

MINISTERUL EDUCAȚIEI ȘI CERCETĂRII AL REPUBLICII MOLDOVA
UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA
INSTITUTUL DE ZOOLOGIE

Moldovan Anna
Munteanu-Molotievskiy Natalia
Toderaș Ion

BACTERIILE ENTOMOPATOGENE

CHIȘINĂU • 2023

CZU 579.8:632.937

M 87

Lucrarea a fost examinată și aprobată spre publicare de Consiliul Științific al Institutului de Zoologie, Universitatea de Stat din Moldova

Recenzenți:

Elena Iurcu-Străistaru dr. șt. agricole, conf. univ., Institutul de Zoologie, Universitatea de Stat din Moldova

Daniela Elenciuc dr. șt. biol., conf. univ., Departamentul Biologie și Ecologie, Universitatea de Stat din Moldova

Lucrarea dedicată bacteriilor entomopatogene include o caracteristică generală a grupului de cercetare, aspecte generale legate de bacteriile entomopatogene. În lucrare sunt discutate premisele utilizării agenților bacterieni în controlul biologic al insectelor dăunătoare, fiind relevați unii dăunători importanți studiați. Un capitol aparte este destinat metodelor de bază de izolare, identificare și caracterizare a bacteriilor entomopatogene. De asemenea sunt prezentate rezultatele cercetărilor proprii privind dezvoltarea agenților bacterieni de control biologic al dăunătorilor. 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 studiosi 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.**

Bacteriile entomopatogene / Moldovan Anna, Munteanu-Molotievskiy Natalia, Toderăș Ion ; Ministerul Educației și Cercetării al Republicii Moldova, Universitatea de Stat din Moldova, Institutul de Zoologie. – Chișinău : [S. n.], 2023 (F.E.-P. «Tipografia Centrală»). – 152 p. : fig., tab.

Bibliogr.: p. 116-144 (356 tit.). – [120] ex.

ISBN 978-5-88554-301-9.

CUPRINS

INTRODUCERE	5
1. CARACTERISTICA GENERALĂ A BACTERIILOR ENTOMOPATOGENE	7
1.1. Caracteristica generală și importanța bacteriilor entomopatogene	7
1.2. Caracteristica morfologică a speciei <i>Bacillus thuringiensis</i>	12
1.3. Proprietățile fiziologice, biochimice și genetice ale speciei <i>B. thuringiensis</i>	15
1.4. Particularitățile biologice și ecologice ale speciei <i>B. thuringiensis</i> ...	19
1.5. Potențialul insecticid al tulpinilor de <i>B. thuringiensis</i>	23
2. PREMISE DE UTILIZARE A AGENȚILOR BACTERIENI ÎN CONTROLUL BIOLOGIC AL DĂUNĂTORILOR	33
2.1. Coleoptere dăunătoare pomilor fructiferi incluse în cercetare	35
2.2. Coleoptere dăunătoare culturilor leguminoase și legumicole investigate	45
2.3. Lepidoptere dăunătoare incluse în cercetare	54
2.4. Metode utilizate în combaterea insectelor dăunătoare	61
3. METODE DE STUDIU A BACTERIILOR ENTOMOPATOGENE ...	66
3.1. Metode de cercetare a insectelor	66
3.2. Metode de izolare a bacteriilor entomopatogene	70
3.3. Identificarea tulpinilor bacteriene	73
3.4. Caracterizarea tulpinilor bacteriene	78
3.5. Caracterizarea proprietăților insecticide ale tulpinilor bacteriene	85

4. DEZVOLTAREA AGENȚILOR BACTERIENI DE CONTROL BIOLOGIC AL INSECTELOR DĂUNĂTOARE	89
4.1. Izolarea și identificarea noilor tulpini bacteriene din microflora dăunătorilor pomicoli	89
4.2. Izolarea și identificarea noilor tulpini bacteriene din microflora dăunătorilor legumicoli	94
4.3. Prognozarea potențialului insecticid al tulpinilor autohtone de bacterii	101
4.4. Activitatea insecticidă a tulpinilor autohtone de bacterii	105
CONCLUZII	114
BIBLIOGRAFIE	116
ANEXE	147

INTRODUCERE

Problema dăunătorilor este o parte inevitabilă a agriculturii moderne. Aceasta apare deoarece agroecosistemele reprezintă sisteme biologice mai puțin stabile decât ecosistemele naturale. Practicarea monoculturii, crearea unor condiții specifice de temperatură și umiditate, introducerea unor noi culturi sau soiuri de plante pot favoriza dezvoltarea insectelor dăunătoare. De asemenea, utilizarea insecticidelor cu spectru larg de acțiune poate cauza dispariția prădătorilor naturali care ajută la menținerea dăunătorilor sub pragul economic de dăunare. În aceste scenarii, apar noi dăunători sau dăunătorii existenți provoacă daune considerabile culturilor, biodiversității și mediului ambiant. Impactul economic este estimat la miliarde de dolari pe an. În cadrul ecosistemelor naturale, populațiile multor artropode sunt reglementate în mod natural de microorganismele entomopatogene. Printre microorganismele utilizate cu succes în combaterea biologică a artropodelor dăunătoare menționăm virusurile, bacteriile, micromicetele și nematozii entomopatogeni. Acestea sunt toate răspândite în mediul natural și provoacă infecții naturale la multe specii de dăunători. Mulți dintre acești agenți entomopatogeni pot fi produși în masă și formulați pentru a fi utilizați în teren protejat și deschis în scopul gestionării populațiilor de dăunători într-un mod analog cu pesticidele chimice. În ultimii ani se acordă o atenție sporită alternativelor biologice în controlul insectelor dăunătoare, deoarece insecticidele chimice au mai multe neajunsuri printre care se enumeră toxicitatea înaltă, poluarea mediului, reducerea biodiversității, modul ne selectiv de acțiune și apariția dăunătorilor rezistenți la pesticide (Aktar *et al.*, 2009; Damalas, Eleftherohorinos, 2011; Sansinenea, 2012). Multe guverne au introdus restricții cu privire la utilizarea insecticidelor chimice din cauza consecințelor negative ale aplicării acestora (Hernandez-Fernandez, 2016). Ca rezultat, utilizarea biopesticidelor a fost acceptată în toată lumea ca componentă a combaterii integrate a dăunătorilor (Sansinenea, 2012).

Bacillus thuringiensis, Berliner, 1915 (Firmicutes, *Bacillaceae*) (*Bt*) este o bacterie distribuită pe larg în habitatele naturale, cu proprietatea de a produce în timpul fazei staționare de creștere incluziuni parasporale cristaline numite proteine Cry. Proteinele cristaline reprezintă factori ce determină patogenitatea *Bt* față de insecte (Olson, 2015; Valicente, Bezerra da Silva 2017). Diferite tulpini de *B. thuringiensis* produc diferite tipuri de toxine care acționează asupra unui grup taxonomic îngust de insecte (Sanahuja *et al.*, 2011). Datorită faptului că tulpinile de *Bacillus thuringiensis* manifestă specificitate înaltă de acțiune, sunt prietenoase mediului, inofensive pentru om și pentru flora și fauna nevizată, dar pot fi letale pentru numeroase specii de insecte dăunătoare (Hernandez-Fer-

andez, 2016), aplicarea acestora a devenit o alternativă insecticidelor chimice, iar preparatele pe bază de *Bt* sunt considerate cel mai de succes bioinsecticid al ultimului secol. La momentul actual toxinele *Bt* intră în componența a cca 100 de pesticide bacteriene pulverizabile, ceea ce constituie mai mult de 90% din biopesticidele disponibile pe piața internațională (Fernandez-Chapa *et al.*, 2019). Tulpinile de *Bt* au devenit un instrument important de control biologic al insectelor dăunătoare. Datorită faptului că *Bt* produce o diversitate importantă de toxine Cry, acestea stau la baza unor formule eficiente de bioinsecticide. De asemenea genele Cry sunt inserate în genomul plantelor conferindu-le acestora rezistența la dăunătorii vizați (Gassmann *et al.*, 2009). Toxinele *Bt* produse de plante nu sunt toxice pentru organismele nevizate dar fiind ingerate de către insectă pot provoca moartea acestea. Astfel, un scop major al studiilor este cercetarea tulpinilor, a proteinelor produse, și posibilitatea atât a organismelor vii cât și a compușilor cu efect toxic să fie valorificate în calitate de agenți de control biologic al dăunătorilor - o tehnologie sigură pentru mediu și sănătatea omului (Kumar *et al.*, 2021).

La momentul actual în Republica Moldova sunt disponibile mai multe bioinsecticide de natură virală și unul de natură fungică dezvoltate de către colaboratorii instituțiilor de cercetare din Republica Moldova (Volosciuc, 2015; Zavtoni *et al.*, 2016). De asemenea, pe piața națională există 4 produse pe bază de *B. thuringiensis* de import (Registrul de Stat al produselor de uz fitosanitar și fertilizanților, 2023). Astfel la nivel național, tulpinile de bacterii sunt încă insuficient explorate și utilizate în managementul insectelor dăunătoare, fiind necesare investigații suplimentare. În studiul de față sunt prezentate unele rezultate ale colectivului de autori privind izolarea, identificarea și caracterizarea noilor tulpini de *Bacillus* spp., inclusiv *Bacillus thuringiensis* în scopul îmbogățirii colecțiilor cu tulpini noi native și accelerarea producerii locale de biopesticide.

1 | CARACTERISTICA GENERALĂ A BACTERIILOR ENTOMOPATOGENE

1.1. Caracteristica generală și importanța bacteriilor entomopatogene

Bacteriile entomopatogene sunt organisme procariote unicelulare cu o lungime cuprinsă între 1 μm până la câțiva μm . Majoritatea bacteriilor patogene pentru insectele dăunătoare fac parte din familiile *Bacillaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Streptococcaceae* și *Micrococcaceae*. Aceste familii de bacterii reprezintă de obicei epifiti sau agenți patogeni slabi; cu toate acestea, unii dintre ei sunt extrem de virulenți față de gazdele lor. Peste 100 de bacterii au fost identificate ca agenți patogeni ai artropodelor, printre care reprezentanții genului *Bacillus*, au primit cea mai mare atenție în calitate de agenți de control biologic.

Genul *Bacillus* Cohn, 1872, face parte din încrengătura Firmicutes, clasa Bacilli, ordinul Bacillales, care include familiile: *Bacillaceae* (care conține genul tip), *Alicyclobacillaceae* (fam. nov., acest volum), *Listeriaceae* (fam. nov.), *Paenibacillaceae* (fam. nov.), *Pasteuriaceae*, *Planococcaceae*, *Sporolactobacillaceae* (fam. nov.), *Staphylococcaceae*, (fam. nov.), *Thermoactinomycetaceae* (Matsuo *et al.*, 2006), și trei familii *incertae sedis*. Una dintre puținele caracteristici generale ale ordinului este formarea de endospori la majoritatea genurilor din acest ordin. Peretele celular este de tip Gram-pozitiv (De Vos *et al.*, 2015). Genul *Bacillus*, este unul dintre cele mai numeroase genuri din familia *Bacillaceae* și reprezintă un grup larg de bacterii saprofite care au proprietatea de a produce aerob, în condiții de creștere nefavorabile spori latenți (Zeigler, Perkins, 2009). Multe specii din această familie sunt de importanță practică, deoarece produc antibiotice și peptide cu activități antimicrobiene, antivirale și antitumorale. Ele sintetizează, de asemenea, enzime și molecule termostabile care pot suprima organismele fitopatogene din sol (Garbeva *et al.*, 2003; Mandic-Mulec *et al.*, 2015). Inițial genul *Bacillus* cuprindea toate bacteriile de tip bastonaș cu capetele rotunjite, iar acum include doar bacilii Gram pozitivi, care pot deveni Gram negativi odată cu vârsta, capabili de a produce spori, care formează lanțuri și cresc aerob sau facultativ anaerob (Turnbull, 1996; Thwaite, Atkins, 2012).

Genul *Bacillus* întrunește 266 de specii, care sunt identificate prin utilizarea criteriilor morfologice și biochimice a fiecărei specii (Turnbull, 1996; Palma *et al.*, 2014; Mandic-Mulec *et al.*, 2015). Sunt bacterii gram-pozitive, unele specii sunt aerobe, în timp ce altele sunt facultativ sau obligat anaerobe (Turnbull, 1996; Carroll *et al.*, 2019). Multe specii din acest gen prezintă o gamă largă de abilități fiziologice care le permit să trăiască în diverse medii. Sporii sunt rezistenți la căldură, frig, radiații, desicare și substanțe dezinfectante. Cele mai multe specii de bacili sunt saprofite. Nu numai că endosporii *Bacillus* sunt rezistenți la condițiile fizice și chimice ostile, dar și diverse specii au proprietăți fiziologice neobișnuite care le permit să supraviețuiască sau să prospere în medii cu condiții nefavorabile. Microorganismele

din genul *Bacillus* pot fi întâlnite într-o diversitate extraordinară de habitate, variind de la nisipurile deșertului și izvoarele termale la solurile arctice și de la apele dulci la sedimentele marine. Genul include reprezentanți termofili, psihrofili, acidofili, alcalifili, halotoleranți și halofili, care sunt capabili să crească la temperaturi, valori ale pH-ului și concentrații de sare la care puține alte organisme ar putea supraviețui (Turnbull, 1996, Germani *et al.*, 2013, Mandic-Mulec *et al.*, 2015).

Din marea diversitate de specii din genul *Bacillus* speciile *Bacillus cereus*, *B. popilliae* (reclasificat în *Paenibacillus*), *B. sphaericus* (reclasificat în *Lysinibacillus*) și *B. thuringiensis* au prezentat proprietăți biotehnologice superioare pentru a fi utilizate în agricultură în calitate de ingrediente active a biopreparatelor insecticide.

• *Bacillus cereus*

Bacillus cereus Frankland și Frankland 1887 este o bacterie Gram-pozitivă în formă de bastonaș care se găsește frecvent în sol și produsele alimentare (Paul *et al.*, 2021). Unele tulpini sunt dăunătoare pentru oameni și provoacă boli de origine alimentară datorită naturii sporulate, în timp ce alte tulpini pot fi benefice, servind în calitate de probiotice pentru animale și chiar manifestă mutualism cu anumite plante (Ryan, Ray, 2004; Felis *et al.*, 2009; Azcon *et al.*, 2010). Bacteriile din specia *B. cereus* pot fi anaerobe sau facultativ-anaerobe și, ca și alți membri ai genului *Bacillus*, pot produce endospori. Au o gamă largă de factori de virulență, inclusiv fosfolipaza C, cereulida, sfingomielinaza, metaloproteazele și citotoxina K (Tuipulotu *et al.*, 2021; Yossa *et al.*, 2022).

Solul reprezintă rezervorul principal al microorganismelor din specia *B. cereus* (Vilain *et al.*, 2006). Atunci când condițiile din sol sunt favorabile, spori de *Bacillus cereus* germinează, se dezvoltă pe materia organică în descompunere prezentând fenotipul filamentos multicelular. Ulterior, bacteria se răspândește în sol și, în cele din urmă, când nutrienții sunt epuizați și condițiile nu mai sunt favorabile, resporează. În timpul creșterii într-o comunitate microbială mixtă, cum ar fi creșterea pe materialul vegetal în proces de descompunere, producția de toxine poate constitui un avantaj care contribuie la colonizarea mediului de către tulpinile de *B. cereus* (Tempelaars *et al.*, 2011). În rizosferă, unele tulpini de *B. cereus* interacționează pozitiv cu anumite plante prin stimularea creșterii acestora și le oferă protecție împotriva anumitor boli ale plantelor (Handelsman *et al.*, 1990; Vessey, Buss, 2002; Ceuppens *et al.*, 2013). Compușii antimicrobieni produși inhibă sinergic creșterea diferitor bacterii Gram-negative și Gram-pozitive, ciuperci patogene ale plantelor și oomicete (Silo-Suh *et al.*, 1998; Ceuppens *et al.*, 2013). Sporii de *Bacillus cereus* prezenți în sol sunt ingerați de artropode. În intestinalele artropodelor, are loc germinarea, urmată de creșterea și, în final, resporularea bacteriilor (Margulis *et al.*, 1998). Defecarea sau moartea naturală a gazdei eliberează din nou celulele și/sau spori în sol. Ciclul vital de tip simbiot al bacteriei *B. cereus*, poate fi fie comensal, fie mutualist. Bacteria *B. cereus* poate produce diverse toxine, bacteriocine și antibiotice, care ar putea proteja organismele artropode împotriva agenților patogeni enterici (Bizani *et al.*, 2005; Tempelaars *et al.*, 2011). De asemenea, tulpinile de *B. cereus*ucid

gazda prin producerea de toxine intestinale, fenomen urmat de colonizarea gazdei și înmulțirea în cadavru și, în cele din urmă, resporularea și revenire în sol ca spor (Swiecicka *et al.*, 2008). În rezultatul ciclului vital de tip saprofit bacteria ajunge în sol, ape, producția agricolă. Ingestia sporilor de *B. cereus* de către oameni poate duce la intoxicații alimentare emetice sau diareice (Ceuppens *et al.*, 2013). Uneori, cazurile de intoxicații alimentare pot avea chiar un rezultat letal din cauza deshidratării sau a leziunilor hepatice și cerebrale după translocarea cereulidei în acele țesuturi (Posfay-Barbe *et al.*, 2008). Tulpinile nepatogene de *B. cereus* sunt contaminanți nedorți în produsele alimentare, deoarece provoacă deteriorarea acestora și pierderi economice, de exemplu în cazul produselor lactate (De Jonghe *et al.*, 2010). *Bacillus cereus* de asemenea cauzează infecții cutanate, prin inhalare poate provoca leziuni pulmonare semnificative, poate invade diverse țesuturi precum cel intestinal, sangvin ș.a. Tulpinile de *Bacillus cereus* produc numeroase toxine (Beecher *et al.*, 2000; Hardy *et al.*, 2001; Fagerlund *et al.*, 2008). Din cauza riscurilor pentru sănătatea umană, tulpinile de *B. cereus* nu sunt utilizate pe larg pentru producția de biopesticide, de asemenea înainte de a fi utilizate în calitate de tulpini producător este verificat potențialul acestor tulpini de a produce exotoxine.

• *Paenibacillus popilliae*

Paenibacillus popilliae Dutky 1941 reprezintă un bacil Gram pozitiv nonmotil. *Paenibacillus popilliae* și *Paenibacillus lentimorbus* sunt agenți patogeni obligați care provoacă „boală lăptoasă” la larvele de scarabide din subfamiliile Melolonthinae, Rutelinae, Aphodinae și Dynastinae (Klein, 1992; Jurat-Fuentes, Jackson, 2012). Tulpinile acestor bacterii sunt foarte specifice, prezentând acțiune doar contra speciilor gazdă din care au fost izolate. Pentru prima dată tulpina de *P. popilliae* a fost izolată din specia *Popilia japonica* Newman, 1841 (Coleoptera, Scarabeidae). Acest parazit bacterian obligatoriu, specific, a fost comercializat ca un insecticid microbial ultra-sigur, atoxigen, împotriva larvelor speciilor dăunătoare de scarabeide care locuiesc în sol. Agentul bacterian controlează focarele dăunătorilor și, ulterior, previne alte focare majore pe același loc. Când spori sunt ingerați de larve, aceștia devin activi, germinează, iar bacteria se multiplică în larva, care continuă să trăiască. Însă, un număr mare de bacterii împiedică maturizarea larvelor. Când populația bacteriană atinge o densitate suficient de mare, larva piere și spori bacterieni sunt eliberați în sol pentru a infecta următoarele gazde. Biopesticidele pe baza speciei *P. popilliae* au devenit unul din primele insecticide microbiene dezvoltate și un exemplu clasic de utilizare a bacteriilor în combaterea biologică a dăunătorilor. Producția comercială a biopesticidelor pe baza tulpinilor de *P. popilliae* a început la mijlocul anilor 1940 și continuă și astăzi (Obenchain, Ellis, 1990). Preparatele utilizate de mai bine de 60 de ani în Statele Unite în calitate de biopesticid au în calitate de producător aceleași tulpini active contra dăunătorului *Popilia japonica*. Fiind paraziți obligați tulpinile de *P. popilliae* nu se dezvoltă bine *in vitro*. Din cauza absenței unui sistem eficient de producție în masă, produsul trebuie aplicat

într-o abordare inoculativă, bazându-se pe reciclarea în larvele infectate pentru a răspândi boala. Sporii pot persista în sol câțiva ani; cu toate acestea, disponibilitatea limitată, combinată cu performanța și stabilitatea redusă, au împiedicat utilizarea largă a bacteriei *P. popilliae* (Klein, 1992; Redmond, Potter, 1995). Tulpinile care infectează larve din alte specii nu au fost dezvoltate comercial. Sunt realizate cercetări cu privire la potențialul tulpinilor din genul *Paenibacillus*, care produc proteine eficiente, inclusiv chitinaze și proteine cristal (Cry), de a fi utilizate pentru combaterea dăunătorilor insectelor (Turnbull, 1996; Jenson, 2014). Chitinazele produse de reprezentanții genului *Paenibacillus* hidrolizează chitina, polizaharida structurală ce constituie exoscheletul insectelor și a lumenului intestinal ceea ce duce la reducerea hrănirii și moartea insectelor infectate. *Paenibacillus* sp. D1 și chitinaza sa sunt tolerante la insecticidele chimice comune, iar chitinaza însăși este, de asemenea, foarte stabilă în câmp la 40°C, indicând potențialul organismului sau enzimei sale de a fi aplicate în calitate de insecticid (Turnbull, 1996; Jenson, 2014). S-a demonstrat că tulpina *Paenibacillus lentimorbus* Semadara, izolată din larvele gândacului *Blitopertha orientalis*, provoacă mortalitate sporită în rândul insectelor. Genele Cry au fost, de asemenea, găsite la unele tulpini de *P. popilliae* și *Paenibacillus* spp. Kh3. De asemenea, tulpina *P. polymyxa* NMO10 a fost modificată genetic fiind transferate genele Cry1C de la *B. thuringiensis* pentru a combina activitatea insecticidă a proteinelor Cry cu proprietățile de promovare a creșterii plantelor ale bacteriei *P. polymyxa*. Tulpina modificată a demonstrat o toxicitate mai mare împotriva lepidopterelor decât tulpina de *B. thuringiensis* sursă, de la care a fost preluată gena Cry (Turnbull, 1996; Valtierra-de-Luis *et al.*, 2020).

