 10 g de sol în 90 ml de apă sterilă sau soluție tampon (de obicei pH 6-7). Proba este apoi omogenizată pentru a elibera propagulele din matricea solului. Tehnica preferată este de a utiliza un mixer comercial, sau suspensia poate fi agitată cu o bară de agitare magnetică sau pe un agitator mecanic timp de 20-60 min. În urma omogenizării, alicotele de 100-200 μl sunt distribuite pe un mediu potrivit. În cazul în care densitatea ciupercilor entomopatogene în sol este mare, poate fi necesar de a dilua succesiv omogenatul obținut.

Totuși densitatea ciupercilor entomopatogene în sol este de obicei scăzută, de aceea pot fi utilizate volume mai mari (1 ml) ale probei inițiale care se transferă pe mediul nutritiv agarizat, folosind o mișcare de rotație sub unghi a cutiei Petri; o concentrație de agar 2-3% poate facilita absorbția soluției în mediu. Când propagulele sunt asociate cu particulele de sol, poate fi necesar de a crește viscozitatea soluției. Creșterea vâscozității va prelunge sedimentarea particulelor care vor reduce variația numărului de particule transferate. Pot fi utilizate diverse substanțe, dar cel mai des folosită și ușor de preparat este o concentrație scăzută de agar (0,2%). Îndată ce omogenatul s-a răspândit pe mediu, culturile sunt incubate la o temperatură adecva-

tă (20-25°C pentru majoritatea taxonilor) pentru 3-7 zile. Coloniile individuale pot fi apoi transferate pe un mediu nutritiv potrivit. Pentru tulpinile ce sporulează intens, dacă este posibil, transferurile se efectuează înainte de a se produce sporularea.

b. Însămânțarea directă pe cutii Petri

În unele cazuri, poate fi necesar de aplicat solul direct pe mediul nutritiv, metodă mai rapidă decât prin diluare și însămânțare. Cea mai simplă metodă este de a împrăști particulele de sol pe suprafața unui mediu agarizat, lăsând hifele fungice să se dezvolte din particulele de sol. Cu excepția cazului în care se utilizează un mediu selectiv, acest lucru nu asigură o izolare calitativă a fungilor entomopatogeni din cauza dezvoltării abundente a ciupercilor de contaminare.

O strategie mai bună este de a încorpora particulele într-un mediu agarizat (Warcup, 1950). Pentru această tehnică, 5-15 g de sol se plasează într-o cutie Petri sterilă. Solul poate fi cernut înainte de plasarea acestuia în cutia Petri sau agregatele mari de sol pot fi fărâmițate. Aproximativ 15 ml de mediu topit (50°C) se toarnă în cutia Petri și particulele de sol sunt dispersate printr-o mișcare turbionară. După incubarea culturilor (de obicei la t° de 20-25°C), tulpinile izolate pot fi transferate pe un mediu special. Dezavantajul metodei constă în faptul că coloniile încorporate în mediu pot fi dificil de transferat și este relativ dificil de a dilua proba originală cu sol steril sau nisip în cazul unor densități înalte ale unităților viabile ce formează colonii (CFU) în sol.

c. Utilizarea insectelor ca momeală

Insectele pot fi utilizate ca momeală pentru a izola indirect ciupercile din sol. În general, fungii entomopatogeni din ordinul Hypocreales sunt considerați saprofiti slabi, având capacitatea de a infecta insectele vii, aceștia au acces la insecte fără a avea concurenți serioși. Cel mai frecvent ca momeală se folosesc larvele speciei *Galleria mellonella*. De asemenea pot fi utilizate și larvele altor insecte, cum ar fi, de exemplu, *Tribolium destructor* și *Acanthocinus aedilis* (Zimmermann 1986). Klingen *et al.* (2002) au constatat că utilizarea larvelor speciei *Delia floralis* permite de a izola tulpini de *T. cylindrosporium* mai frecvent decât utilizând *G. mellonella*.

Probele de sol sunt plasate în containere, solul este umezit, larvele se plasează pe sol și se incubează pentru 14 zile, în condiții care favorizează dezvoltarea ciupercii țintă. Deși cantitatea de sol poate limita densitatea larvelor, de obicei, sunt folosite 5-15 larve per container. Larvele sunt amplasate pe suprafața solului, iar solul este agitat sau containerele sunt inversate sau agitate periodic pentru a se asigura contactul continuu al larvelor cu solul. Larvele moarte sunt colectate la intervale egale de timp și se utilizează pentru a izola microflora fungică internă a acestora. Insectele care nu populează solul (de exemplu, *G. mellonella*), sunt foarte sensibile la infecția cu entomopatogenii din sol, fapt care crește sensibilitatea acestei metode. În anul 1998, Zimmermann a recomandat de a usca solul prin aerisire înainte de reumezire, pentru a preveni infecțiile produse de nematozii entomopatogeni.

Com.
Întreprinderea de Stat Firma Editorială Poligrafică
„*Tipografia Centrală*”
MD-2068, Chișinău, str. Florilor, 1