În timp ce speciile genul *Paenibacillus* pot contribui la combaterea dăunătorilor, este important de reținut că interacțiunile dintre specii în câmp pot fi complexe. De asemenea, trebuie luate în considerare efectele neintenționate ale agenților de control biologic. De exemplu, concentrații înalte ale tulpinilor din genul *Paenibacillus* sau specia *P. polymyxa*, în apropierea sistemului radicular, pot spori sensibilitatea plantelor la afide, posibil prin nivelurile crescute ale acidului indolil-acetic, fitohormon care promovează creșterea plantelor. În timp ce diferite specii de *Paenibacillus* suprimă nematozii parazitari, s-a constatat că *P. nematophilus* împiedică dispersarea nematodului benefic *Heterorhabditis megidis* (Turnbull, 1996; Valtierra-de-Luis *et al.*, 2020).

• *Lysinibacillus sphaericus*

Lysinibacillus sphaericus (Meyer, Neide 1904) Ahmed *et al.* 2007 (cunoscut anterior ca *Bacillus sphaericus*) este o bacterie Gram-pozitivă, mezofilă, bacilară, întâlnită frecvent în sol. Tulpinile din această specie pot forma endospori rezistenți care sunt toleranți la temperaturi ridicate, substanțe chimice și lumina ultravioletă și pot rămâne viabili pentru perioade lungi de timp. Produce un spor sferic caracteristic, un fenotip care îl face ușor de distins de alte specii de *Bacillus*, inclusiv cel mai bine caracterizat entomopatogen bacterian, *Bacillus thuringiensis*, care produce un spor ovoidal (Federici *et al.*, 2006; Park, Federici, 2009). Spre deosebire de tulpinile

de *B. thuringiensis*, pentru care virulența împotriva insectelor este bine caracterizată, *L. sphaericus* destul de mult timp a fost lăsat în umbră.

Reclasificarea speciei din genul *Bacillus* în *Lysinibacillus* se bazează pe faptul că genul *Lysinibacillus*, spre deosebire de speciile tip din genul *Bacillus*, conține în compoziția peptidoglicanului lizină, acid aspartic, alanină și acid glutamic (Ahmed *et al.*, 2007). *L. sphaericus* are cinci grupuri de omologie (I-V), grupul II împărțindu-se în continuare în subgrupele IIA și IIB (Krych *et al.*, 1980). Chiar înainte de a fi cunoscute genomurile complete, s-a propus ca aceste grupuri să reprezinte specii distincte, datorită nivelurilor scăzute de omologie dintre grupuri. În 2015, studiile la scară genomică au demonstrat că specia actuală este parafiletică și include *L. fusiformis* și *L. boronitolerans* (Xu *et al.*, 2015).

Tulpinile entomopatogene se găsesc în subgrupul de omologie IIA, cu toate acestea, acest grup conține și tulpini nepatogene. Activitatea insecticidă a unor tulpini de *L. sphaericus* a fost descoperită pentru prima dată în 1965, iar studiile ulterioare au arătat că țânțarii sunt ținta majoră a acestei specii. Există date privind activitatea tulpinilor din specia *L. sphaericus* împotriva altor organisme, cum ar fi nematodul *Trichostrongylus colubriformis*, având efecte letale asupra ouălor (Bone *et al.*, 1987). Specia este utilizată pe larg în programele de control al țânțarilor din întreaga lume și are o specificitate ridicată împotriva larvelor de țânțari. Totodată tulpinile de *L. sphaericus* sunt inofensive pentru mamifere, pești, păsări și insecte nevizate (Berry, 2011). În ultimii 25 de ani, cercetările au fost orientate spre izolarea tulpinilor de *L. sphaericus* în primul rând datorită proprietăților larvicide împotriva speciilor de țânțari din genurile *Culex* și *Anopheles*. Tulpina 2362 este cel mai utilizat larvicid comercial din specia *L. sphaericus*, reprezentând ingredientul activ al biopesticidului VectoLex® (Valent BioSciences, Libertyville, IL). În mod independent, a fost comercializată și tulpina C3-41 care are o toxicitate comparabilă cu tulpina 2362 (Xingtai Biotechnology Co., Ltd., Wuhan, China) fiind pe scară largă utilizată în China și Asia de Sud-Est (Park *et al.*, 2010).

• *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis Berliner, 1915 (Firmicutes, *Bacillaceae*) (*Bt*) este o bacterie omniprezentă, capabilă să producă endospor elipsoidal, dar predominant cilindric, amplasat central sau subterminal, care conține incluziuni parasporale numite cristale sau δ -endotoxine cunoscute de a avea proprietăți insecticide (Sanahuja *et al.*, 2011).

Bacillus thuringiensis este o bacterie naturală din sol. Ea produce proteine care sunt toxice pentru multe insecte în stadiul larvar. Specia *B. thuringiensis* include mai multe subspecii, care sunt toxice pentru anumite grupuri de insecte, fiind evidențiate cca 100 de subspecii.

În mod natural *B. thuringiensis* se găsește pe larg în sol, pe frunze, precum și în alte medii (Sanahuja *et al.*, 2011). Multe subspecii *Bt* au fost izolate din corpul insectelor. Subs speciile *Bt* care manifestă proprietăți insecticide împotriva Coleoptelilor și Lepidoptelilor sunt răspândite în sol și pe suprafețele frunzelor,

în timp ce subspeciile care manifestă proprietăți insecticide împotriva Dipterelor sunt frecvent întâlnite în mediile acvatice. Sporii *Bt* supraviețuiesc în mediul ambiant și pot trece în stadiul vegetativ atunci când condițiile devin favorabile. De asemenea *Bt* a fost izolat din reziduurile animalelor erbivore și cerealele depozitate (Mukhija, Khaana, 2018).

Proprietățile insecticide ale speciei *Bacillus thuringiensis* au fost remarcate cu mulți ani înainte de identificarea acestei bacterii, primele utilizări fiind datate încă în Egiptul antic (Osman *et al.*, 2015). Pentru prima dată infectarea larvelor de insecte cu *Bt*, și anume specia *Bombyx mori* (Lepidoptera, Bombycidae) a fost observată de Ishiwata în anul 1901. Caracterizarea speciei *Bacillus thuringiensis* a fost efectuată de către Berliner în anul 1915. Primele date privind utilizarea preparatelor pe baza *Bt* în scopul controlului populațiilor de insecte dăunătoare datează cu sfârșitul anilor 1920, în Ungaria, și începutul anilor 1930, în Iugoslavia. În 1938 în Franța apare primul bioinsecticid comercial „*Sporeine*” având în ca ingredient activ o tulpină de *Bt* (Sansinenea, 2012; Osman *et al.*, 2015; Heckel, 2020). În perioada ce a urmat au fost elaborate numeroase preparate de control biologic al insectelor, tulpinile de *Bt* devenind cel mai important agent de control biologic, fiind baza a cca 95% din biopesticidele disponibile în comerț (Melo *et al.*, 2016).

Cel de al Doilea Război Mondial, mecanizarea și chimizarea agriculturii în anii ce au urmat, au oprit ascensiunea rapidă a agenților microbieni de control biologic, preparatele biologice fiind plasate în umbră de către substanțele chimice cu proprietăți insecticide (Heckel, 2020). Însă în ultimii ani, documentarea multiplelor efecte adverse ale insecticidelor chimice asupra sănătății umane și biodiversității au readus în atenția comunității științifice metodele biologice de control al dăunătorilor.

1.2. Caracteristica morfologică a speciei *Bacillus thuringiensis*

Pentru prima dată *B. thuringiensis* a fost descoperit în 1901 de către biologul japonez Ishiwata Shigetane în viermii de mătase (*Bombyx mori* L.). Savantul a dat speciei numele de *Bacillus sotto* folosind cuvântul japonez *sottō* (rom. colaps). Numele a fost atribuit datorită faptului că savantul a observat la insectele cercetare paralizia provocată de infecția bacteriană. În 1911 în Thuringia, microbiologul german Ernst Berliner a izolat o bacterie din larvele de *Ephestia kuehniella*. Bacteria era agentul cauzal al unei boli numită în germană *Schlaffsucht* (rom. somnolență). În anul 1915 Berliner a numit bacteria *Bacillus thuringiensis*. Ulterior *B. sotto* a fost redenumit în *B. thuringiensis* var. *sotto* (Sanahuja *et al.*, 2011; Rabinovitch *et al.*, 2017).

Specia *Bacillus thuringiensis* a fost plasată separat, în genul *Bacillus*, în anul 1973, în monografia „*The Genus Bacillus*” (Gordon *et al.*, 1973) și în anul 1974 în lucrarea „*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*”. În monografia „*The Genus Bacillus*”, Gordon *et al.* au menționat specia *Bacillus thuringiensis* fiind o varietate a speciei *Bacillus cereus*, datorită proprietăților morfo-fiziologice și biochimice comune, alături de alte specii precum *B. anthracis* și *B. mycoides*.

Grupul *Bacillus cereus sensu lato*, este un grup de bacterii care cuprinde nouă specii filogenetic înrudite, dar diverse din punct de vedere ecologic, cu o diversitate enormă de gazde. Cele mai bine studiate specii ale acestui grup sunt *B. anthracis*, agentul patogen al antraxului, *B. cereus sensu stricto*, care poate cauza intoxicații alimentare la om și *B. thuringiensis*, o specie entomopatogenă utilizată pe larg în calitate de biopesticid (Gdoura-Ben Amor *et al.*, 2018). În rezultatul cercetărilor a fost determinată relația genetică strânsă între aceste specii. Pe lângă *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides* și *B. thuringiensis*, în grupul *Bacillus cereus* mai sunt incluse speciile înrudite: *Bacillus weihenstephanensis* (Lechner *et al.*, 1998), *Bacillus cytotoxicus* (Guinebretiere *et al.*, 2013), *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides* (Nakamura, 1998), *Bacillus toyonensis* și *Bacillus cereus* biovar *anthracis* (Fayad *et al.*, 2019). Totuși pot fi evidențiate și anumite caracteristici speciale ale speciei *Bacillus thuringiensis*, printre care: capacitatea sa de a trăi în mediu liber și independent de alți bacili Gram-pozitivi sporulați, producția de proteine cristaline parasporale entomocide și supraviețuirea într-o nișă unică în mediul ambiant, și anume în intestinul mediu și hemocelele insectelor.

Studiile descriptive ale speciilor din grupul *B. cereus* au arătat că celulele lor sunt mai mari decât cele ale lui *B. subtilis*, cu lățime cuprinsă între 1,0-1,2 μm și lungime 3,0-5,0 μm . Majoritatea reprezentanților acestui grup formează colonii cu o textură a suprafeței coloniilor distinctivă, prezentând un aspect de cristale de gheață, deși *B. mycoides* formează de obicei colonii rizoidale complexe (Zeigler, Perkins, 2009) (figura 1.1). La cultivarea pe mediul nutritiv solid tulpinile din specia *B. thuringiensis*, similar cu alte specii din genul *Bacillus* formează colonii de dimensiuni mari, cu formă neregulată, albe, cu o suprafață rugoasă și profilul plat (Breed *et al.*, 1957). La cultivarea pe medii nutritive solide coloniile bacteriene în scurt timp colonizează toată suprafața cutiei Petri (Mukhija, Khaana, 2018) (figura 1.1).

Atunci când sunt izolate tulpini noi de *Bt* din diverse surse, sol, apă, insecte, selecția doar pe baza proprietăților morfo-culturale nu permite de a deosebi tulpinile din această specie de majoritatea tulpinilor din același gen (Park *et al.*, 2017).

Celula vegetativă are formă de bastonaș cu capete dreptunghiulare, 1,0-1,2 μm lățime și 3,0-5,0 μm lungime, este motilă, datorită prezenței pe suprafața celulei a unui număr mare de flageli. Flagelii reprezintă un factor de virulență datorită facilitării aderenței celulei bacteriene la suprafața epiteliului intestinal (Zhang *et al.*, 1995). Celulele sunt solitare, uneori formează lanțuri scurte sau lungi, înfășurate, nu posedă capsulă, prezintă o protoplasma granulară sau difuză. Au fost întâlnite variații ale speciei cu mărimea celulei cuprinsă între 0,8-1,3 μm și 2,0-6,0 μm , cu capetele rotunjite, încapsulate, nemotile, cu protoplasmă uniformă, Gram-variabile. Sporularea are loc timp de 18-24 ore. Sporangiumul nu este umflat, cu spori de obicei dispuși oblic în interior. După îmbătrânirea celulei la fiecare capăt al acesteia rămâne o cantitate de protoplasmă. Sporii au dimensiunea de 1,0-1,5 μm , cu variații de la 0,5-1,2 μm până la 1,3-2,5 μm (Breed *et al.*, 1957). Sporii au pereți subțiri, formă elipsoidală sau cilindrică și sunt amplasați central sau subterminal (Schünemann *et al.*, 2014; Rabinovitch *et al.*, 2017).



*a. Bacillus cereus**



*b. Bacillus mycooides**



c. Bacillus thuringiensis (orig.)



d. Bacillus spp. (orig.)

Fig. 1.1. Aspectul coloniilor speciilor din genul *Bacillus* la cultivare pe Agar nutritiv

(Notă: * sursele imaginilor notate cu * în lucrare sunt prezentate în lista bibliografică)

1.3. Proprietățile fiziologice, biochimice și genetice ale speciei *Bacillus thuringiensis*

Bacillus și genurile înrudite sunt distribuite pe larg în natură și includ bacterii termofile, psihrofile, acidofile, alcalofile și bacterii halofile care utilizează o gamă largă de surse de carbon pentru creștere și dezvoltare (Cihan *et al.*, 2012). Numeroase specii ale genului *Bacillus* posedă o gamă largă de abilități fiziologice care le permit să trăiască în orice mediu natural. Deoarece sporii multor specii din genul *Bacillus* sunt rezistenți la căldură, radiații, dezinfectanți, acestea sunt greu de eliminat din materialele medicale și farmaceutice și sunt o cauză frecventă de contaminare (Turnbull, 1996). Tulpinile din specia *Bt* sunt ușor de cultivat *in vitro*, sporulează bine în condiții de laborator și folosesc o varietate semnificativă de carbohidrați ca surse de carbon și energie. Glucoza este cea mai utilizată sursă de carbon, fiind și un component avantajos, însă poate fi utilizat ca sursă de carbon de asemenea și glicerolul, care posedă proprietatea de a determina o toxicitate mai mare a tulpinilor de *Bt* (Sarrafzadeh, 2012).

În unele din primele studii ale proprietăților biochimice ale tulpinilor de *Bt* au fost efectuate teste biochimice și serologice care au permis autorilor de a diviza tulpinile în 6 grupuri (De Barjac, Bonnefoi, 1962). Această clasificare era susținută și de testele serologice în care era cercetată prezența antigenului H flagelar (de Barjac, Bonnefoi, 1968; Rabinovitch 2017). În tabelul 1.1 sunt prezentate proprietățile fiziologice și biochimice pentru grupul bacteriilor din genul *Bacillus* din care face parte *Bacillus thuringiensis* iar în figura 1.2 sunt date proprietățile biochimice ale variațiilor serologice ale speciei *Bacillus thuringiensis*.

Tabelul 1.1. Caracteristică de baza pentru identificarea și determinarea speciilor din genul *Bacillus* (după Sharma *et al.*, 2013)

Proprietăți	Mobilitate	Producere catalaza	Organisme parasporale	Lipide globulare în protoplasmă	Reacția lecithovitelin	Utilizarea citratului	Creșterea anaerobă	Reacția V-P	pH în mediul V-P < 6.0	Creștere la 50	Creștere la 60	Creșterea în 7% NaCl	Acid Sare de amoniu glucoză	Acid + gaz Sare de amoniu glucoză	Reducerea nitraților	Hidroliza Cazeinei	Hidroliza amidonului	Utilizarea propionatului
Grupul nr. 1																		
<i>B. megaterium</i>	V	+	-	+	-	+	-	-	V	-	-	+	+	-	V	+	+	N
<i>B. cereus</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	N
<i>B. cereus</i> sub-sp <i>mycoides</i>	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	N

<i>B. anthracis</i>	-	+	-	+	+	V	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	N
<i>B. thuringiensis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	N
<i>B.licheniformis</i>	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
<i>B. subtilis</i>	+	+	-	-	-	+	-	-	V	V	-	+	+	-	+	+	+	-
<i>B. pumilus</i>	+	+	-	-	-	+	-	-	+	V	-	+	+	-	-	+	-	-
<i>B. firmus</i>	V	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-
<i>B. coagulans</i>	+	+	-	-	-	V	+	+	+	+	V	-	+	-	V	V	+	-

V-P: Voges-Proskauer, “+”: mai mult de 85 % din tulpinile examinate de către Gordon *et al.* au fost pozitive, “-”: mai mult de 85 % sunt negative, “V”: variabila, “N”: încercarea nu se aplică, “(+)”: colonie care trebuie răzuită pentru a vedea reacția pozitivă.

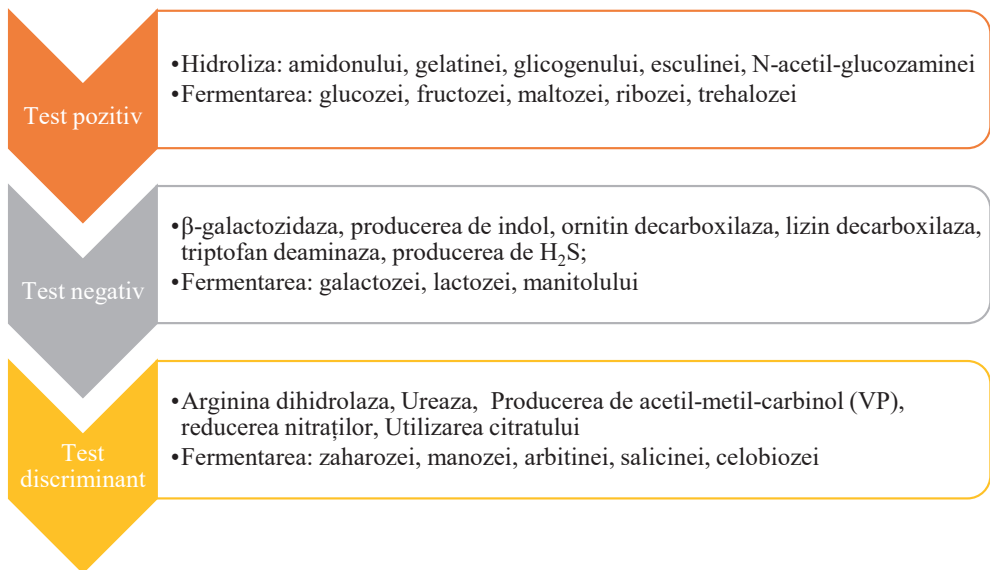


Fig. 1.2. Proprietățile biochimice ale variațiilor serologice ale speciei *Bacillus thuringiensis* (după Rabinovitch *et al.*, 2017)

Bt este o bacterie facultativ aerobă, iar temperaturile de creștere pot varia. Tulpinile de *Bt* cresc într-un interval de 5-10°C și 40-48°C (Ventosa, *et al.*, 1998; Rabinovitch *et al.* 2017), temperatura optimală de creștere fiind 30°C (Dagga *et al.*, 2016). Celulele crescute pe agar nutritiv cu glucoză produc o cantitate mare de substanțe de rezervă care sunt integrate în vacuole sau prezintă un aspect spumos (Rabinovitch *et al.*, 2017). Tulpinile pot varia în preferințele sale față de pH, astfel într-un studiu recent au fost cercetate creșterea și producerea biomasei *B. thuringiensis* la valori ale pH cuprinse între 5,5-8,0. Conform unor cercetători pH-ul optim atestat a fost de 7,0 (Dagga *et al.*, 2016). A fost cercetat impactul diferitor surse de surse de

carbon, azot și săruri minerale asupra germinării, creșterii și sporulării tulpinilor din specia *B. thuringiensis*. În rezultatul studiului a fost constatat faptul că substanțele utilizate au un impact nesemnificativ asupra germinării (tabelul 1.2, Sarrafzadeh, 2012). Alcoolul de porumb a avut un impact negativ asupra producerii de endospori. Acetatul de sodiu și alcoolul de porumb au facilitat creșterea *Bt*, iar $MnSO_4$ a afectat negativ procesele de creștere.

Tabelul 1.2. Cerințe nutriționale ale *B. thuringiensis* în timpul diferitor faze de creștere, sporulare și germinare evaluate prin metoda Plackett-Burman (după Sarrafzadeh, 2012)

Nr. d/o	Glucoză	Glicerol	Acetat de sodiu	$(NH_4)_2SO_4$	Alcool de porumb	Extract din drojdii	Cazeină hidrolizată	$CaCl_2$	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	$MnSO_4 \cdot H_2O$	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	Germinare	Creștere	Sporulare
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	X_9	X_{10}	X_{11}	Celule/ $ml \times 10^{-7}$	Celule/ $ml \times 10^{-7}$	%
1.	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	1,7	5,0	0,0
2.	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	2,4	4,0	2,5
3.	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	1,0	3,5	14,0
4.	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	4,3	3,3	0,0
5.	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	4,4	4,3	0,0
6.	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	2,5	35,0	75,0
7.	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	5,1	4,7	0,0
8.	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	3,3	31,0	12,0
9.	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	1,9	12,0	65,0
10.	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	1,4	3,7	95,0
11.	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	3,0	4,8	0,0
12.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,5	6,4	99,0
Conc.	g/L	g/L	g/L	g/L	ml/L	g/L	g/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L			
(-)	5	1	0	1	2	1	1	20	50	5	0			
(+)	50	10	5	10	20	10	10	400	700	100	20			

La fel ca și *B. cereus*, *B. thuringiensis* prezintă reacție pozitivă la testul de lecitinază. Majoritatea tulpinilor prezintă reacție pozitivă la testul de catalază și hidrolizează cazeina, gelatina și amidonul. De asemenea, reacția la testul Voges-Proskauer este pozitivă, utilizează citratul ca sursă de carbon, descompune tirozina și nu

dezaminează fenilalanina. Majoritatea tulpinilor scindează zaharoza și alte zaharuri, însă *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* nu fermentează această dizaharidă (Rabinovitch *et al.*, 2017). Tabelul 1.3 prezintă date sumare privind proprietățile biochimice ale diferitor tulpini de *Bt*.

Tabelul 1.3. Proprietățile fiziologice și biochimice ale diferitor tulpini de *B. thuringiensis*

Nr. d/o	Parametrul analizat Sursa	Motilitate	Incluziuni parasporale	Creștere anaerobă	Reacția Voges-Proskauer	Activitatea catalazei	Hidroliza cazeinei	Hidroliza amidonului	Hidroliza gelatinei
1.	Turnbull, 1996	+	+	+	+	+	+	+	*
2.	Lee <i>et al.</i> , 2004	+	+	*	+	+	*	*	*
3.	Kaur <i>et al.</i> , 2006	*	+	*	*	+	+	+	*
4.	Chatterjee <i>et al.</i> , 2007	+/-	+	-	+	+	+	*	+
5.	Alvarez, Loto, 2012	+	+	*	+	+	+	+/-	+/-
6.	Sharma, Iyer, 2018	+	+	*	+	+	+	+	+
7.	Date sumare	+	+	V	+	+	+	+	+

Notă: «+» - reacție pozitivă; «-» - reacție negativă; «*» - nu s-au analizat acești parametri, «V» - variabil

Mărimea genomului tulpinilor *B. thuringiensis* variază de la 2,4 la 5,7 milioane pb (Osman *et al.*, 2015). Proprietățile patogene ale diferitor membri ai grupului *Bacillus cereus*, inclusiv *Bt* se datorează prezenței unor gene specifice ce codifică toxine și sunt amplasate în plasmidele extra-cromozomiale auto-transmisibile (Bravo *et al.*, 2011).

Caracterizarea genomică a tulpinilor *Bt* oferă o sursă valoroasă de polipeptide cu potențiale aplicații biotehnologice pentru controlul dăunătorilor. Într-un studiu recent a fost realizată secvențierea genomului tulpinii de *Bt* GR007, patogenă pentru larvele dăunătorilor *Spodoptera frugiperda* și *Manduca sexta* (Pacheco *et al.*, 2021). Au fost identificați patru repliconi (un nucleoid și trei megaplasmide). Cromozomul circular a avut mărimea de 5 659 016 bp cu un conținut de 36,2% GC (număr de acces NCBI GenBank CP076539). A fost prezis un număr total de 5 714 secvențe codificatoare, fiind stabilit că 4 746 de secvențe codifică proteine (Pacheco *et al.*, 2021). Cromozomul conținea, de asemenea, genele ce codifică ARNr 30S (10 repetiții ale genelor 23S, 16S și 5S ARNr), 104 ARNt, 145 ARN-uri diferite și un ARNm. Regiunile ADN legate de mobilitatea genetică au fost găsite de-a lungul cromozomului, printre acestea fiind relevate șapte regiuni profage mari și 89 de secvențe de inserție pentru transpo-

zaze (Tnp). Similar datelor anterioare nu a fost stabilită prezența unui sistem CRISPR funcțional (Zheng *et al.*, 2020; Pacheco *et al.*, 2021). Din megaplasmidele evidențiate, două conțineau multiple gene (plasmidele pGR340 și pGR157). Aceste gene au fost identificate ca 10 gene cry (cry1Ab, cry1Bb, cry1Da, cry1Fb, cry1Hb, cry1Id, cry1Ja, cry1Ka, cry1N), 2 gene (vip3Af și vip3Ag), două gene de toxine binare (vpa2Ac și vpb1Ca), cinci gene care codifică componentele toxinelor insecticide (Tc) și o genă asemănătoare cry1Bd trunchiată. Analiza proteomică a cristalelor parasporale ale tulpinii *Bt* GR007 a identificat prezența a opt proteine Cry. În rezultatul clonării acestor gene prin intermediul propriului promotor intrinsec, a fost demonstrată expresia a șapte proteine Cry (Pacheco *et al.*, 2021).

1.4. Particularitățile biologice și ecologice ale speciei *B. thuringiensis*

Ciclul vital al speciei *B. thuringiensis* este format din două etape succesive – diviziunea celulară vegetativă și faza de sporulare. Formarea unei noi celule are loc prin diviziune binară, celula vegetativă se divide în două celule-fiice echivalente prin formarea unui sept la mijloc. Sporularea, la rândul său implică diviziunea celulară asimetrică și se caracterizează prin șapte etape (figura 1.3) (Federici *et al.*, 2006; Osman *et al.*, 2015).

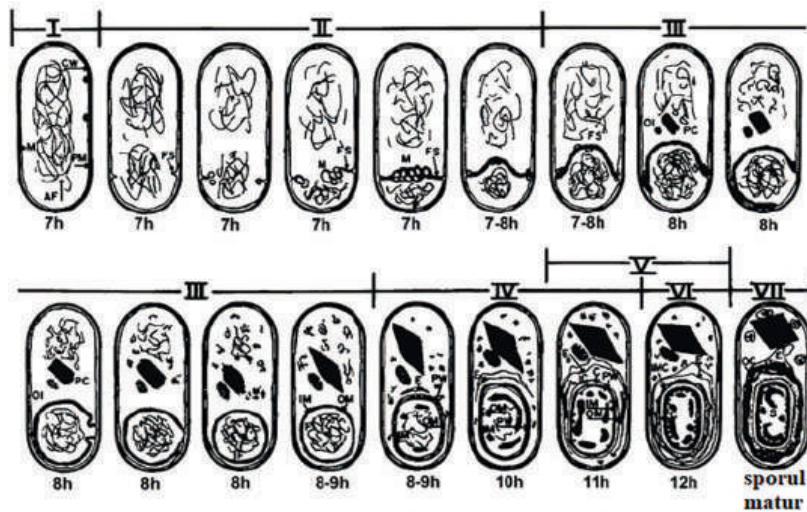


Fig. 1.3. Etapele de sporulare ale *B. thuringiensis*

(Sursa: Federici *et al.*, 2006)

În procesul de sporulare, bacteria parcurge succesiv următoarele etape: I: formarea filamentului axial; II: formarea septului, III: apariția cristalelor parasporale și formarea precursorului sporului, IV-VI: formarea peretelui celular primordial, cortexului, învelișurilor sporale, și VII: maturarea sporului și liza sporangiului. Tulpinile de *Bacillus thuringiensis* în mod obișnuit sunt izolate din mediu în formă de spori. Aceștia pot exista perioade îndelungate în sol. La apariția condițiilor prielnice de umiditate,

temperatură, nutrienți disponibili în mediul înconjurător, spori germinează (Travers *et al.*, 1987; Federici *et al.*, 2006). Dacă spori sunt ingerați de o potențială gazdă, factorii de virulență facilitează răspândirea sporilor din sistemul digestiv al insectei în hemolimfă. În hemolimfă, spori germinează, celula vegetativă se divide, asigurând răspândirea bacteriei în corpul gazdei. Dacă multiplicarea este intensă, gazdă piere de septicemie, bacteria continuă să se dividă până la epuizarea tuturor substanțelor nutritive din corpul gazdei. O astfel de strategie ecologică care implică exploatarea cât a gazdei vii atât și a rămășițelor sale se numește "necromană" (necromeny) și poate fi privită ca o formă specifică de interacțiune de tip simbiot (Malovichko *et al.*, 2019). Acest lucru a determinat faptul că această bacterie poate fi cu ușurință cultivată *in vitro* pe medii nutritive semisintetice (Marco, Porcar, 2012). Epizootiile cauzate de *Bt* se întâlnesc rar. Sporii speciei *Bt* sunt rezistenți, persistă un timp îndelungat în mediul ambiant și pot germina în sol și pe plante. Din aceste considerente specia *B. thuringiensis* se consideră un entomopatogen facultativ (Maagd *et al.*, 2003).

Tratamentul termic este cea mai comună procedură de izolare selectivă a tulpinilor de *Bacillus* spp. din mediul înconjurător. Astfel majoritatea cercetărilor s-au axat pe studierea endosporilor fiind exclusă cercetarea celulelor în faza vegetativă. Sporul fiind o structură de rezistență, majoritatea cercetărilor care au abordat ecologia speciei, *de facto* au relevat acumularea de spori într-un mediu, și mai puțin au evaluat rolul bacteriei în cadrul ecosistemului. Totuși estimarea prezenței unui număr semnificativ de spori ai speciei într-un anumit habitat ne oferă date indirecte cu privire la activitatea anterioară a bacteriei respective în mediul investigat. De exemplu, prima tulpină de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* a fost izolată dintr-un bazin stagnant din deșertul Negev din Israel. Pentru izolarea bacteriilor a fost prelevat noroi care conținea larve moarte de țânțari. Subspecia a fost izolată în stadiul de spor, iar bazinul acvatic servea drept rezervor natural. În perioadele secetoase activitatea vitală a bacteriei scădea, intrând în faza de sporulare, în perioadele umede reactivarea țânțarilor determina reactivarea bacteriei, creșterea și multiplicarea acesteia (Goldberg, Margalit, 1977; Martin *et al.*, 1989; Argolo-Filho, Loguercio, 2013).

Conform unor opinii științifice *B. thuringiensis* este considerat un microorganism de sol. Acest lucru se datorează faptului că o mare parte din tulpinile de *Bt* izolate de-a lungul anilor au fost obținute din acest mediu (Martin *et al.*, 1989; Cappello *et al.*, 2006; Fang *et al.*, 2011; Argolo-Filho, Loguercio, 2013). În aceste lucrări este abordat stilul de viață în mod general saprofit al bacteriilor din specia *B. thuringiensis*. Alți autori, însă, remarcă solul doar în calitate de rezervor natural în care spori *Bt* sunt păstrați, fiind constatată rata redusă de germinare a acestora în mediul respectiv. Procesul de germinare este facilitat de nutrienții specifici și valorile pH pe care solul nu le poate asigura (Akiba, 1986; West *et al.* 1985 a și b; Argolo-Filho, Loguercio, 2013). Cu toate acestea, cercetările axate pe colonizarea cadavrelor de insecte au arătat că *Bt* este de fapt necrotrof, ceea ce pare a fi o caracteristică importantă pentru a asigura proliferarea și dispersia bacteriilor în mediu. Într-un studiu a fost demonstrat că o insectă moartă infectată plasată pe suprafața unei frunze a provocat moartea a o treime din larvele

din jur (Naryanan, 2006). Într-o cercetare ulterioară a fost demonstrat faptul că stadiul necrotrofic reprezintă o parte componentă din ciclul vital complex al *Bt*. În cadrul etapelor respective sunt activate numeroase gene care determină modificări metabolice complexe. Aceste gene sunt activate în momentul morții gazdei (Dubois *et al.*, 2012). Modificările metabolice asigură bacteria cu aparatul enzimatic necesar pentru a coloniza cadavrul insectei gazdă. Sunt activate gene pentru producerea proteazelor, lipazelor, esterazelor și chitinazelor, care asigură valorificarea complexă a macronutrienților cât și proliferarea bacteriei în afara corpului gazdei prin degradarea cuticulei. Cu toate acestea, principalul factor de supraviețuire pentru *Bt* pare să fie „kurstakin”, o lipopeptidă cu activitate biosurfactantă. În cazul speciei *B. thuringiensis*, kurstakina ar putea fi implicată în ciclul vital necrotrof prin creșterea capacității de răspândire a populației bacteriene, prin promovarea formării biofilmurilor sau prin protejarea bacteriei contra răspunsului imun înăscut al gazdei. De asemenea acest lipopeptid ar putea favoriza bacteria față de microbiota insectei gazdă. Ultimele două funcții propuse se bazează pe capacitatea presupusă a lipopeptidei de a destabiliza membranele biologice atât ale procariotelor, cât și ale eucariotelor, mecanism similar cu cel al altor lipopeptide cunoscute (Gelis-Jeanvoine *et al.*, 2017). Stilul de viață pur saprotrofic nu a fost demonstrat elocvent pentru bacteria *Bt*, deși există studii care au abordat creșterea tulpinilor pe reziduuri fecale și nămoluri rezultate din epurarea apelor uzate (Ichimatsu *et al.*, 2000; Lachab *et al.*, 2001; Maheswaran *et al.*, 2010; Argolo-Filho, Loguercio, 2013).

A fost înaintată o variantă alternativă a ciclului vital pentru specia *B. thuringiensis* (figura 1.4, adaptat după Marco, Porcar, 2012). Acest ciclu combină de fapt două cicluri – primul presupune participarea insectei gazdă, iar al doilea nu depinde de aceasta. Plantele, reziduurile insectelor și solul reprezintă subcicluri integrate în ciclul de bază care parcurge cu participarea insectei gazdă.

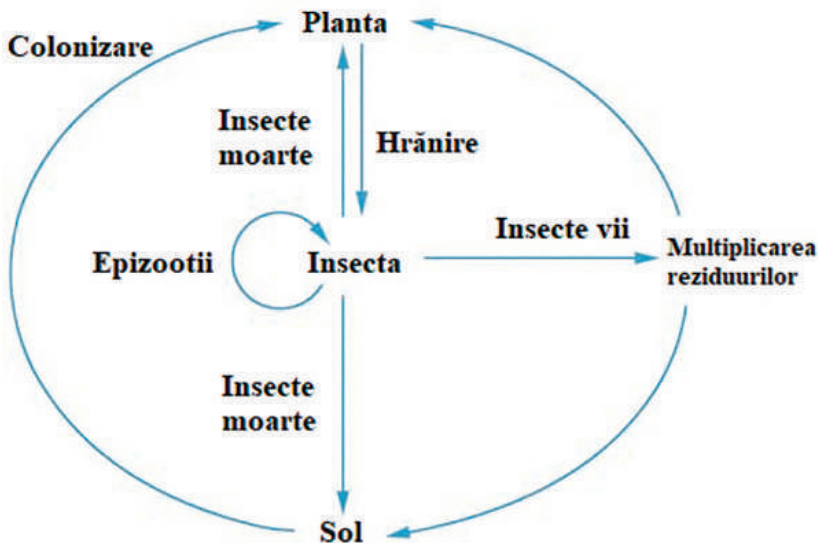


Fig. 1.4. Ciclul vital alternativ al bacteriei *Bacillus thuringiensis*
(Sursa: adaptat după Marco, Porcar, 2012)

Tulpinile din specia *Bacillus thuringiensis* sunt capabile să producă o serie de factori de virulență specializați care îi permit să infecteze gazdele nevertebrate. În ciuda nivelului înalt de interes față de această specie, au existat o serie de controverse și dezacorduri cu privire la nișa sa ecologică, modul în care își omoară gazdele și beneficiile de pe urma producției de toxine Cry. De asemenea au existat discuții cu privire la faptul dacă specia *Bacillus thuringiensis* constituie o specie reală care este un membru distinct din grupul *Bacillus cereus* (Argolo-Filho, Loguercio, 2013). Sunt evaluate critic ipotezele care susțin că *Bt* este un microorganism saprofit răspândit în sol, un comensal intestinal al gazdelor nevertebrate, un comensal al plantelor, sau un agent patogen specializat. Ipoteza patogenului specializat este susținută de cercetări la nivel de proteom și genom care relevă prezența unor adaptări metabolice care asigură liza celulară și utilizarea resurselor nutritive. *Bt* este capabilă de a infecta gazde specifice și de a se multiplica eficient în câmp fără a cauza epizootii. De asemenea tulpinile de *Bt* pot utiliza organismele vegetale pentru transport din rizosferă în filoplan. Toxinele *Bt* Cry și alți factori de virulență sunt cercetați intens în scopul confirmării sau infirmării diverselor ipoteze (Argolo-Filho, Loguercio, 2013).

În ciclul vital al bacteriei *Bt* transmiterea poate să se realizeze prin intermediul gazdei infectate care a murit de septicemie eliberând în mediu spori și toxine. Însă transmiterea poate avea lor și indirect, în calitate de vector servind plantele. Concentrațiile mari de spori și toxine bacteriene în filoplan pot descuraja activitatea fitofagilor. Totuși în condiții de câmp, concentrațiile mai mari de 10^3 spori/cm² de țesut vegetal sunt destul de rare (Collier *et al.*, 2005; Maduell *et al.*, 2008; Raymond *et al.*, 2010). În cazul utilizării *Bt* în calitate de agent de control biologic, este necesar de a facilita infectarea insectelor. În acest context este posibil de a utiliza mecanismele de transport al bacteriilor *Bt* din sol prin intermediul țesuturilor plantelor, prin xilem. Inocularea experimentală a semințelor sterilizate cu spori de *Bt* a demonstrat capacitatea bacteriei de a coloniza plantele direct din sol și de a co-exista cu organismul vegetal în calitate de endofiti Această proprietate a bacteriei poate fi utilizată de către agricultori în scopul asigurării prezenței bacteriei în câmp, în concentrații suficient de mari pentru a asigura controlul biologic al populațiilor de insecte dăunătoare. Sporii de *Bt* pot fi prelevați cu ușurință de pe suprafața foliară a plantelor, însă acest lucru nu sugerează numai decât specializarea tulpinilor *Bt* în calitate de epifiti. În comparație cu multe bacterii epifite, *Bt* proliferază slab pe suprafața frunzelor, sporulează ușor și persistă destul de bine atunci când umiditatea este scăzută (Bizzarri, Bishop, 2008; Maduell *et al.*, 2008; Raymond *et al.*, 2010; Argolo-Filho, Loguercio, 2013).

1.5. Potențialul insecticid al tulpinilor de *Bacillus thuringiensis*

În 1901, biologul japonez Shigetane Ishiwatari, a izolat prima dată bacteria *Bt*, cercetând cauza mortalității înalte la viermii de mătase, *Bombyx mori*. Ulterior, în 1915, Berliner a descoperit prezența unor cristale, însă rolul lor încă nu a fost elucidat (Bravo *et al.*, 2015; Nugroho *et al.*, 2021). În 1920 a apărut primele pesticide pe bază de *Bt*. În Franța, în 1938, a apărut pe piață primul produs comercial, care era utilizat contra moliilor de făină, *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera). Doar în 1956, a fost descoperit că principala activitate insecticidă contra lepidopterelor se datorează proteinelor cristaline (Hannay, 1956). În comparație cu Europa, SUA abia în 1956 a început utilizarea acestor pesticide în scopuri comerciale, dar produsele nu au avut succes din cauza formulărilor ineficiente. În anii 1980, utilizarea preparatelor pe bază de *Bt* a avut o creștere la nivel mondial. Acest avânt a fost determinat de apariția rezistenței insectelor la pesticidele chimice (Milner, 1994).

În anul 1983 a fost elaborată o clasificare a subspeciilor *Bt* bazată pe spectrul de gazde al bacteriei și au propus separarea subspeciilor în patotipuri. În lucrarea sa autorii propun de include în patotipul A subspeciile patogene pentru reprezentanții ordinului Lepidoptera; în patotipul B – cele patogene pentru reprezentanții ordinului Diptera, iar în patotipul C – subspeciile cu activitate insecticidă împotriva reprezentanților ordinului Coleoptera. În cele din urmă, această clasificare propusă s-a dovedit a fi ineficientă deoarece nu aborda clasificarea subspeciilor patogene pentru două sau mai multe ordine de insecte (Tanada, Kaya, 1992).

În scopul relevării patogenității diferitor subspecii *Bt* și susceptibilității diferitor specii de insecte față de aceste tulpini au fost selectate subspecii *Bt* în calitate de standard de referință (ex. *kurstaki* pentru lepidoptere, *israelensis* pentru diptere acvatice și *tenebrionis* pentru coleoptere) (Tanada, Kaya, 1992) (tabelul 1.5). Ulterior cercetările continue au dus la izolarea a numeroase noi subspecii de *Bt*. În literatura de specialitate se întâlnesc și alte denumiri pentru subspecie, cum ar fi, varietate, serotip, serovar, biovar, patovar și cristovar.

Tabelul 1.4. Izolarea noilor subspecii de *B. thuringiensis*

Ordin	Subspecia <i>Bt</i>	Gazda	Autorul, anul
Lepidoptera	<i>kurstaki</i>	<i>Ephestia kuehniella</i>	Kurstak, 1962
	<i>darmstadiensis</i>	<i>Galleria mellonella</i>	Krieg <i>et al.</i> , 1968
	<i>thompsoni</i>	<i>Galleria mellonella</i>	de Barjac, Bonnefoi, 1968
Diptera	<i>israelensis</i>	Larve de țânțari	Goldberg, Margalit, 1977; de Barjac, 1978
Coleoptera	<i>tenebrionis</i>	<i>Tenebrio molitor</i>	Krieg <i>et al.</i> , 1983

În mod tradițional, similar cu alte specii din genul *Bacillus*, *B. thuringiensis* a fost clasificat în baza proprietăților morfologice celulare și culturale, biochimice și genetice. În 1958 Heimpel și Angus au elaborat o schemă de identificare pentru *Bt* care lua în considerare particularitățile morfologice și biochimice distinctive ale acesteia. Clasificarea *Bt* bazată pe analiza serologică a flagelului a fost introdusă în anii 1960 de către H. de Barjac, iar ulterior a fost completată de către caracterizarea particularităților morfologice și biochimice (Jakhar *et al.*, 2017; tabelul Anexa 1).

În cazul identificării unei tulpini care prezintă un antigen flagelar diferit de celelalte tulpini descrise, acestei tulpini de *Bt* i se atribuie un număr de antigen și o denumire de serovarietate nouă (Sansinenea, 2012; Jakhar *et al.*, 2017).

Cercetările realizate în ultimii ani au completat cunoștințele despre tulpinile *Bt* și variațiile acestora. A fost constatat că în cadrul unui serotip se întâlnesc mai multe variații iar anumite particularități biochimice nu întotdeauna se referă la un serotip specific. Numeroase cercetări au abordat clasificarea *Bt* în subspecii, folosind diferite criterii cum ar fi serotiparea, susceptibilitatea la fagi și profilurile plasmidice, ceea ce a dus la evidențierea a aproximativ 100 subspecii (Sanahuja *et al.*, 2011).

Patogenitatea și virulența sunt doi parametri importanți în experimentele de laborator privind susceptibilitatea dăunătorilor țintă la entomopatogenii bacterieni. Cu toate acestea, deseori cercetările de laborator vizează virulența tulpinilor fără de a verifica inițial dacă tulpina în cauză este patogenă pentru insecta țintă. De asemenea, este eronat de a compara 2 tulpini utilizând expresiile „mai patogen” sau „mai puțin patogen” (Rabinovitch *et al.*, 2017). Screening-ul colecțiilor de tulpini bacteriene la prezența celor patogene și identificarea tulpinilor cu virulență sporită este cel mai important pas în dezvoltarea biopesticidelor. Pe lângă patogenitate și virulență, cei doi parametri evaluați frecvent, în rezultatul experiențelor trebuie să fie elucidate efectele subletale ale tulpinilor de bacterii asupra gazdelor sale. De exemplu, insectele care au supraviețuit infecției pot avea procese fiziologice, biochimice alterate, prolificitatea redusă sau poate fi constatată absența reproducerii (Rabinovitch *et al.*, 2017).

În procesul de patogeneză bacteria *B. thuringiensis* abordează mai multe strategii de virulență (Argôlo-Filho, Loguercio, 2013). Printre acestea pot fi evidențiate:

1. Producerea toxinelor – degradarea membranei intestinale și eliberarea nutrienților care favorizează germinarea sporului și colonizarea ulterioară a celulelor intestinale. Pătrunderea în hemolimfă și provocarea septicemiei.

2. Rezistența antimicrobiană – formarea rezistenței la substanțe antimicrobiene produse de către gazdă și microbiota intestinală care permite colonizarea.

3. Producerea de substanțe antimicrobiene – scăderea concurenței pentru spațiu și nutrienți și reducerea producției de compuși antimicrobieni de către microbiota intestinală.

4. Peristaltismul și reducerea hrănirii – se reduce eliminarea celulelor *Bt* din intestin.

5. Producerea enzimelor degradante – degradarea agenților antimicrobieni din gazdă și facilitarea colonizării intestinului. Toxicitate directă în unele cazuri.

6. Rezistența sistemului imunitar – prevenirea fagocitozei și rezistența la compuși antimicrobieni, enzime digestive, pH și specii reactive de oxigen.

Modul de acțiune al *B. thuringiensis* asupra insectelor depinde de doi factori: specificitatea microorganismului și susceptibilitatea la infecție a insectei gazdă. În 1905 Ishiwata a presupus că intoxicațiile la insecte sunt cauzate de toxine, deoarece insectele pier înainte ca bacilul să se multiplice. În 1915 Berliner a raportat prezența unor incluziuni parasporale, însă rolul lor a fost descoperit mai târziu. Patogenitatea *Bt* este cauzată de prezența toxinelor în culturile sporulate, dar nu și în cele în stadiul vegetativ de creștere (Tanada, Kaya, 1992). De asemenea s-a constatat că toxinele nu erau exotoxine, deoarece ele nu au fost depistate în filtratul culturilor (Sansinenea, 2012).

În anul 1967, a fost propus de a denumi toxinele *Bt* după alfabetul Grecesc. La acel moment au fost identificate patru toxine: α -exotoxina, β -exotoxina, γ -exotoxina și δ -endotoxina. În 1979 Krieg și Lysenko au modificat această clasificare, excluzând γ -exotoxina și au adăugat alți factori proteici de virulență, cum ar fi hemolizina, proteazele, lecitinazele și chitinazele (Tanada, Kaya, 1992).

În decursul fazei de sporulare *B. thuringiensis* produce două tipuri de toxine parasporale: toxinele cristaline (Cry) și toxinele citolitice (Cyt) (Xu *et al.*, 2014), de asemenea cunoscute ca δ -endotoxine (Palma *et al.*, 2014). Nomenclatura δ -endotoxinelor a fost concepută în anul 1989, iar în anul 1993 a fost inițiat comitetul de nomenclatură al delta-endotoxinelor. Nomenclatura actuală se bazează exclusiv pe succesiunea de aminoacizi și facilitează procesul de identificare excluzând necesitatea de a testa acțiunea toxinelor asupra insectelor țintă (Crickmore *et al.*, 2018).

Actualmente *Bacillus thuringiensis*, precum și toxinele Cry sintetizate de această specie de bacterii, sunt bine cunoscute fiind utilizate în protecția plantelor ca alternativă la insecticidele sintetice. Proteinele Cry sunt studiate intens datorită faptului că conferă proprietăți insecticide bacteriei *Bacillus thuringiensis* și culturilor modificate genetic prin inserția acestor gene. După ingestie, aceste proteine formează pori în celulele epiteliale ale intestinului mediu ale insectelor, ducând la liza celulară și decesul insectei (Turnbull, 1996; Valtierra de Luis *et al.*, 2020). Pe lângă proteinele Cry, tulpinile de *Bt* pot sintetiza proteine numite Cyt, care au activitate citolitică *in vitro* și, *in vivo*, specificitate de acțiune față de diptere (Hofte, Whithely, 1989). Toxinele Cyt sunt capabile să afecteze celulele intestinului mijlociu ale insectelor și pot crește activitatea insecticidă a anumitor toxine Cry (Koni, Ellar, 1994).

O listă actualizată de gene *Bt* care codifică proteine cu activitate împotriva insectelor este prezentată în Anexa 2 (Turnbull, 1996; Garcia-Robles *et al.*, 2001, Wei *et al.*, 2003, Palma *et al.*, 2014, Tian *et al.*, 2017, Crickmore *et al.*, 2018; Valtierra de Luis *et al.*, 2020; Plata-Rueda *et al.*, 2020). δ – endotoxinele manifestă toxicitate specifică dar semnificativă asupra mai multor ordine de insecte, cum ar fi Coleoptera, Diptera, Lepidoptera, Hemiptera și Hymenoptera (Xu *et al.*, 2014), dar și asupra unor nematode și gastropode. De asemenea a fost înregistrată toxicitate asupra celulelor canceroase umane de diferită origine (figura 1.5, Palma *et al.*, 2014).

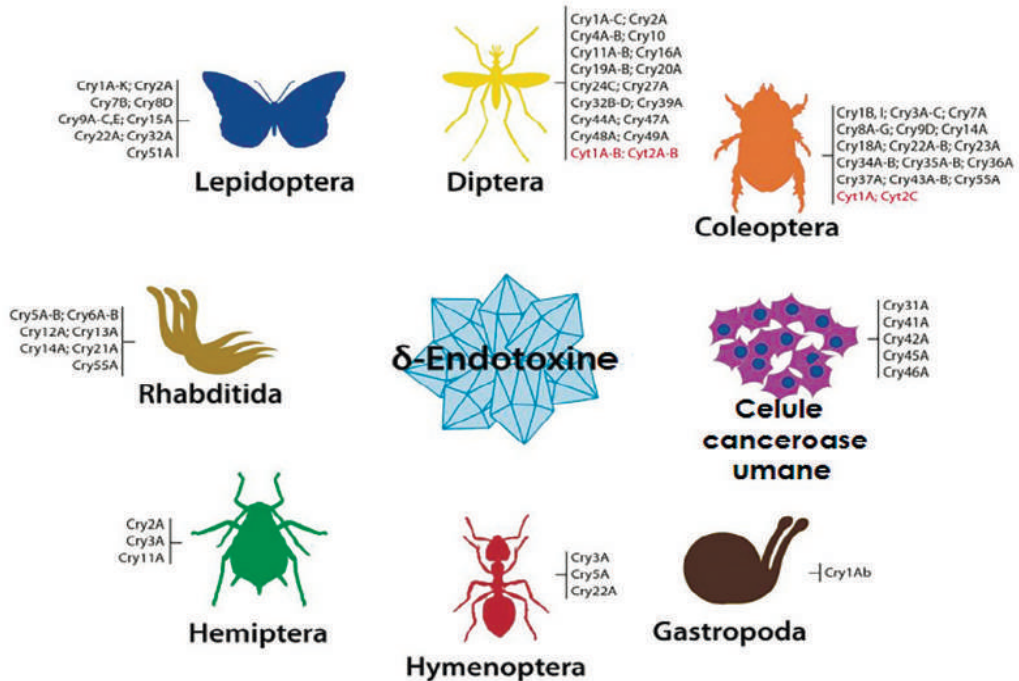


Fig. 1.5. Spectrul de acțiune al δ -endotoxinelor bacteriilor din specia *B. thuringiensis* (adaptat după Palma *et al.*, 2014)

În dependență de compoziția proteică cristalele parasporale pot avea diferite forme: bipiramidală, piramidală, cuboidală, romboidală plată, sferică sau dreptunghiulară. Cea mai comună formă a cristalului este cea bipiramidală, dar se pot întâlni și două morfotipuri într-o celulă (WHO, 1999). Forma bipiramidală tipică este asociată cu proteinele Cry 1, incluziunile cuboidale sunt asociate cu proteinele Cry 2 și deseori asociate cu cristalele bipirimidale, cristalele amorfe și compuse sunt asociate cu proteinele Cry 4 și Cyt, iar cristalele plate și pătrate sunt asociate cu proteinele Cry 3 (Mukhija, Khaana, 2018). Cristalele pot conține una sau mai multe δ -endotoxine cu masa moleculară cuprinsă între 30 și 140 kDa. Proteinele cristaline sunt insolubile în apă dar se dizolvă în mediu alcalin și sunt transformate în peptide toxice după ingestia de către dăunătorii țintă (Rabinovitch *et al.*, 2017).

Proteinele Cry aparțin unei clase de toxine bacteriene numite toxine formatoare de pori (PFT-Protein Forming Toxins). Principalele grupuri de PFT sunt 1) Toxine α -helix, unde regiunea α -helix formează pori transmembranari, și 2) toxine β -barell, care formează β -structuri (Parker, Feil, 2005). Membrii familiei cu trei domenii, grupul mai mare de proteine Cry, sunt molecule globulare care conțin trei domenii structurale conectate prin linkeri unici. O caracteristică particulară a membrilor acestei familii este prezența protoxinelor cu două lungimi diferite. Un grup mare de protoxine este de aproximativ de două ori mai lung decât majoritatea toxinelor.

Extensia C-terminală găsită în protoxinele lungi este dispensabilă pentru toxicitate și se crede că joacă un rol în formarea corpurilor de incluziune cristalină în interiorul bacteriei (Maagd *et al.*, 2001).

Prin intermediul cristalografiei cu raze X, au fost determinate proteine diferite Cry cu structură diferită și cu trei domenii structurale (Grochulski *et al.*, 1995; Morse *et al.*, 2001; Galitsky *et al.*, 2001; Boonserm *et al.*, 2005; 2006). Domeniul N-terminal, sau domeniul I, este un complex de șapte α helixuri în care elicea centrală- $\alpha 5$ este hidrofobă și este înconjurată de alte șase elice amfilile; iar acest domeniu eliocoidal este responsabil pentru inserția membranei și formarea porilor. Domeniul II constă din trei spirale β anti-paralele cu regiuni bucle expuse, iar domeniul III este un β -sandwich (Li *et al.*, 1991; Grochulski *et al.*, 1995; Morse *et al.*, 2001; Galitsky *et al.*, 2001; Boonserm *et al.*, 2005; 2006). Regiunile expuse din domeniul II și domeniul III sunt implicate în legarea toxinei de receptorul celulei (Bravo *et al.*, 2005).

Ațiunea toxinelor Cry este un proces complex și cuprinde mai multe etape. În literatura de specialitate sunt descrise mai multe modele care explică modul de acțiune al toxinelor Cry (figura 16, Ibrahim *et al.*, 2010; Jurat-Fuentes, 2021).

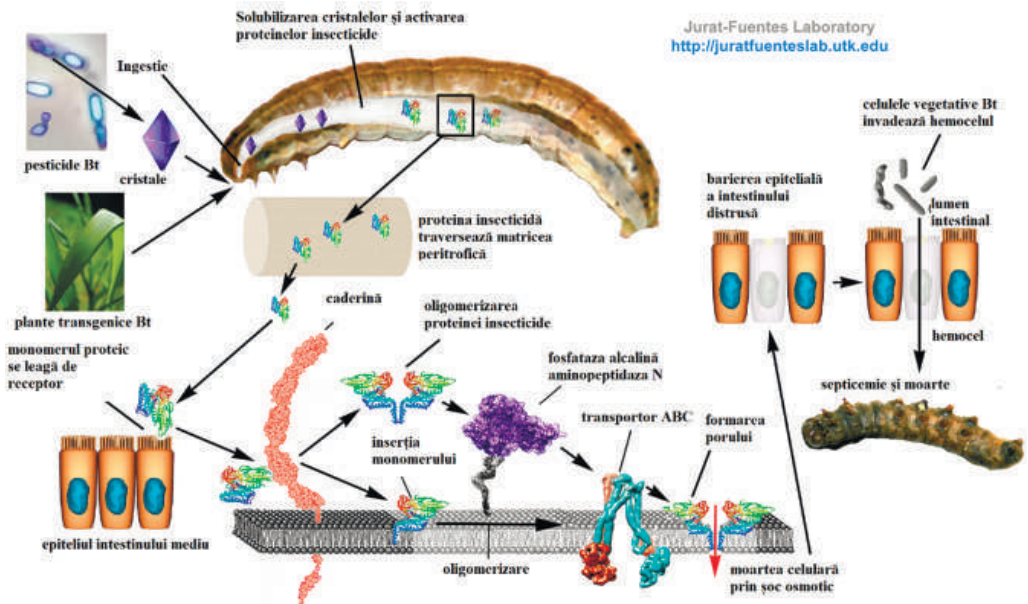


Fig. 1.6. Mecanismul de acțiune al Cry toxinelor asupra larvelor

(Sursa: adaptat după Dr. Juan Luis Jurat-Fuentes, 2021)

Conform primului model propus inițial are loc ingestia proteinelor Cry de către insecta țintă. După ingestie cristalul se dizolvă în pH-ul predominant alcalin din intestinul larvei, eliberând polipeptide protoxice care sunt ulterior activate de către enzimele proteolitice (Manasherob *et al.*, 1998). Valoarea pH din intestinul insectelor facilitează activitatea specifică a toxinelor Cry. Unele toxine se activează în condiții alcaline (CryIIA), iar altele se activează în condiții de pH neutru spre acid (CryIb).

Clivarea ulterioară a toxinelor Cry este o etapă crucială în activarea toxinei, de la care depinde specificitatea acesteia pentru diferite insecte (Schünemann *et al.*, 2014). Proteazele din intestinul larvei scindează proteinele solubile rezultând un nucleu compus din trei domenii cu masa moleculară 60 kDa, care este rezistent la proteaze (Maagd *et al.*, 2003). Primul domeniu formează porul, iar al doilea și al treilea domenii participă la legarea cu receptorii din celulele intestinale (Bravo *et al.*, 2004).

Conform celui de al doilea model propus toxina Cry ucide celula prin liza osmotică (Zhang *et al.*, 2006). Monomerul toxinei se leagă de receptorul de cadherină BT-R1 și activează transducția de semnal dependentă de ionii Mg^{2+} care duce la moartea celulei. Modelul demonstrează că în celulele vii, oligomerii Cry1Ab, integrați în membrana celulară nu se corelează cu citotoxicitatea. De fapt, acțiunea toxinei este mult mai complicată decât liza osmotică produsă de toxină. Acțiunea toxinei Cry este un proces complex, dinamic, care implică legarea univalentă a toxinei la motivul structural foarte conservat în receptorul de cadherină BT-R1. Ulterior se declanșează o cascadă de evenimente care duce la moartea programată a celulelor, denumită oncoză. Legarea toxinei Cry1Ab la receptorul BT-R1 produce un semnal molecular care stimulează proteina G heterotrimerică și adenililciclaza cu o creștere dramatică a producției de cAMP. cAMP activează proteina kinaza A, ceea ce duce la o serie de modificări celulare, care include rearanjarea citoscheletului și fluxul de ioni. Accelerarea acestei căi de mesagerie modifică chimia celulei și determină moartea celulelor. Mai mult decât atât, mecanismul de ucidere presupune promovarea de către toxină a translocării exocitotice a BT-R1 de la veziculele membranei intracelulare la membrana celulară. Mișcarea receptorului este mediat de transducția semnalului indus de toxină, iar amplificarea acestei semnalizări este corelată direct cu moartea celulară (Ibrahim *et al.*, 2010; Adang *et al.*, 2014).

Majoritatea protoxinelor Cry sunt proteine insolubile și inactivate, având forma de incluziuni cristalice toxice. După ce proteinele au fost ingerate de larvele insectelor, cristalele acestora sunt solubilizate în mediul alcalin al intestinului și sunt activate de proteaze ducând la formarea unor peptide rezistente la proteaze de 60-70 kDa (Tojo, Aizawa, 1983; Bravo *et al.*, 2004; Pardo-Lopez *et al.*, 2013; Sena de Silva *et al.*, 2020). Activarea toxinelor implică îndepărtarea proteolitică a unei peptide N-terminale, de 25-30 de aminoacizi pentru toxinele Cry1, 58 de aminoacizi pentru Cry3A și 49 pentru Cry2Aa) și aproximativ jumătate din proteina rămasă de la capătul C-terminal în cazul proteinelor Cry lungi.

În figura 1.7 este demonstrată lungimea relativă a protoxinelor inactivate și toxina activă (regiunile hașurate). Săgețile punctuate reprezintă regiunea de clivare intramoleculară, iar celelalte săgeți clivarea pentru activarea toxinelor. De exemplu, clivarea în regiunea 51, la Cry1A, a determinat pierderea regiunii α -1-helix, și formarea pre-porului. La Cry4B clivarea a determinat formarea a două fragmente de 18 și 46 kDa, iar la Cry11A a dus la formarea fragmentelor cu greutatea de 34 și 32 kDa (de Maagd *et al.*, 2001; Bravo *et al.*, 2005).

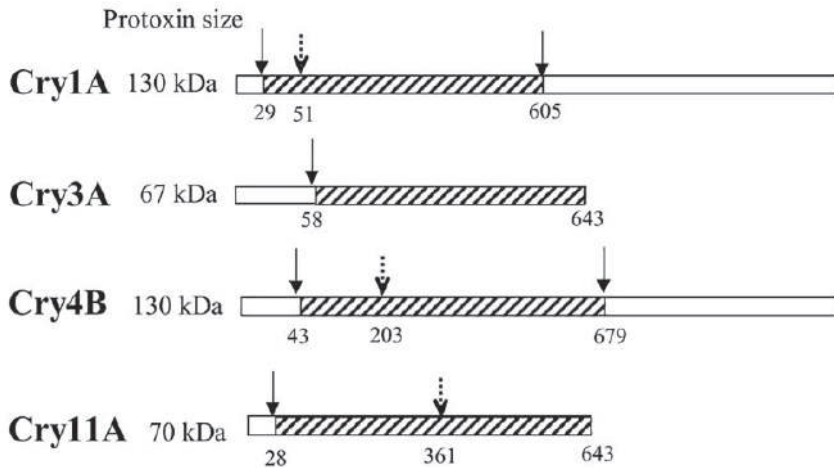


Fig. 1.7. Reprezentarea schematică a structurii și situsurilor de clivare a toxinelor Cry de către proteaze (Sursa: Bravo *et al.*, 2008)

Modul de acțiune al proteinelor Cry produse de *Bt* este un proces complex care implică interacțiunea acestor toxine cu diferiți receptori din epiteliul intestinului mediu al larvelor, declanșând oligomerizarea toxinelor și inserarea oligomerului în membrană, și rezultând formarea porilor în membrana celulelor intestinului mediu și moartea insectelor (Vachon *et al.*, 2012; Sena de Silva *et al.*, 2020).

Pentru toxinele Cry1A, la diferite specii de lepidoptere, au fost caracterizate cel puțin patru proteine receptori membranari. Printre acestea au fost relevate o proteină asemănătoare caderinei (CADR), o aminopeptidază-N ancorată cu glicozilfosfatidil-inozitol (GPI), o fosfatază alcalină ancorată cu GPI (ALP) și un glicoconjugat de 270 kDa (Knight *et al.*, 1994; Vadlamudi *et al.*, 1995; Valaitis *et al.*, 2001; Jurat-Fuentes, Adang, 2004; Bravo *et al.*, 2007; Bel *et al.*, 2019). În figura 1.8 este prezentă o reprezentare a celor patru tipuri de molecule presupuse de receptor Cry1A caracterizate.

Caderinele (CADR) sunt proteine transmembranare cu un domeniu citoplasmatic și un ectodomeniu extracelular (Vadlamudi *et al.*, 1995). Interacțiunea toxinelor Cry cu receptorul *Bt-R₁* este destul de complexă, implicând cel puțin trei epitopi de legare între cele două molecule. În ceea ce privește APN, toxina Cry1Ac se leagă de receptorul APN prin intermediul domeniului III care recunoaște în mod specific fragmentele N-acetilgalactozamină (GalNAc) spre deosebire de Cry1Aa și Cry1Ab care nu prezintă capacități de legare a GalNAc (Masson *et al.*, 1995).

În cazul receptorului ALP, s-a demonstrat că în linia rezistentă la *H. virescens* YHD2 o parte din fenotipul rezistent la Cry1Ac se datorează mutațiilor care scad producția de receptor ALP ancorat la GPI (Jurat-Fuentes, Adang, 2004). La *M. sexta*, analiza proteomică a proteinelor care leagă BBMV Cry1Ac a dezvăluit, de asemenea, ALP în calitate de posibilă moleculă receptor (McNall, Adang, 2003).

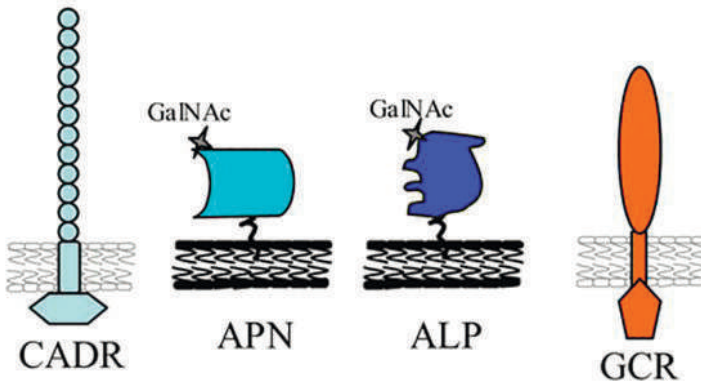


Fig. 1.8. Reprezentarea schematică a moleculelor receptor ale proteinelor Cry1A. (Sursa: Bravo *et al.*, 2008)

Mai multe studii au identificat la diferite insecte din ordinul Lepidoptera prezența unor potențiali receptori pentru toxinele Cry, inclusiv: 1) proteine similare caderinelor (CAD), 2) aminopeptidaze ancorate de glicozil-fosfatidil-inozitol (GPI) (APN), 3) fosfataze alcaline (ALP), 4) policalină, un glicoconjugat de 270 kDa, 5) o proteină de 250 kDa numită P252; 6) o α -amilază, și 7) membri ai familiei de proteine transportoare a casetei de legare ATP (ABC), cum ar fi transportoarele ABCC2, ABCC3 și ABCA2. Cu toate acestea, este posibil ca mai multe proteine necunoscute încă să fie implicate în mecanismele de acțiune ale proteinelor Cry (Jurat-Fuentes, Adang, 2004; Tay *et al.*, 2015; Shabbir *et al.*, 2020; Sena de Silva *et al.*, 2020).

Virulența tulpinilor de *Bt* este determinată nu doar de producerea de toxine Cry dar și de un șir de factori proteici și neproteici implicați în procesul de patogeneză. Prima barieră pe care sporii ingerați de către insectă trebuie să o depășească este reprezentată de către o membrană peritrofică constituită din fibre reticulate de chitină, numite peritrofine. Această structură izolează suprafața apicală a epitelocitelor intestinale de nutrienții ingerați, asigurând astfel protecție atât împotriva leziunilor mecanice cât și împotriva absorbției patogenilor. În funcție de conținutul și biogeneza lor, structurile peritrofice sunt divizate în două tipuri distincte. Membranele de tip I sunt structuri temporare care se formează direct în jurul bolului alimentar, fiind digerate. La rândul său, membranele peritrofice de tip II persistă, fiind atașate de pereții intestinului în secțiunea anterioară. În timp ce membranele peritrofice de tip I sunt comune pentru speciile ordinelor Blattodea, Orthoptera, Coleoptera, Hymenoptera și Diptera, membranele de tip II se întâlnesc doar la speciile ordinelor Diptera și Lepidoptera. Insectele hematofage din ordinul Diptera, cum ar fi musculițele negre (Diptera: Simuliidae) și fânțarii (Diptera: Culicidae), la care tipul de membrane peritrofice poate trece de la II la I în decursul metamorfozei datorită trecerii de la dieta solidă a larvelor la hrănirea lichidă a speciilor mature (Malovichko *et al.*, 2019).

Pe lângă membranele peritrofice solide, multe insecte produc un gel peritrofic semi-lichid lipsit de chitină care poate susține o structură asemănătoare gelului datorită unei peritrofine specifice și conținutului de mucină. O astfel de strategie este exploatată de către gărgărițele de fasole (Coleoptera: Bruchidae) care se hrănesc cu semințele de leguminoase ce conțin lectine. La speciile din ordinele Hemiptera și Thysanoptera, compartimentul peritrofic este reprezentat de către o structură glicoproteică cunoscută sub numele de membrană perimicrovilară (Malovichko *et al.*, 2019).

Un mod utilizat frecvent pentru a penetra membranele ce conțin chitină este producerea de chitinaze, enzime hidrolitice, care au capacitatea să scindeze chitina, un grup de polimeri N-acetil D-glucozamine, prin hidroliza legăturilor β -(1 \rightarrow 4) –glicozide. În baza modului lor de acțiune, chitinazele sunt clasificate în endochitinaze, care scindează chitina prin site-uri interne aleatorii, rezultând di-acetilchitobioze, chitotrioze și chitotetraoze, și exochitinaze care clivează chitooligozaharidele din moleculele terminale. Afinitatea substratului chitinazei este asigurată de către prezența modulelor speciale care leagă chitina. Aceste module posedă o varietate structurală vastă, afinitatea de legare cu chitină a cărora este asociată cu reziduurile de triptofan (Malovichko *et al.*, 2019).

După penetrarea membranei peritrofice bogate în chitină, celulele *Bt* trebuie să depășească mai multe bariere impregnate cu diferiți factori proteici, cum ar fi stratul de mucină, lamina bazală și cadherinele. Pentru a realiza această penetrare *Bt* utilizează metaloproteazele care reprezintă niște enzime capabile să hidrolizeze legăturile peptidice în prezența unuia sau mai multor ioni de metale (cel mai frecvent ai zincului). Metaloproteazele pot hidroliza nu doar proteinele gazdei, dar și propriile toxine (Malovichko *et al.*, 2019).

Multe tulpini de *B. thuringiensis* și *B. subtilis* au capacitatea de a produce zwittermicina A (ZwA), care reprezintă un antibiotic. ZwA afectează un spectru larg de bacterii, precum și unele eucariote – ciuperci și oomicete fitopatogene (Malovichko *et al.*, 2019).

Un alt factor de virulență, β -exotoxina – thuringiensina este produsă în timpul fazei vegetative de creștere și este secretată în mediu. β -exotoxina este cea mai bine studiată exotoxină, care reprezintă un nucleotid compus din adenină, glucoză și acid allaric și este stabilă la temperaturi. β -exotoxina inhibă ARN polimerazele, prin urmare este toxică pentru majoritatea insectelor și vertebratelor (Lacey, Kaya, 2007). Nu toate subspeciile *Bt* produc thuringiensina (Tanada, Kaya, 1992). Capacitatea de a produce β -exotoxina este mai mult o proprietate caracteristică tulpinii decât serotipului. Tulpinile *Bt* care au capacitatea de a produce β -exotoxina aparțin subspeciilor: *darmstadiensis*, *kurstaki*, *galleriae*, *morrisoni*, *thuringiensis* și *tolworthi*, *kenyae*, *sotto*, *aizawai*, *toumanoffi*, *thompsoni* și *tenebrionis* (Tanada, Kaya, 1992; Lacey, Kaya, 2007; Doolotkeldieva *et al.* 2018; McCullough *et al.*, 2021). Această toxină cauzează mutații care duc la malformații la insectele susceptibile care ulterior pot fi transmise generațiilor descendente. Beta-exotoxinele sunt toxice pentru

un număr mare de insecte, printre care albinele, muștele, țânțarii, lăcuste, termite și multe lepidoptere. De asemenea sunt toxice pentru unele afide și unele vertebrate (Perry *et al.*, 1998).

De asemenea în decursul fazei vegetative de creștere unele tulpini *Bt* produc toxine care sunt secretate în mediu și s-au dovedit a fi toxice pentru unele insecte, extinzând spectrul de gazde al acestei bacterii (Schnepf *et al.*, 1998). Proteinele secretate constituie două clase care au fost divizate în proteine insecticide vegetative (Vip) și proteine insecticide secretate (Sip).

Comitetul de nomenclatură a toxinelor *Bt* a identificat și clasificat proteinele Vip în patru familii: Vip1, Vip2, Vip3 și respectiv Vip4 (Crickmore *et al.*, 2018). Vip1 și Vip2 constituie o toxină cu proprietăți insecticide sporite asupra unor coleoptere și asupra *Aphis gossypii* (Hemiptera). Proteinele Vip3 sunt constituite dintr-un singur lanț și posedă proprietăți insecticide asupra mai multor specii al ordinului Lepidoptera (Palma *et al.*, 2014). Una din proteinele Sip cercetare este Sip1Aa, care a demonstrat activitate insecticidă împotriva larvelor de coleoptere (Donovan *et al.*, 2006). Pe lângă acestea, *Bt* produce și alte toxine, printre care α -exotoxina, β -exotoxina, hemolizine, enterotoxinele, fosfolipazele și chitinazele (Schunemann *et al.*, 2014).

α -exotoxina este o exotoxină termolabilă produsă de unele subspecii de *B. thuringiensis* și *B. cereus* și este extrem de toxică pentru multe specii de insecte. De obicei această toxină este produsă de către celule în faza vegetativă de creștere și nu este prezentă în culturile sporulate. Această substanță manifestă activitate toxică asupra unu spectru larg de insecte, printre care fiind raportate și efecte nedorite asupra albinelor (Perry *et al.*, 1998).

Fosfolipaza C sau lecitinaza este o enzimă termolabilă toxică pentru insecte. Inițial fosfolipaza C a fost considerată o α -exotoxină, însă ulterior s-a dovedit că subspeciile lecitinaz-negative produc α -exotoxina. De asemenea lecitinaza este sintetizată și de către alte bacterii, cum ar fi speciile *Pseudomonas chlororaphis* și *Clostridium perfringes*, însă masa moleculară a acestei enzime variază la diferite specii de bacterii (Tanada, Kaya, 1992).

2

**PREMISE DE UTILIZARE A AGENȚILOR
BACTERIENI ÎN CONTROLUL BIOLÓGIC
AL DĂUNĂTORILOR**

Insectele sunt unii din cei mai importanți dăunători agricoli. Ele au un impact major asupra producției agricole, și alături de alte organisme dăunătoare cauzează o reducere cu cel puțin 40% a recoltelor la nivel mondial (Mantzoukas, Eliopoulos, 2020; Deka *et al.*, 2021). Coleopterele cu cca 350 mii de specii și lepidopterele, cu cca 180 mii descrise la moment sunt două cele mai numeroase ordine de animale din lumea vie, cu cel mai mare număr de dăunători.

Hrănindu-se cu organele vegetative și generative ale plantelor, insectele cauzează deteriorarea culturilor agricole fiind asociate cu pierderi economice estimate la 470 miliarde dolari SUA anual (Mantzoukas, Eliopoulos, 2020). Pentru a reduce aceste pierderi și combate insectele dăunătoare se utilizează pe larg insecticidele chimice (Sharma *et al.*, 2019). Însă utilizarea extensivă și intensivă a acestora a dus la apariția numeroaselor probleme asociate cu creșterea rezistenței dăunătorilor la aceste preparate, estimată la cca 80% din toate cazurile cercetate (Sharma *et al.*, 2019). Drept consecință în atenția comunității științifice și a utilizatorilor au fost readuse metodele biologice de control al dăunătorilor, și anume, utilizarea microorganismelor entomopatogene. Tulpinile de microorganisme entomopatogene fac parte din ecosistemele agricole și sunt elemente importante de control natural al populațiilor de insecte (Roy, Cottrell, 2008).

Pomicultură este un sistem intensiv de producție agricolă care devine mai sofisticat cu fiecare an care trece. În regiunea temperată, sunt cultivate diverse specii de pomi fructiferi, inclusiv măr, păr, cireș și prun. În majoritatea țărilor europene, pomii și arbuștii fructiferi au o importanță majoră din punct de vedere economic. Fructele sunt unul dintre cele mai apreciate și esențiale alimente în realizarea unei alimentații corecte. Cultura pomilor fructiferi este și va rămâne o ramură prioritară a agriculturii Republicii Moldova cu pondere semnificativă în economia și exportul țării. Acest lucru se datorează condițiilor climatice favorabile, eficienței economice ridicate și solurilor fertile exploatate mai eficient prin creșterea speciilor de pomi fructiferi. Conform datelor din ultimii ani producția de fructe, nuci și pomușoare a înregistrat o creștere în ponderea din producția agricolă totală. Ramura pomicolă a generat până la 16% din venitul net obținut de la comercializarea producției agricole (Dobrovolschi, 2018).

Un alt grup de plante importante economic atât pentru Republica Moldova cât și pentru alte state sunt leguminoasele (Fabaceae sau Leguminosae). Acestea constituie o sursă importantă de proteine de origine vegetală. De asemenea unele culturi, cum ar fi soia (*Glycine* Willd.) furnizează cantități importante de lipide. Unii reprezentanți din familia Fabaceae sunt cultivați în calitate de plante furajere și biofertilizanți (de ex. trifoiul – *Trifolium* L., și lucerna – *Medicago* L.). Unele specii sunt

folosite ca sursă de fibre, condimente și în calitate de plante decorative (Bennett, 2011). În Republica Moldova, conform datelor înregistrate de Biroul Național de Statistică, în perioada anilor 2010-2020, suprafața terenurilor agricole cultivate cu leguminoase pentru boabe a oscilat între 22-41 mii ha, iar suprafața terenurilor ocupate de plante furajere între 71-54 mii ha. De asemenea, se observă o creștere pozitivă a recoltei medii a leguminoaselor pentru boabe (Anuarul Statistic al Republicii Moldova 2021, Moldovan *et al.*, 2022).

Nu în ultimul rând menționăm reprezentanții familiei Solanaceae, în calitate de culturi agricole cu impact economic și social major. Printre cei mai importanți reprezentanți ai familiei se numără cartoful (*Solanum tuberosum* L.), vinetele (*S. melongena* L.) și roșiile (*S. lycopersicum* L.). Un alt gen cultivat pe larg este genul *Capsicum* L., cu aproximativ 30 de specii. Genul cuprinde toate formele variate de ardei cu fructe cărnoase, inclusiv ardeiul gras și ardeii iuți. Unele plante din acest gen sunt cultivate ca plante ornamentale, altele sunt surse importante de alcaloizi. În Republica Moldova, în perioada anilor 2010-2020 suprafața totală însămânțată cu cartofi, roșii și ardei grași a oscilat între 24-37 mii ha, cel mai productiv an fiind 2011 (Anuarul Statistic al Republicii Moldova 2021).

Producția de fructe, legume și leguminoase reprezintă procese complexe, dependente de o mare varietate de factori. Unul dintre cele mai importante motive ale reducerii randamentului în producția de culturi agricole ține de domeniul protecției plantelor. Daunele cauzate de insectele dăunătoare sunt unul dintre cei mai semnificativi factori care afectează producția și calitatea produsului. În consecință, o producție agricolă de înaltă calitate este imposibilă fără un control eficient al dăunătorilor. Controlul insectelor filofage este important deoarece activitatea acestor dăunători reduce capacitatea plantei de a recolta lumină, de asemenea, pierderea frunzelor poate reduce formarea mugurilor floralii și dezvoltarea ulterioară a fructului. Pe lângă aceasta dăunătorii se pot hrăni cu alte organe vegetative sau generative, pot cauza deteriorări ale organelor generative în procesul de reproducere, astfel având un impact major asupra plantelor de cultură.

Reglementările de protecție a mediului și dezavantajele utilizării substanțelor chimice au determinat dezvoltarea unor metode ecologice de combatere a dăunătorilor. Consumatorii de fructe și legume proaspete sunt îngrijorați de contaminarea acestora cu pesticide. Controlul microbiologic al insectelor dăunătoare agricole a fost adesea considerat ca o alternativă favorabilă utilizării insecticidelor chimice. Înțelegerea comunităților microbiene de insecte poate fi primul pas pentru a crește semnificativ rata de realizare a programelor de control biologic al insectelor. Este întotdeauna de dorit să se investigheze un agent patogen mai sigur și eficient împotriva dăunătorilor țintă. Deosebit de promițători sunt agenții patogeni asociați cu dăunătorul țintă care supraviețuiesc în zona desemnată. În ceea ce privește membrii Curculionoidea, aceștia sunt în general greu de controlat din cauza modului lor de viață criptic, a cuticulei lor dure și puternic sclerotizate și a duratei lungi de viață a adulților. În studiul de față au fost

incluse 9 specii de coleoptere, inclusiv: *Byctiscus betulae* (L.), *Neocoenorrhinus* (*Neocoenorhinidius*) *pauxillus* (Germ.), *Sciaphobus* (*Neosciaphobus*) *squalidus* (Gyll.), *Tatianaerhynchites aequatus* (L.) și *Phyllobius oblongus* (L.), unii dintre cei mai periculoși dăunători ai pomilor fructiferi, *Sitona lineatus* L., *Hypera postica* (Gyll.) și *Protapion apricans* (Hbst.) dăunători semnificativi ai culturilor de Fabaceae și *Leptinotarsa decemlineata* (Say) care produce invazii considerabile în culturile din familia Solanaceae (Moldovan, 2019; Munteanu-Molotievskiy *et al.*, 2019). Nomenclatura și clasificarea a fost dată după autorii Bouchard *et al.* (2011) și Fibiger și Hacker (2004).

2.1. Coleoptere dăunătoare pomilor fructiferi incluse în cercetare *Byctiscus betulae* (Linnaeus, 1758)

Poziția sistematică. Genul *Byctiscus* Thomson, 1859 aparține familiei Attelabidae, suprafamiliei Curculionoidea. Sinonime: *Curculio betulae* L.

Particularități morfologice. Dimensiunea unei insecte adulte variază de la 5,5 la 9,5 mm. Corpul este de culoare verde, verde cu nuanțe de bronz, albastru-verde, albastru închis, cupru, mai rar verde cu elitre albastre sau albastru-verde cu elitre verzi (figura 2.1).

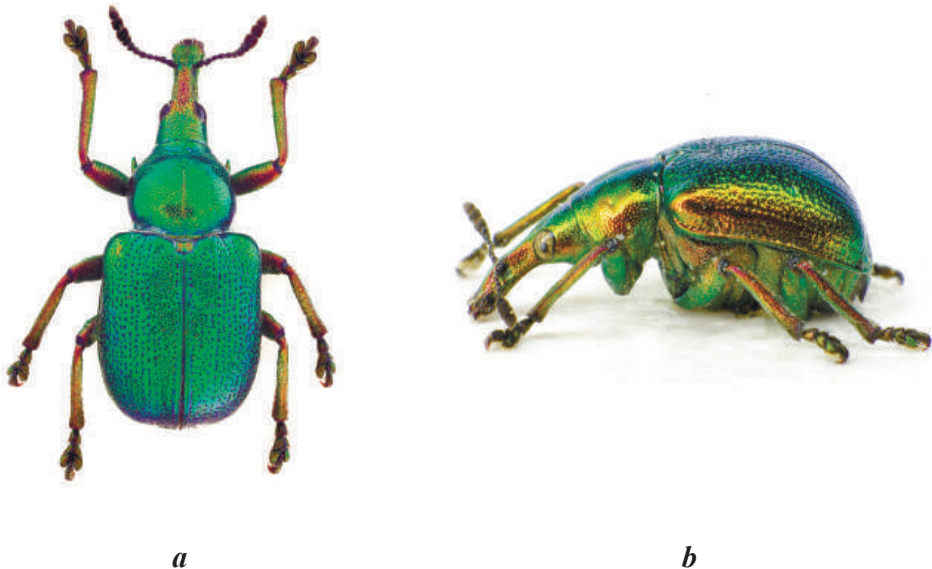


Fig. 2.1. *Byctiscus betulae* (L.) aspectul exterior *
a. aspect dorsal, *b.* aspect lateral

(Notă: * sursele imaginilor notate cu * în lucrare sunt prezentate în lista bibliografică)

Fruntea dintre ochi este ușor adâncită și are puncte alungite (Jakobson, 1931). La masculi, pe părțile laterale ale pronotului, chiar deasupra mijlocului acestuia, există spini îndreptați lateral și înainte. Oul este alb lăptos, oval, lung de 0,5–0,8 mm. Larva este groasă, albă, fără picioare, ușor curbată, de 6–8 mm lungime. Pupa are 5–6 mm lungime, de culoare albă (Savkovskij, 1990).

Particularități biologice și ecologice. Majoritatea insectelor adulte ierneză în sol sau sub frunzele căzute, lângă plantele gazdă. Apar la suprafață primăvara, odată cu începutul sezonului de vegetație, și se mută în coroanele copacilor, unde se hrănesc activ cu muguri și frunze tinere, mâncând fășii înguste de pulpă la suprafață. Activitatea începe la o temperatură de 18–20°C (Savkovskij, 1990). Perioada de împerechere începe la 2–3 săptămâni după diapauză. Reproducerea este bisexuată. Dezvoltarea este completă. Gândacii tineri ierneză în sol sau sub frunze, uneori fără a părăsi leagănul. Se dezvoltă o generație pe an. Femela răsucesțe frunzele în formă de „țigară” unde ulterior depune în mediu câte 6–8 ouă în fiecare frunză. Insectele sunt monovoltine și cele mai abundente populații, după cum deja a fost menționat, pot fi găsite pe pomii fructiferi. O femelă depune aproximativ 50 de ouă. Depunerea continuă timp de o săptămână. La sfârșitul procesului, insectele mor. Oul trece prin stadiul embrionar în 7–20 de zile, durata fiind determinată de temperatura mediului ambiant. Larva eclozează în interiorul frunzei răsucite și se hrănește ceva timp cu frunzele ofilite. Curând frunzele răsucite se usucă și cad la pământ. Larvele continuă să se hrănească cu frunzele căzute în timp ce sunt în interiorul tubului răsucit. La o lună după perioada embrionară, larvele pătrund adânc în sol până la o adâncime de 3 până la 10 cm (Savkovskij, 1990). Pupa rămâne în pământ până în septembrie–octombrie (Korchagin, 1971). Unii gândacii adulți ies la suprafață și se hrănesc cu muguri și frunze, alții rămân pentru iernare în sol (Savkovskij, 1990).

Răspândirea. Specie transpaleartică. Întâlnită în Europa, Asia Mică și Centrală, Transcaucazia, regiunea Amur, sudul ținutului Habarovsc (Ter-Minasyan, 1974), China de Nord (Angelov, 1981). Distribuția speciei în Europa este prezentată în figura 2.2.

Relații trofice și importanța economică. Eurioligofag, printre plantele gazdă au fost evidențiați plopul, mesteacănul, alunul, teiul, fagul, arinul, arțarul, ulmul, vița-de-vie (reprezentanții genurilor *Populus*, *Betula*, *Corylus*, *Tilia*, *Fagus*, *Alnus*, *Acer*, *Ulmus*, *Vitis*), de asemenea și pomii fructiferi din familia *Rosaceae* (Ter-Minasyan, 1950). Dăunează mugurilor și frunzelor pomilor fructiferi și culturilor silvice. Insectele adulte de obicei în perioada de nutriție suplimentară perforază găuri în pețiol, nervațiunea medie și parenchimul frunzei. Caracterul vătămarilor provocate de larve este diferit deoarece acestea se dezvoltă în frunzele răsucite de femelă. În Moldova este unul dintre dăunători secundari ai viței de vie (Poiras, 1998; Munteanu, 2006).



Fig. 2.2. Răspândirea geografică a speciei *Byctiscus betulae* (L.) în Europa
(reprodus după [www. http://www.eu-nomen.eu/](http://www.eu-nomen.eu/))

***Neocoenorrhinus* (*Neocoenorrhinidius*) *pauxillus* (Germar, 1823)**

Poziția sistematică. Genul *Neocoenorrhinus* Voss, 1952 aparține familiei Atteblabidae, suprafamiliei Curculionoidea. Sinonime: *Rhynchites pauxillus* Germ., *Coenorhinus pauxillus* Germ.

Particularități morfologice. Lungimea corpului între 1,8-3 mm. Corpul albastru-închis sau verde-albastru cu strălucire metalică, dens acoperit cu firioare de păr lungi și maronii. Ochii rotunzi, puternic convecși, lungimea capului fără rostru este mai mică decât lățimea acestuia împreună cu ochii. Rostrul curbat dorso-ventral angular la nivelul ochilor. La masculi rostrul este mult mai scurt decât la femele, iar la femele rostrul este puțin mai scurt decât lungimea pronotului și capului combinate. Scutelul este mic, pentagonal, cea de a 9-ua strie a elitrei se termină distal mijlocului (figura 2.3) (Ter-Minasyan, 1950; Savkovskij, 1951).

Particularități biologice și ecologice: Dezvoltarea unei generații durează 1-2 ani. Adulții apar în abundență după hibernare în timpul înfloririi mugurilor de măr când temperatura medie a aerului este de 10°C. Ovipoziția începe la sfârșitul înfloririi mugurilor. O femelă în mediu depune până la 100 de ouă. Femelele sfredelesc o găurică mică pe partea inferioară a frunzei sau în pețiolul frunzei și depun un ou în interior. Ouăle se dezvoltă timp de 6-8 zile apoi eclozează. După patru săptămâni larvele se deplasează în sol la o adâncime de 15 cm. Majoritatea larvelor se deplasează în sol până la mijlocul lunii iunie, iar primele pupe apar la mijlocul lunii iulie.

Larvele de ultima vârstă nu au discul pronotului cu punct galben. Pupele se transformă în adulți în luna septembrie. Iernează în stadiile de larve și adulți (Ter-Minasyan, 1950; Savkovskij, 1951; Vasiliev, 1988; 1989).



a



b

Fig. 2.3. *Neocoenorhinidius pauxillus* (Germ.) aspectul exterior*
a. aspect dorsal, *b.* aspect lateral

Răspândirea. Specie vest-paleartică. *Întâlnită în* Europa, Turcia, Iran, Caucaz, Turkmenia, Kazahstan regiunea de vest (Ter-Minasyan, 1950). Distribuția în Europa este prezentată în figura 2.4.

Relații trofice și importanța economică. Eurioligofag, trofic este atașat de plantele din familia Rosaceae: măr (*Malus*), păr (*Pyrus*), păducel (*Crataegus*), prun (*Prunus*), ș.a. Adulții se hrănesc cu muguri, flori și frunze noi. Larvele se hrănesc cu parenchimul frunzei, formând mine mici alungite. Frunzele infestate se îngălbenesc și cad. Larvele se hrănesc cu țesutul frunzei în descompunere, în frunzele uscate larvele nu supraviețuiesc. Cel mai abundent este pe pomii de măr, mai puțin pe pere și prun, foarte rar pe cireșe și caise. Dăunează, de asemenea, arbuștilor de porumbar și păducel. Uneori adulții pot vătăma până la 50% din frunze ceea ce poate provoca căderea fructelor. Pragul economic de daună este de aproximativ 40 de adulți pe un pom. În unii ani sunt înregistrate explozii de numeric major al speciei *N. pauxillus* în livezile de pe malurile Nistrului și Prutului (Ter-Minasyan, 1950; Savkovskij, 1951; Vasiliev, 1988; 1989; Poiras, 1998; 2006; Munteanu, 2006).



Fig. 2.4. Răspândirea geografică a speciei *Neocoenorhinidius pauxillus* (Germ.) în Europa (reprodus după [www. http://www.eu-nomen.eu/](http://www.eu-nomen.eu/))

***Tatianaerhynchites aequatus* (Linnaeus, 1767)**

Poziția sistematică. Genul *Tatianaerhynchites* Legalov aparține familiei Atteblabidae, suprafamiliei Curculionoidea. Sinonime: *Curculio aequatus* L., *Coenorhinus aequatus* L., *Rhynchites ruber* Fairm.

Particularități morfologice. Lungimea corpului între 2,5-5 mm. La masculi lungimea rostrului are aceeași lungime ca și lungimea capului și pronotului luate împreună, la femele rostrul este mai lung. Antenele sunt înserate la mijlocul rostrului. Scutелul este mic, triunghiular, acoperit cu firioare de păr. Prima strie a elitrei este scurtată. Culoarea capului și pronotului este bronzat-arămiu, iar rostrul, elitrele și membrele sunt de culoare roșcat-maronie, sutura elitrelor este mai întunecată (figura 2.5) (Ter-Minasyan, 1950; Savkovskij, 1976; Vasiliev, 1955; 1984).



Fig. 2.5. *Tatianaerhynchites aequatus* (L.) aspectul exterior*
a. aspect dorsal, b. aspect ventral

Particularități biologice și ecologice. Adulții apar în a doua jumătate a lunii aprilie. După perioada de nutriție suplimentară femela depune ouă în fructele tinere, peste aproximativ o săptămână după înflorire. Temperatura optimă pentru depunerea ouălor este 16-20°C, iar umiditatea optimă este de 60%. Perioada de ovipoziție începe în a doua jumătate a lunii mai și durează aproximativ o lună, atingând un maxim în prima jumătate a lunii iunie. După depunerea ouălor femela găurește pedunculul fructului ulterior acesta se usucă și cade. Ouăle se dezvoltă timp de 12 zile. Dezvoltarea larvelor are loc în interiorul fructelor uscate. La sfârșitul lunii august larvele părăsesc gazda, se deplasează în sol și se împepeză. Pubele rămân în sol până toamna următorului an, iar adulții vor ieși din sol doar primăvara.

Răspândirea. Specie vest-paleartică. Europa, Caucaz, Kazahstan regiunea de Est, Turkmenia, Turcia, Siria, Iran (Ter-Minasyan, 1950), Iordania (Angelov, 1981). Distribuția în Europa este prezentată în figura 2.6.

Relații trofice și importanța economică. Eurioligofag, trofic este atașat de speciile familiei Rosaceae: măr (*Malus*), păr (*Pyrus*), păducel (*Crataegus*), prun (*Prunus*), ș.a. Insectele adulte se hrănesc cu muguri, flori, frunzele și fructele plantelor, larvele se dezvoltă în fructele vătămate. În Republica Moldova generația este bială (Goncharenko, 1978). Este considerat unul dintre cei mai periculoși dăunători ai culturii mărului. Atacurile asupra fructelor verzi pot fi văzute ca niște găuri mici sau cicatrici. Specia are o semnificație economică majoră. Este un dăunător la prune, cireșe, caise, măr, rareori de pere. Pot vătăma până la 25% din flori și fructe tinere (Poiras, 1998; 2006; Munteanu, 2006).



Fig. 2.6. Răspândirea geografică a speciei *Tatianaerhynchites aequatus* (L.) în Europa (reprodus după [www. http://www.eu-nomen.eu/](http://www.eu-nomen.eu/))

***Sciaphobus squalidus* (Gyllenhal, 1834)**

Poziția sistematică. Genul *Sciaphobus* Daniel. 1904, aparține familiei Curculionidae, suprafamiliei Curculionoidea. Sinonime: *Polydrusus squalidus* Gyll., *Sciaphilus beckeri* Strln., *Sciaphobus balcanicus* Apflb., *Sciaphobus squalidus alternans* Apflb., *Sciaphobus squalidus ovalipennis* Apflb.

Particularități morfologice. Lungimea corpului între 5,1-7,2 mm. Corpul negru, antenele de culoare roșie-marونیu. Elitrele acoperite cu solzișori ovali, scurți, aplatizați, amplasați rar lăsând spații înguste între două striuri. Pronotul acoperit cu solzișori lungi și înguști, orientați transversal amplasați rar lăsând integumentul descoperit (figura 2.7). Capul împreună cu rostrul este de asemenea acoperit cu solzișori înguști, orientați oblic regiunii posterioare. Rostrul este lung și subțire, în jumătatea anterioară bazală, cu muchii și laturi drepte. Fruntea mare, slab aplatizată. Ochii mari și puternic convecși, proiectați distinct în afara conturului capului. Scutелul este mare, pătrat, dens squamos, de culoare gri (Smreczynski, 1966).

Particularități biologice și ecologice. Adulții și larvele ierneză în sol. Primăvara devreme, în perioada înmuguririi pomilor fructiferi sau chiar mai devreme, insectele adulte încep să părăsească locurile de iernare. În perioada de nutriție suplimentară a insectelor adulte, de obicei în fenofaza conului verde, pot fi observate acumulări abundente a insectelor în coroana pomilor. Adulții se hrănesc doar ziua, iar seara coboară la sol, ascunzându-se în locuri izolate. Femelele depun ouăle în grupuri de 10-40 de bucăți sub marginea frunzei, pe care ea ulterior o îndoaie și o lipește cu ajutorul secrețiilor. Dezvoltarea embrionară durează aproximativ 11-16 zile. Larvele eclozate cad la pământ și se deplasează în sol la o adâncime de 40-60 cm, unde se hrănesc cu rădăcini mici de copaci. Larve se dezvoltă pe parcursul a două perioade vegetative, împuparea are loc la sfârșitul următoarei veri. Adulții hiberneză în sol și apar în coroanele copacilor în a treia primăvară (Arnoldi *et al.*, 1974).



Fig. 2.7. *Sciaphobus squalidus* (Gyll.) aspectul exterior*

Răspândirea. Bosnia și Herțegovina, Bulgaria, Croația, Grecia, Ungaria, Kazahstan, Republica Moldova, Muntenegru, România, Rusia, Serbia, Slovacia, Slovenia, Ucraina. Distribuția speciei în Europa este prezentată în figura 2.8 (Borovec, Skuhrovec, 2015).



Fig. 2.8. Răspândirea geografică a speciei *Sciaphobus squalidus* (Gyll.) în Europa (reprodus după [www. http://www.eu-nomen.eu/](http://www.eu-nomen.eu/))

Relații trofice și importanța economică. Polifag, insectele adulte se hrănesc cu muguri florali și foliari, frunzulițe tinere, trofic sunt atașate de arțar (*Acer campestre*), vișin (*Cerasus vulgaris*), *Juglans regia* L. (nuc), măr (*Malus domestica*), plop alb (*Populus alba* L.), prun (*Prunus domestica*), porumbar (*P. spinosa*), păr (*Pyrus communis*), stejar pufos (*Quercus pubescens*), stejar pedunculat (*Q. robur*), coacăz negru (*Ribes nigrum*), trandafir (*Rosa* sp.), liliac (*Syringa vulgaris*), tei argintiu (*Tilia tomentosa*), viță-de-vie (*Vitis vinifera*). păducel (*Crataegus* spp.), ș.a. Larvele habitează în sol se hrănesc cu rădăcini de plante.

Specia are o semnificație economică majoră. Este un dăunător la prune, cireșe, caise, măr, rareori de pere. Insectele pot vătăma până la 25% din muguri (Savkovskij, 1976; Vasiliev, 1955; 1984; Goncharenko, 1968; 1978; Poiras, 1998; 2006).

***Phyllobius oblongus* (Linnaeus, 1758)**

Poziția sistematică. *Phyllobius* Germ. aparține familiei Curculionidae, suprafamiliei Curculionoidea. Sinonime: *Curculio oblongus* L. *aceris* Apfelbeck, *P. biformis* Reitter, *P. floricola* Herbst, (*Curculio*) *fuscus* Laicharting, (*Curculio*) *mali* Fabricius, (*Curculio*) *pruni* Scopoli, (*Curculio*) *querneus* Geoffroy, (*Curculio*) *rufescens* Marsham, (*Curculio*) *scutarensis* Apfelbeck.

Particularități morfologice Lungimea insectei adulte este de 3,5-6 mm. Corpul este negru sau maro. Elitrele sunt maro. Vârful corpului este strălucitor, fără solzi, cu fire de păr deschise proeminente. Rostrumul este scurt, negru și se termină adesea în piese bucale galben-marou. Rostrumul pătrat sau ușor transvers. Pronotul este puternic și dens punctat, devenind confluent lateral; marginile laterale sunt curbate, mai late aproape de mijloc și lipsite de margini.. Capul este punctat puternic, cu ochi puternic convecși, în fața unor tâmpole lungi care gradual se lărgesc la bază. Antenele sunt geniculate și galbene. Membrele galbene, pubescente peste tot, iar segmentele femurale sunt dințate (Savkovskij, 1990). La masculi pro-tibiile au un cârlig puternic pe unghiul apical interior. Elitrele se sinueaza în spatele umerilor proeminenți și devin mai late spre mijloc. Elitrele masculilor sunt negre, iar cele ale femelelor sunt marou (figura 2.9). Larvei îi lipsesc picioarele și ochii, capul este mic, chitinizat, ușor curbat ventral (Vasiliev, 1988). Corpul larvei este gros, încrețit și alb. Lungimea corpului este de 4-6 mm. Aparat bucal de tip rozător (Savkovskij, 1990). Pupa este albă pal, deschisă, cu ochii negri. Lungimea de aproximativ 5 mm (Savkovskij, 1990). Forma pupei este foarte asemănătoare cu o insectă adultă. Are rudimente slab exprimate ale rostrumului, picioarelor și aripilor (Vasiliev, 1988).



Fig. 2.9. *Phyllobius oblongus* (L.) aspectul dorsal *

Particularități biologice și ecologice. Adultul iese din sol primăvara, în stadiul de mugure roz. Habitatele tipice sunt marginile împădurite, gardurile vii și parcurile împădurite etc. adulții sunt activi din aprilie până în iulie, deși la latitudini mai mari sezonul se poate extinde până la sfârșitul lunii august. Adulții se hrănesc cu frunze fragede, și flori ale diferitelor specii de arbori și arbuști timp de la o săptămână până la o lună și apoi se împrăștie prin zbor și astfel populațiile locale pot apărea și dispar destul de brusc (Savkovskij, 1990). Perioada de împerechere se încheie cu depunerea ouălor în sol în grupuri de 15-17 bucăți. Larva trăiește în sol și se hrănește cu rădăcinile plantelor. Pupa este formată și se situează în straturile superioare ale solului. Adultul iese din pupă toamna și ierneză în sol. Primăvară, după hrănirea suplimentară, zbor, împerechere și depunerea ouălor, moare (Savkovskij, 1990).

Răspândirea. Este o specie nativă și comună la nivel local în toată Europa, inclusiv Corsica, Sardinia și Insulele Canare etc. extinzându-se spre nord până în Scandinavia și spre est până în Siberia, iar în Nearctica este adventivă și stabilită în nord-estul Statelor Unite și estul Canadei. Este, în general, comună în toată Anglia și Țara Galilor, extinzându-se până în West Perth în Scoția (figura 2.10).

Relațiile trofice și importanța economică. Adulții se hrănesc cu frunzișul proaspăt și cu florile unei game largi de copaci și arbuști, de ex. salcie (*Salix*), tei (*Tilia*), arțar (*Quercus*), ulm (*Ulmus*), păr (*Pyrus*), măr (*Malus*), prun (*Prunus*) și alun (*Corylus*). La fel ca adulții, larvele sunt larg polifage, hrănindu-se cu rădăcinile unei game extinse de plante lemnoase. Specia este un dăunător al sămburoaselor, de asemenea sunt atacate plopul, arinul, alunul, cireșul, stejarul și alte specii de foioase (Vasiliev, 1988). Gândacii adulți sunt cei mai periculoși în timpul perioadei de hrănire suplimentară. Aduc daune considerabile pepinierelor și livezilor tinere. Larvele trăiesc în sol și se hrănesc cu rădăcini mici. Efectul lor asupra plantelor este neglijabil (Savkovskij, 1990). De asemenea, uneori atacă plantele erbacee, în Statele Unite și Canada fiind un dăunător al căpșunilor cultivate.

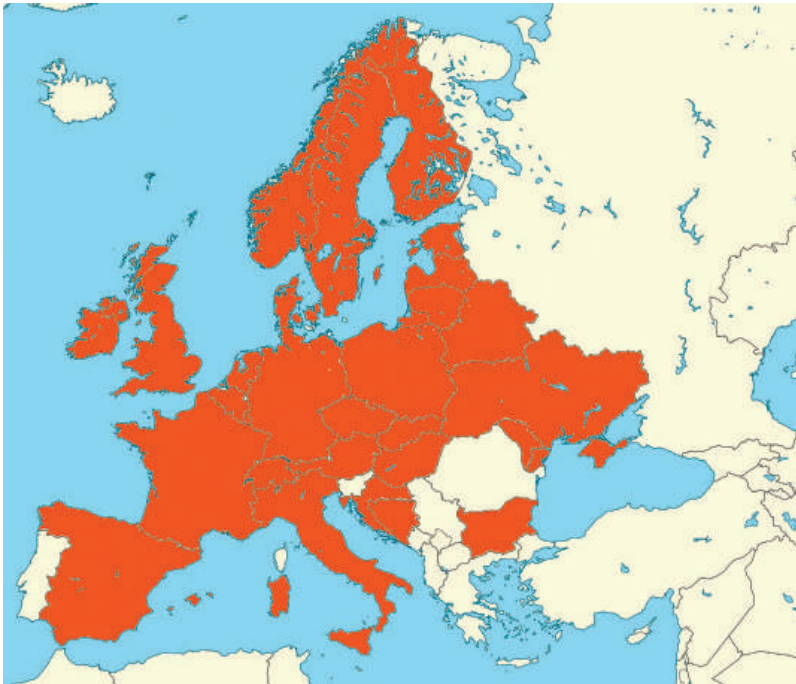


Fig. 2.10. Răspândirea geografică a speciei *Phyllobius oblongus* (L.) în Europa (reprodus după [www. http://www.eu-nomen.eu/](http://www.eu-nomen.eu/))

2.2. Coleoptere dăunătoare culturilor leguminoase și legumicole investigate

Sitona lineatus (Linnaeus, 1758)

Poziția sistematică. Genul *Sitona* Germar aparține familiei Curculionidae, suprafamiliei Curculionoidea. Sinonime: *Curculio lineatus*.

Particularități morfologice. Lungimea corpului între 3,6-5,4 mm. Corpul este alungit cu antenele, tibia și tarsele de culoare roșie-cenușiu. Corpul negru acoperit cu solzișori gri-cenușii pe partea dorsală, intercalați cu perișori aplatisați, fiind dispuși pe elite în dungi longitudinale, alternante, întunecate și deschise. Solzișorii prezintă dungi mediane și sublaterale pe cap și pronotum. Ochii mari globuloși. Pronotul este mai larg decât lung, prevăzut cu o punctuație densă. Elitrele sunt paralele, cu umeri proeminenți. Capul are rostrul scurt și lat cu șanț central care se extinde după nivelul marginii posterioare a ochilor (figura 2.11; Jackson, 1920; Petrukha, 1969).

Particularități biologice și ecologice. Adulții devin activi atunci când temperatura aerului atinge 12-14°C iar la nivelul solului se înregistrează 19-20°C. Se disting două perioade de zbor al insectei: zborul migrator de primăvară din locurile de iernare spre planta gazdă, mazăre sau fasole și zborul pentru iernare vara târziu sau toamna. După perioada de hrănire suplimentară 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. Numărul de ouă pentru o femelă variază de la 354 la 1655 (Jackson, 1920) iar conform unor date până la 3500 ouă (Petrukha, 1969). Ouăle sunt împrăștiate pe suprafața solului de către femelă în timp ce aceasta se hrănește. Stadiul de ou variază în funcție de temperatură și umiditate. Eclozarea are loc timp de 20-21 zile, însă perioada de incubație poate fi și 18 zile. După incubație, larva pătrunde în sol în căutarea plantei gazdă, produce o gaură aproape nedetectabilă în nodozitățile rădăcinii și pătrunde în interior. Larvele se dezvoltă timp de 30-60 de zile, în funcție de regiunea geografică și de temperatura solului. Formarea pupei necesită 16-19 zile în Europa, și aproximativ 15 zile în America de Nord. Insecta adultă rămâne în sol până ce exoscheletul său este deplin sclerotificat (Moldovan *et al.*, 2022).

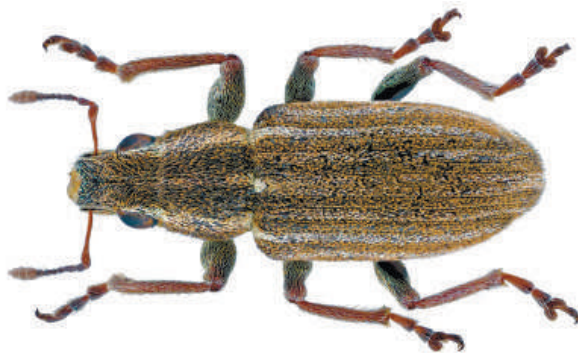


Fig. 2.11. *Sitona lineatus* (L.) aspect dorsal *

Răspândirea. Specie holarctică (Poiras, 1998; 2006). Este răspândită în Europa (figura 2.12), de asemenea specia și-a extins arealul în Africa de Nord și orientul apropiat (Turcia, Georgia, Armenia, Azerbaidjan, Liban, Siria, Israel, Iordan, Peninsula Sinai, Peninsula Arabă, Iran și Irak). În America de Nord specia 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.

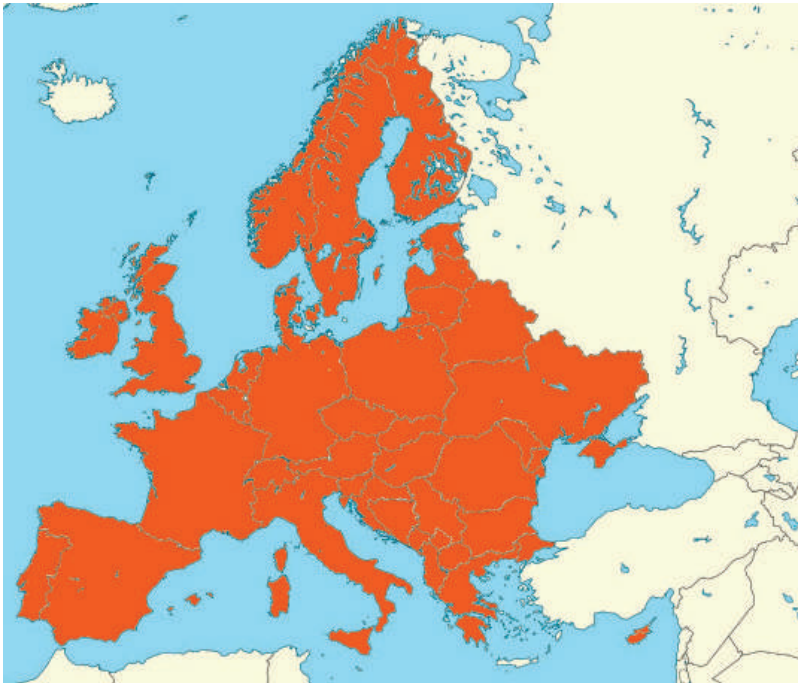


Fig. 2.12. Răspândirea geografică a speciei *Sitona lineatus* (L.) în Europa
(reprodus după [www. http://www.eu-nomen.eu/](http://www.eu-nomen.eu/))

Relațiile trofice și importanța economică. Eurioligofag, consumă plante din genurile familiei Fabaceae. După diapauză adulții preferă în calitate de plantă gazdă mazărea de câmp și fasolea. Dezvoltarea funcției reproductive a femelelor are loc din iulie până în martie în timpul hrănirii suplimentare. În rezultatul cercetărilor efectuate în Republica Moldova pentru *S. lineatus* a fost stabilit următorul spectru trofic: lucerna (*Medicago sativa*), mazăre (*Pisum sativum*), bob de fasole (*Vicia faba*), trifoiul (*Trifolium* spp.), *Lotus* spp., *Melilotus* spp., *Ononis* spp., salcâm (*Robinia* spp). (Malevanciu, Munteanu, 2010). Specia are o semnificație economică majoră. Provoacă daune atât larvele cât și adulții. Gradul de deteriorare a plantelor gazdă primare în timpul hrănirii adulților primăvara depinde de momentul de atac și de densitatea adulților. 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, defolierea poate reduce numărul de păști

pe plantă (Jackson, 1920). Larvele pot deteriora semnificativ nodozitățile rădăcinii (George, 1962; Williams *et al.*, 1995). Rata maximală de distrugere a nodozităților coincide cu faza de înflorire. În studiile întreprinse larvele au deteriorat între 40 și 80% dintre nodozități, în special cele de pe rădăcină principală (Verkleij, 1992) (Moldovan *et al.*, 2022).

***Hypera postica* (Gyllenhal, 1813)**

Poziția sistematică. Genul *Hypera* Germar aparține familiei Curculionidae, suprafamiliei Curculionoidea. Sinonime: *Phytonomus variabilis* Hbst., *Phytonomus posticus* (Gyll.), *Phytonomus transsylvanicus* Petri, *Phytonomus murina* F.

Particularități morfologice. Lungimea corpului între 4,0-5,5 mm. Rostrul este aproape drept, relativ scurt și gros, fruntea de aproximativ 2 ori mai lată decât rostrul. Tulpinile antenelor ating mijlocul ochiului. Ochiul aproape plați. Pronotul devine mai lat la mijloc. Pronotul prezintă două benzi întunecate separate printr-o linie de culoare mai închisă, îngustă. Elitrele mult mai largi decât pronotul, umerii puternic proeminenți. Perișorii sunt puternic înclinați în urmă (figura 2.13). Tibia la mascul este mai îngustă și subțire decât la femele, ușor curbată în partea de sus, iar ultimul sternit abdominal la masculi are o adâncitură mică.

Particularități biologice și ecologice. Insecta iernează în stadiul de adult. În localitățile



Fig. 2.13. *Hypera postica* (Gyll.) aspect dorsal *

cu ierni blânde, ouăle, larvele și pupele, de asemenea, pot supraviețui iernii. În dependență de regiune, în special în cele sudice, depunerea pantei poate avea loc toamna, iarna și primăvara, ori de câte ori temperaturile depășesc 1,7°C. Odată ce locul pentru depunerea pantei este ales, femela perforază peretele plantei, introduce ovipozitorul și depune un grup de 9-10 ouă de culoare galbenă. 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. Larvele apărute, se hrănesc cu madaua tulpinii, apoi creează galerii spre exterior, ieșind urcă pe mugurii foliari terminali cu care se hrănesc în continuare. Larva se transformă în pupă și imago, după acumularea de 77 zile. 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 unde are loc dezvoltarea sexuală iar activitatea metabolică este încetinită. Datorită schimbării fotoperioadei, insectele adulte devin din nou active, migrează înapoi spre câmpurile de lucernă, ating maturitatea sexuală, și încep depunerea pantei (Moldovan *et al.*, 2022).

Răspândirea. Specie holarctică (Poiras, 1998; 2006). Specia este răspândită pe toată regiunea paleartică, în Nearctica aceasta a fost introdusă la începutul anilor 1900 (Zahiri *et al.*, 2014). Insecta s-a răspândit în părțile de vest și de sud ale Asiei, Africa de Nord și Japonia (Hsiao *et al.*, 1993). Răspândirea în Europa este prezentată în figura 2.14.

Relațiile trofice și importanța economică. Oligofag, se hrănește aproape exclusiv pe plantele leguminoase din genul *Medicago*, ocazional, se poate hrăni cu câteva specii din genuri apropiate, inclusiv: *Trifolium* și *Trigonella*. De asemenea se mai dezvoltă pe *Medicago lupulina*, *Melilotus alba*, *M. officinalis*, *Trifolium pratense*, *T. repens*, *T. hybridum*, și *T. incarnatum*. Specia este considerată un dăunător serios al plantelor de cultură, și a dus la pierderi economice semnificative în întreaga lume. Daunele cauzate de acest dăunător în prima recoltă ar putea ajunge la cca 50-70%. Pe de altă parte, lipsesc programele de crearea a soiurilor de lucernă rezistente la *H. postica*, din cauza variației genetice insuficiente a plantei și lipsei datelor complete privind genele responsabile de rezistență. Cele mai grave vătămări au loc la prima recoltă de lucernă, cu toate acestea, din cauza infestărilor grele, a doua regenerare a culturii poate fi afectată de hrănirea larvelor și adulților de pe miriște. Prejudiciile provocate de specia *H. postica* pot duce la scăderea masei verzi a plantei, și randamentul calității culturilor furajere (Moldovan *et al.*, 2022).



Fig. 2.14. Răspândirea geografică a speciei *Hypera postica* (Gyll.) în Europa (reprodus după [www. http://www.eu-nomen.eu/](http://www.eu-nomen.eu/))

Protapion apricans (Herbst 1797)

Poziția sistematică. Genul *Protapion* Schilsky, 1908 aparține familiei *Apionidae* din cadrul suprafamiliei Curculionoidea. Sinonime: *Apion apricans* Herbst, *Curculio ochropus* Muller, *C. ochropus* Gmelin, *A. tubicen* Wencker, *A. fuscipes* Desbrochers, *A. curvipes* Desbrochers.

Particularități morfologice. 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 2.15). 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 creștături. Pupa de 3-3,5 mm, alb-gălbuie (Moldovan *et al.*, 2022).



Fig. 2.15. *Protapion apricans* (Hbst.) aspect dorsal *

Particularități biologice și ecologice. 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). Femela depune ouăle în bobocii florilor sau în florile înflorite. 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 ponte 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 împupare, în care larva perforează găuri (Hansen, Boelt, 2008; Lundin *et al.*, 2012). Astfel, o larva 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). 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 zile (Moldovan *et al.*, 2022).

Răspândirea. Specie transpaleartică (Poiras, 1998; 2006). Specia *Protapion apricans* (Herbst, 1797) 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). Răspândirea în Europa este prezentată în figura 2.16.



Fig. 2.16. Răspândirea geografică a speciei *Protapion apricans* (Hbst.) în Europa (reprodus după [www. http://www.eu-nomen.eu/](http://www.eu-nomen.eu/))

Relațiile trofice și importanța economică. Habitatele tipice sunt speciile de pășiști 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 *Amoria 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. Specia este considerată un dăunător serios al plantelor de cultură, insectele hrănindu-se produc leziuni pe frunze în formă de găuri mici, și, de asemenea, deteriorează tulpinile, muguri apicali și floral. Provoacă daune în principal în stadiul larvar. În cazul speciei *Protapion apricans* cele mai mari daune sunt provocate de larve. Acestea vătămează mugurii foliari, cei floral, semințele și distrug ovarele florilor. De-a lungul perioadei de dezvoltare, 15-25 zile, o larvă distruge 7-11 ovare și alte 8-10 ovare pentru împupare, în care larva perforază găuri (Hansen, Boelt, 2008; Lundin *et al.*, 2012). Astfel, o larvă poate distruge 30-40 % din ovarele unui capitul de trifoi. 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 (Kolarik, Rotrekl, 2013; Moldovan *et al.*, 2022).

***Leptinotarsa decemlineata* Say, 1924**

Poziția sistematică. Genul *Leptinotarsa* aparține familiei Chrysomelidae, suprafamilia Chrysomeloidea. *Sinonime:* *Chrysomela decemlineata* Say, *Doryphora decemlineata* Say, *Leptinotarsa multitaeniata* Stål, *Polygramma decemlineata* Say.

Particularități morfologice. Capul, pronotul și partea ventrală galben-portocalie cu pete negre, picioarele și scutелul galben-portocaliu, elitrele galben-portocalii cu cinci dungi longitudinale negre. Segmentul apical al palpiilor maxilari cilindric, rotunjit apic, mai scurt decât segmentul precedent. Elitrele punctate-striate, epipleura glabră. Mezosternul nu este ridicat deasupra nivelului prosternului. Profemurul normal, al treilea segment tarsal întreg, gheare tarsale simple, divergente, necontopite la bază. Lungimea corpului 8,5-11,5 mm (figura 2.17). Ouăle sunt galbene sau pal-portocalii, alungite-ovale, de aproximativ 1,2 mm lungime. Axa lungă a oului este aproape perpendiculară pe frunză. Ouăle dintr-o masă tind să formeze rânduri neregulate și să eclozeze simultan. Corpul larvelor puternic convex dorsal, cu abdomen mare. Capul poartă 6 ocelli în spatele antenei pe fiecare parte și o pereche de mandibule cu 5 piese dentare. Posedă trei segmente toracice, fiecare purtând o pereche de picioare cu 3 segmente, plus gheare. Abdomen cu 9 segmente. Culoarea se schimbă odată cu dezvoltarea, primul stadiu este roșu vișiniu cu cap și picioare lucioase, negre; stadiile ulterioare devin progresiv roșii, apoi pal-portocalii în stadiul final. Capul, picioarele și partea posterioară a pronotului de la negru până la maro intens; pe părțile laterale ale segmentelor mezotoracice și abdominale apar două rânduri vizibile de pete întunecate. Setele când sunt prezente sunt foarte mici, unele apar pe cap, picioare, pronot, pe zonele pigmentate și ventral. Lungimea corpului larvei mature este de aproximativ 15 mm. Pupele sunt gălbui, purtând sete scurte pe tuberculi mici, conici, maro. Capul poartă mai multe setae scurte. Toracele și pronotul cu aproximativ 100 setae; mezo- și metatoracele are mai puține setae și segmentul apical tarsal cu 1 seta, (Cox, 1996; CABI Compendium, *Leptinotarsa decemlineata*, 2022).



Fig. 2.17. *Leptinotarsa decemlineata* Say aspect dorsal *

Particularități biologice și ecologice. Insectele ierneză în stadiul de adulți intrând în diapauză în sol, de obicei la adâncimi de 7,6 până la 12,7 cm (Lashomb *et*

al., 1984). După diapauză insectele ies din sol pe o perioadă de câteva săptămâni, primăvara sau la începutul verii, în funcție de climă și de starea lor fiziologică (Hare, 1990) și se deplasează prin mers și zbor către planta gazdă (Ferro *et al.*, 1999). Plantele gazdă sunt localizate în mare parte întâmplător, prin căutări aleatorii. A fost constatat, că mirosul plantelor de cartofi este atractiv pentru insectele din specia *L. decemlineata*, plantele de cartofi deteriorate fiind mai atractive decât plantele nedeteriorate (Bolter *et al.*, 1997; Landolt *et al.*, 1999). Consumul maxim are loc la 25°C.

Gândacii se împerechează de obicei înainte de a intra în diapauză hibernală și, de asemenea, se împerechează în mod repetat primăvara, adesea timp de 24 de ore de la ieșirea din sol (Ferro *et al.*, 1999). Ovipoziția începe după 5-10 zile la o temperatură de 15-30°C. Ouăle sunt depuse în mase, conținând 10-30 de ouă, pe suprafața inferioară a frunzei. Depunerea ouălor continuă de obicei timp de câteva săptămâni, fiecare femelă depunând până la 2000 de ouă (Cox, 1988). Larvele eclozează în 4-14 zile. Larvele năpârlesc de patru ori. Dezvoltarea larvelor necesită doar 8 zile la temperaturi medii de 29°C, sau până la 28 de zile la temperaturi de 14°C. Larvele mature din stadiul al patrulea se înfundă în sol, unde se împușează. Stadiul de pupă durează de obicei 8-18 zile, în funcție de temperatură. La temperaturi constante, dezvoltarea este cea mai rapidă între 25 și 33°C; la temperaturi mai ridicate creșterea larvelor este încetinită și crește mortalitatea (Hare, 1990). Larvele sunt rezistente la condiții nefavorabile, deși ploile abundente și vânturile puternice pot provoca o mortalitate ridicată, mai ales a primelor stadii larvare. Canibalismul ouălor de către adulți poate fi semnificativ (Schrod *et al.*, 1996; CABI Compendium, *Leptinotarsa decemlineata*, 2022).

Insectele adulte din noua generație se pot deplasa prin mers și zbor către planta gazdă pentru a se hrăni. După hrănire timp de câteva zile, adulții din prima și generațiile următoare se pot împerechea și se pot reproduce sau încetează hrănirea și intră în diapauză, în funcție de temperatură, fotoperioadă și starea plantei gazdă. O parte a populației poate produce niște descendenți înainte de a intra în diapauză (Tauber *et al.*, 1988; Voss, Ferro, 1990 a, b; Nault, Kennedy, 1999). Numărul de generații complete variază între una, în apropierea extremelor mai reci, până la aproximativ patru, în zonele cele mai calde unde dezvoltarea de la ou la adult este finalizată în 30 de zile. Cerințele minime pentru finalizarea unei generații complete sunt de cel puțin 60 de zile în timpul verii când temperaturile depășesc 15°C și temperaturile de iarnă care rămân peste -8°C. Există unele zone reci în care se produce doar o generație parțială și gândacii nu se pot stabili definitiv. În general, vremea însorită cu o temperatură medie zilnică de 17-20°C are ca rezultat creșterea și răspândirea populațiilor, dar dacă temperaturile nu depășesc 11-14°C și umiditatea este ridicată, populațiile pot scădea efectiv (Svikle, 1976). În regiunile temperate, fotoperioada este cel mai important factor care induce „diapauză hibernală” la adulții teneralii de *L. decemlineata*, dar temperaturile ambientale și calitatea alimentelor pot avea efecte modificatoare (Hsiao, 1988). Temperaturile

ridicate reduc sensibilitatea gândacului la fotoperioadă; o fotoperioadă mai scurtă va induce diapauză la temperaturi mai ridicate (de Wilde, Hsiao, 1981; CABI Compendium, *Leptinotarsa decemlineata*, 2022).

Răspândirea. Răspândirea naturală a gândacului pe suprafețe mari are loc datorită vântului. Adulții pot fi transportați și pe distanțe lungi cu apele marine. În plus, adulții și larvele sunt ușor transportate pe plante și tuberculi de cartofi și în toate formele de ambalare și transport. Comerțul internațional cu legume proaspete cultivate pe terenuri infectate cu *L. decemlineata* este un mijloc comun de transport. Specia este răspândită pe scară largă în Asia (Armenia, Azerbaidjan, China, Republica Georgia, Iran, Irak, Kazahstan, Kârgâzstan, Tadjikistan, Turcia, Turkmenistan și Uzbekistan), America de Nord (Canada, Mexic și SUA), America Centrală și Caraibe (Cuba și Guatemala) și Europa (figura 2.18). În Republica Moldova, specia a fost descoperită pentru prima dată în 1960 (Vorotynceva, 1971; Munteanu-Molotievskiy *et al.*, 2019; CABI Compendium, *Leptinotarsa decemlineata*, 2022).



Fig. 2.18. Răspândirea geografică a speciei *Leptinotarsa decemlineata* Say în Europa (reprodus după [www. http://www.eu-nomen.eu/](http://www.eu-nomen.eu/))

Relații trofice și importanța economică. Gândacul de Colorado este o specie oligofagă. Atât adulții, cât și larvele se hrănesc cu frunzele speciilor de plante din familia Solanaceae, provocând daune grave. Gândacul de Colorado este un dăunător principal al cartofilor, dar poate fi dăunător vinetelor și roșiilor (Mitchell, Low, 1994; Hitchner *et al.*, 2008; Munteanu-Molotievskiy *et al.*, 2019). De asemenea, atacă plantele solanacee sălbatice, care apar pe scară largă și pot acționa ca un rezervor pentru infestare. Adulții se hrănesc cu tuberculii plantelor gazdă, pe lângă frunze, tulpini și muguri. Adulții și larvele se hrănesc pe marginile frunzelor și pot defolia rapid plante-

le tinere. În cele din urmă, ei desprind toate frunzele de pe lăstar; în mod excepțional, sunt mâncați și tuberculi expuși la suprafața solului. (CABI Compendium, *Leptinotarsa decemlineata*, 2022). *L. decemlineata* a invadat America de Nord, apoi Europa și Asia de Vest, într-un model clasic de răspândire geografică regulată, cu greu împiedicată de măsurile luate împotriva sa. Cu toate acestea, răspândirea nu poate fi numită invazivă deoarece a avut loc într-o cultură introdusă, plantată pe suprafețe mari ca monocultură (CABI Compendium, *Leptinotarsa decemlineata*, 2022).

2.3. Lepidoptere dăunătoare incluse în cercetare

În prezenta lucrare au fost incluse 3 specii de lepidotere din suprafamilia Noctuoidea: *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808), *Spodoptera exigua* (Hübner, 1808), dăunători semnificativi ai culturilor legumicole și *Lymantria dispar* (Linnaeus, 1758), defoliator sever al pădurilor.

Helicoverpa armigera (Hübner, 1808)

Poziția sistematică. Genul *Helicoverpa* Hardwick, 1965 aparține familiei Noctuidae. Sinonime: *Noctua armigera* Hübner, *Chloridea armigera* Hübner, *Chloridea obsoleta* Duncan & Westwood, *Helicoverpa obsoleta* Auctorum, *Heliiothis armigera* Hübner, *Heliiothis fusca* Cockerell, *Heliiothis obsoleta* Auct., *Heliiothis rama* Bhattacharjee, Gupta, *Noctua armigera* Hübner, *Noctua barbara* Fabricius.

Particularități morfologice. Corpul exemplarelor adulte are lungimea cuprinsă între 12-20 mm. Anvergura aripilor constituie 30-45 mm. Culoarea poate varia la femele de la galben pal și portocaliu până la maro (figura 2.19 A), iar masculii sunt cenușiu-verzui cu o pată brună pe marginea aripilor posterioare (figura 2.19 B). Larva speciei *H. armigera* are o lungime de 35-40 mm. Culoarea poate varia de la verde deschis până la maro închis în dependență de planta gazdă. Capul, toracele, membrele toracice și cele cinci perechi de membre false abdominale sunt de culoare maro închis sau negri (CABI Compendium, *Helicoverpa armigera*, 2022).



Fig. 2.19. *Helicoverpa armigera* (Hübner) aspectul exterior *

a. ♀, b. ♂

Particularități biologice și ecologice. *H. armigera* parcurge toate stadiile ale ciclului vital de la ou până la insectă matură în 4-6 săptămâni în timpul verii, iar primăvara și toamna în 8-12 săptămâni. Insecta matură trăiește 10 zile, timp în care femela depune câteva mii de ouă. Ouăle se depun solitar sau în ciorchine pe frunze, muguri de flori, pe flori și fructe, dar uneori pe tulpini și în puncte de creștere (CABI Compendium, *Helicoverpa armigera*, 2022).

Răspândirea. Această specie este răspândită în Europa (figura 2.20), Asia temperată, Africa, Australia și Oceania, recent a fost descoperită în Brazilia. Este o specie migratoare, capabilă să ajungă în Scandinavia și în alte teritorii nordice (CABI Compendium, *Helicoverpa armigera*, 2022). În Republica Moldova a fost menționată pentru prima dată în 1977 (Tkach, 1977; Țugulea, Derjanschi, 2015; Munteanu-Molotievskiy *et al.*, 2019).



Fig. 2.20. Răspândirea geografică a speciei *Helicoverpa armigera* (Hübner) în Europa (reprodus după [www. http://www.eu-nomen.eu/](http://www.eu-nomen.eu/))

Relații trofice și importanța economică. *H. armigera* este o insectă polifagă care se hrănește cu aproximativ 200 de specii de plante, printre care plante anuale, sălbatice și culturi horticole perene. Cele mai considerabile daune sunt produse culturilor leguminoase, cum ar fi năutul (*Cicer arietinum*), mazărea (*Pisum sativum*), fasolea (*Phaseolus*), soia (*Glycine max*) lucerna (*Medicago sativa*); culturilor solanacee, printre care tomatele (*Solanum lycopersicum*), cartoful (*Solanum tuberosum*), ardeii gras (*Capsicum annuum*) și altor culturi cu importanță economică majoră, spre exemplu porumbul (*Zea mays*), sorgul (*Sorghum spp.*), inul (*Linum spp.*) și floarea soarelui

(*Helianthus annuus*). Larvele lor se hrănesc cu frunze, tulpini, muguri, inflorescențe, fructe și păstăi, dăunând etapelor vegetative și reproductive ale plantelor. Pe roșii, fructele tinere sunt invadate și cad, larvele mai mari pot găuri fructele mai bătrâne (Reed, 1965; Wang, Li, 1984; Țugulea, Derjanschi, 2015; Munteanu-Molotievskiy *et al.*, 2019; CABI Compendium, *Helicoverpa armigera*, 2022).

***Spodoptera exigua* (Hübner, 1808)**

Poziția sistematică. Genul *Spodoptera* Guenée, 1852 aparține familiei Noctuidae. Sinonime: *Caradrina exigua* Hübner, *Laphygma exigua* Hübner, *Laphygma flavimaculata*, *Noctua exigua* Hübner, *Spodoptera flavimaculata* (Harvey), *Susunai exigua* Hübner, *Caradrina venosa* Butler (CABI Compendium, *Spodoptera exigua*, 2022).

Particularități morfologice. Adulții sunt de dimensiuni medii, cu o anvergură a aripilor de 25-30 mm. Aripile anterioare sunt de culoare gri și maro, cu benzi neregulate și o pată deschisă în formă de fasole în apropierea centrului. Aripile posterioare sunt de un alb mai uniform sau alb murdar, cu o linie întunecată lângă margine (figura 2.21). Ouăle sunt depuse în grupuri de 50-150, verzui până la alb și sunt acoperite cu un strat de solzi albi care conferă masei de ouă un aspect neclar sau de bumbac. Larvele sunt de la verde pal până la galben în primele



Fig. 2.21. *Spodoptera exigua* (Hübner), aspectul exterior *

două stadii. Larvele mai mari variază în aspect. Larvele mari tind să fie verzi până la verde închis pe partea dorsală și pot avea o serie de liniuțe care dau aspectul unor linii longitudinale pe spate. Larvele mari au, în general, o linie întunecată de-a lungul părții laterale a corpului, cu o linie deschisă sub linia întunecată. Partea inferioară a larvelor mari este în general roz sau galbenă. Pe al doilea segment din spatele capului, există o mică pată neagră pe fiecare parte a corpului. Acest loc devine de obicei vizibil pentru observatorul de câmp atunci când omida atinge aproximativ 1 cm. Locul poate fi greu de văzut pe o omidă întunecată. Larvele variază de la câțiva mm până la aproximativ 2 cm (CABI Compendium, *Spodoptera exigua*, 2022).

Particularități biologice și ecologice. Activitatea sezonieră variază considerabil în funcție de climă. În regiuni mai calde, toate stadiile ontogenetice pot fi întâlnite pe tot parcursul anului, deși rata de dezvoltare și abundența generală sunt reduse în timpul lunilor de iarnă (Tingle, Mitchell, 1977). Ciclul de viață poate fi finalizat în doar 24 de zile (Wilson, 1934). Femela pe parcursul perioadei de ovipoziție, depune în jur de 300-500. Ouăle sunt grupate de obicei câte 50, uneori se întâlnesc grupuri a câte 150. Perioada de incubare a ouălor până la eclozare are o durată medie de 2-3 zile. Larva parcurge toate stadiile de dezvoltare timp de aproximativ 11-27 zile în

dependență de planta gazdă. Stadiul de pupă decurge în sol și are o durată de cca 6-10 zile în dependență de temperatură. Insectele adulte trăiesc aproximativ 10-14 zile (Azidah, Sofian-Azirun 2006a: 2006b).

Răspândirea. Specia provine din Asia de Sud-Est, și-a extins arealul geografic în afara Asiei, devenind o specie invazivă. Se găsește în regiunile temperate și subtropicale de pe tot globul, inclusiv în China, Japonia, Regatul Unit, Scandinavia, Statele Unite, America de Sud, Africa și Noua Zeelandă (Zheng *et al.*, 2011). În Republica Moldova specia a fost raportată de Miller, Zubovschi și Ruscinski în 1929 (Miller *et al.*, 1929; Munteanu-Molotievskiy *et al.*, 2019). Răspândirea în Europa este prezentată în figura 2.22.



Fig. 2.22. Răspândirea geografică a speciei *Spodoptera exigua* (Hübner) în Europa (reprodus după [www. http://www.eu-nomen.eu/](http://www.eu-nomen.eu/))

Relații trofice și importanța economică. Specia *S. exigua* are o gamă largă de plante gazde și este un dăunător semnificativ în special al culturilor legumicole. Legumele cele mai afectate sunt broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*), varza (*Brassica oleracea*), conopida (*Brassica oleracea* var. *botrytis*), sfecla (*Beta vulgaris*), plantele din familia Solanaceae cum cum ar fi cartoful (*Solanum tuberosum*), roșiile (*Solanum lycopersicum*), vinetele (*Solanum melongena*) și alte culturi agricole precum ardeiul (*Capsicum annuum*), ceapa (*Allium cepa*), ridichea (*Raphanus sativus*), spanacul (*Spinacia oleracea*) și țelina (*Apium graveolens*). Printre culturile deteriorate de *S. exigua* se numără de asemenea fasolea (*Phaseolus spp.*), năutul (*Cicer arietinum*), mazărea (*Pisum sativum*), lucerna (*Medicago sativa*), porumbul (*Zea mays*), sorgul (*Sorghum sp.*), soia (*Glycine max*), sfecla de zahăr (*Beta vulgaris*) ș.a. (Gre-

enberg *et al.*, 2001). Larvele consumă atât frunzele cât și fructele, în procesul hrănirii perforază fructele, lasă în urmă produsele activității metabolice care contaminatează produsul și duc la putrezirea acestuia (Munteanu-Molotievskiy *et al.*, 2019).

***Lymantria dispar* (Linnaeus, 1758)**

Poziția sistematică. Genul *Lymantria* Hübner, 1819 aparține familiei Erebidae. Sinonime: *Phalaena dispar* Linnaeus, 1758, *Ocneria dispar* (Linnaeus, 1758), *Por-thetria dispar* (Linnaeus, 1758).

Particularități morfologice. Adulții prezintă dimorfism sexual. Masculul are un corp de culoare cenușiu-brun, cu semne întunecate pe aripi. Anvergura aripilor este de aproximativ 3-4 cm. Antenele sunt mult mai lungi decât la femelă. Femela are corpul și anvergura mai mare a aripilor (4-7 cm). Aripioarele sunt practic albe, cu benzi ondulate, negre pe aripile anterioare. Abdomenul este alb cu peri gălbui (Sharov *et al.*, 1995; Contarini *et al.*, 2009; Tobin *et al.*, 2013) (figura 2.23). Ouăle sunt cenușii, (aproximativ 1 mm diametru) depuse în grupuri unice, sau în mase, de la 80 la 1200. Masele de ouă au aproximativ 2-5 mm lungime, 0,5-2 mm lățime și sunt acoperite de un strat dens, gălbui, de păr desprins de pe abdomenul femelei. Masele de ouă se găsesc în principal pe trunchiuri sau ramuri inferioare ale arborilor, dar și pe stânci, pereți, garduri etc.

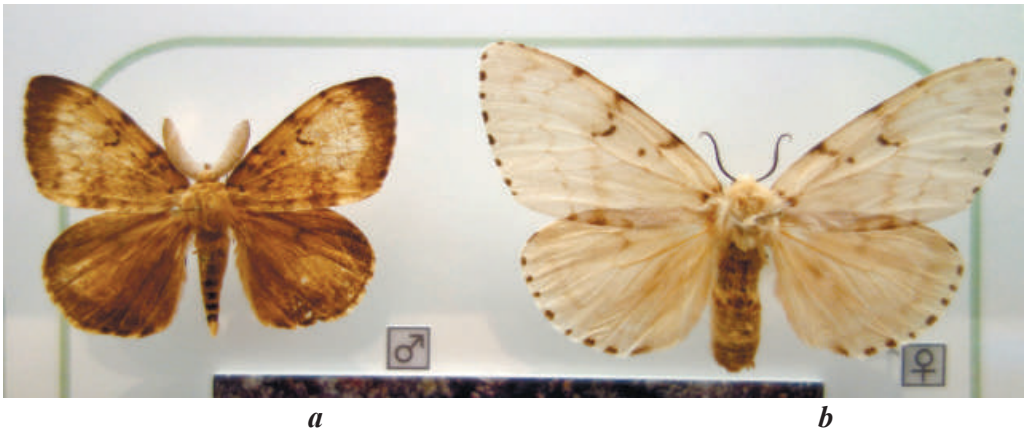


Fig. 2.23. *Lymantria dispar* (L.) aspectul exterior *

a. ♂, *b.* ♀

Specia prezintă 5-6 stadii larvare (von Wellenstein, Schwenke, 1978). Larvele din primul stadiu au aproximativ 3 mm lungime. Larvele mature ale masculilor ating o lungime de aproximativ 40-50 mm, iar larvele femelelor aproximativ 60-70 mm. Toate stadiile sunt păroase, dar prezintă variații semnificative în colorarea lor. Primele stadii larvare sunt gri-negru. Stadiile ulterioare sunt mai colorate, cu desen negru, galben, albastru și roșu. Capul este predominant închis la culoare în primele trei stadii și galben în ultimele trei stadii. Principala caracteristică a larvelor este prezența a două rânduri de negi albaștri pe primele cinci segmente

și două rânduri de negi roșii pe următoarele șase segmente (CABI Compendium, *Lymantria dispar*, 2022).

Pupele sunt de culoare maro închis cu peri roșiatici și sunt prinse de trunchiuri, pietre sau alte obiecte prin fire de mătase. Pupele de masculi și femele au 2-3 cm și, respectiv, 3-4 cm lungime. Pupele se găsesc, de asemenea, în crăpăturile scoarței sau în alte locații criptice (inclusiv sub benzile de pânză) (CABI Compendium, *Lymantria dispar*, 2022). Moliile de origine asiatică și europeană sunt similare din punct de vedere morfologic, dar diferă în caracteristicile lor ecologice și comportamentale, de exemplu, în capacitatea lor de zbor, preferințele gazdei etc. Au fost găsite diferențe genetice importante (Bogdanowicz *et al.*, 1993; Keena *et al.*, 2008; CABI Compendium, *Lymantria dispar*, 2022).

Particularități biologice și ecologice. Peste tot specia este monovoltină. Ouăle trec prin diapauză vară-toamnă-iarnă. Populațiile nordice au nevoie de suficientă căldură toamna și frig moderat (sub 0°C) la începutul iernii pentru formarea omizilor în timpul ouălor și diapauzei normale. Populațiile sudice au o perioadă mai scurtă de diapauză, fără răcire. Dăunătorul se caracterizează prin plasticitate ecologică, adică tipurile locale din fiecare habitat diferă oarecum în specializarea alimentară și eclozarea omizilor. Omizile dezvoltate din ouă sunt foarte rezistente la îngheț, tolerând înghețurile reci până la -50°C. Eclozarea omizilor este de lungă durată (aproximativ o lună) primăvara, apare când temperaturile medii zilnice ajung la 6°C sau mai mult. Omizile tinere sunt acoperite cu păr foarte lung, care depășește dimensiunea corpului și promovează transportul de vânt pe distanțe semnificative. Omizile eclozate se strecoară de-a lungul trunchiurilor în coroană, unde mănâncă frunzele care apar. Împuparea are loc la sfârșitul primăverii sau la începutul verii pe crengile și trunchiurile copacilor. Faza pupală durează aproximativ 2 săptămâni. Zborul moliei începe la sfârșitul lunii iunie, începutul lui august în zonele reci. Pretutindeni perioada de zbor este de lungă durată, în funcție de localizarea speciei, expunerea versanților, disponibilitatea plantelor gazdă etc. Dezvoltarea embrionară durează 24-30 de zile. Moliile (precum și omizile tinere) sunt migranți pasivi, găsiți la sute de kilometri distanță de centrele de reproducere în masă. Condițiile optime pentru imago sunt temperaturi de 23-29°C, viteza vântului de 2-4 m/s, înnoarea cuprinsă între 3-10 puncte și ploii limitate. Fecunditatea este de peste 500 de ouă (Grihanov, Ovsyannikova, 2008).

Răspândirea. Specie transpaleartică. Populează Europa de Vest (cu excepția Nordului Îndepărtat), Asia Mică, nordul Irakului, Iran, nordul Mongoliei, nord-estul și centrul Chinei, Japonia (Hokkaido, Honsyu), Coreea, Africa de Nord, America de Nord (sud-estul Canadei și SUA) (introduș), țările baltice, Bielorusia, Ucraina, Moldova, Transcaucazia, Kazahstan și Asia Centrală (în special în munți). În Rusia, este distribuită în întreaga regiune europeană (cu excepția nordului), Caucazul de Nord, sudul Uralului, Transbaikalia, sudul Siberiei și Orientul Îndepărtat, inclusiv regiunea Amur, teritoriile Primorskii și Khabarovsk, Sahalin și I. Kurile. Răspândirea în Europa este prezentată în figura 2.24. Forma europeană a fost introdusă accidental

din Franța în Massachusetts, SUA, în 1869. S-a răspândit treptat spre sud, nord și vest pentru a ajunge în Canada în 1924. Astăzi este considerată stabilită permanent în toate statele, New England până la Virginia, West Virginia, Ohio și Wisconsin și în provinciile canadiene Ontario, Quebec, New Brunswick și Nova Scotia. Masculii sunt prinși în mod regulat în alte state din SUA și provincii canadiene unde se desfășoară programe de eradicare pentru a preveni apariția acestui dăunător (Hajek, Tobin, 2009; Kean *et al.*, 2015). Programele de eradicare se concentrează și pe forma asiatică a omizii păroase a stejarului.



Fig. 2.24. Răspândirea geografică a speciei *Lymantria dispar* (L.) în Europa
(reprodus după [www. http://www.eu-nomen.eu/](http://www.eu-nomen.eu/))

Relații trofice și importanța economică. Omizile polifage dăunează la peste 600 de specii de plante din 98 de familii. Cele mai preferate gazde sunt plantele din familiile Rosaceae, Fagaceae, Betulaceae, Salicaceae, Pinaceae, Rutaceae, Aceraceae și Tiliaceae. Omizile mănâncă mugurii, frunzele și organe generative. Printre culturile pomicole, mărul, părul, cireșul și vișinul sunt mai des deteriorate, la fel ca și caisele în Orientul Îndepărtat și Asia Centrală. Omizile dăunează de asemenea culturilor viticole și nucifere. În Republica Moldova una din speciile extrem de afectate este stejarul (Gavriliță *et al.*, 2014). În medie, pe parcursul întregii sale vieți, o singură larvă consumă în total aproximativ 1 m² de frunziș (Doane, McManus, 1981).

2.4. Metode utilizate în combaterea insectelor dăunătoare

• Măsuri agrotehnice

Măsurile agrotehnice utilizate pentru a combate specia *Byctiscus betulae* constau în alegerea corectă a locației pentru plantarea unei grădini (pogorie). Acestea ar trebui să fie soluri bine drenate în zone suficient de îndepărtate de păduri și plantații de fructe sălbatice. Colectarea în timp util a „trabucurilor” căzute, cu arderea ulterioară, arătura de toamnă pot reduce semnificativ numărul dăunătorilor (Korchagin, 1971). Scuturarea gândacilor din coroanele copacilor pe o pânză densă și distrugerea mecanică ulterioară se efectuează primăvara, în perioada de la ieșire a insectelor din locurile de la iernare și până la sfârșitul depunerii ouălor. În total, se recomandă efectuarea a cel puțin 3-4 scuturări. Numărul exact este determinat de observația vizuală (Savkovskij, 1990). Primăvara, în jurul tulpinilor sunt așezate paie și alte materiale impregnate cu preparate insecticide. Capcanele nu sunt îndepărtate până la sfârșitul toamnei. Metoda inelelor lipicioase este eficientă în prevenirea pătrunderii insectelor adulte în coroana copacului (Vasiliev, 1989).

Prezența și abundența dăunătorilor pomilor fructiferi *Neocoenorrhinus pauxillus*, *Sciaphobus squalidus* și *Tatianaerhynchites aequatus* înainte ca aceasta să devină evidentă, poate fi determinată prin scuturarea ramurilor arborilor pe bucăți de pânză și cuantificarea insectelor și fructelor vătămate. Cosirea culturilor furajere în perioada de ovipoziție în masă și eclozare a larvelor din speciile *Sitona lineatus*, *Hypera postica* și *Protapion apricans* favorizează reducerea efectivului numeric al dăunătorilor.

Adulții și larvele speciei *Leptinotarsa decemlineata* sunt ușor de văzut în câmp datorită dimensiunilor lor mari. *L. decemlineata* are tendința de se desprinde de plante la agitarea acestora și această caracteristică poate fi folosită pentru a detecta insectele ascunse printre frunziș. Eșantionarea vizuală a câmpurilor de cartofi a fost la fel de eficientă pentru estimarea densității populației ca metoda de eșantionare însoțită de prelevarea în sac a unei plante întregi sau cosirea cu fileul entomologic. Prelevarea de probe de sol pentru studiul insectelor iernante este o metodă sigură de evaluare a populațiilor de dăunători (CABI Compendium, *Leptinotarsa decemlineata*, 2022).

Migrația fluturilor din speciile *Helicoverpa armigera* și *Spodoptera exigua* poate fi urmărită folosind capcane luminoase și feromoni. Se recomandă monitorizarea regulată a culturilor, de aproximativ două ori pe săptămână, deoarece adulții invadează adesea culturile din jur sau buruienile (CABI Compendium, *Helicoverpa armigera*, 2022).

• Metode chimice

Pentru combaterea speciei *Byctiscus betulae* se recomandă pulverizarea coroanelor și trunchiurilor pomilor fructiferi și viței de vie cu piretroizi, compuși organo-fosforici, neonicotinoizi înainte de faza de înflorire.

Pentru a reduce impactul dănătorului *Neocoenorhinidius pauxillus* în Republica Moldova au fost înregistrate și omologate următoarele preparate: Actellic 50 EC (pirimifos-metil, 500 g/l), Gorzi 400 EC (dimetoat, 400 g/l), se aplică prin stropire în perioada de vegetație (Registrul de Stat al produselor de uz fitosanitar și fertilizanților, 2023).

Contra speciei *Tatianaerhynchites aequatus* au fost înregistrate și omologate următoarele preparate: Anticleșci Maks, EC (pirimifos-metil+piridaben+acetamiprid, (200+150+50) g/l), Danadim 400 EC (dimetoat, 400 g/l), Fufanon 570 EC (malation, 570 g/l), Marvel (deltametrin, 25 g/l) distribuit prin stropire în perioada de vegetație (Registrul de Stat al produselor de uz fitosanitar și fertilizanților, 2023).

În Republica Moldova pentru a fi utilizate în combaterea speciei *Sciaphobus squalidus* au fost înregistrate și omologate următoarele preparate: Anticleșci Maks, EC (pirimifos-metil+piridaben+acetamiprid, 200+150+50 g/l), Colorit, SP (acetamiprid, 200 g/kg), Danadim 400 EC (dimetoat, 400 g/l), Decis Profi WG 25 (deltametrin, 250 g/kg), Dolor 20 SG (acetamiprid, 200 g/kg), Fostion, EC (malation, 570 g/l), Fufanon 570 EC (malation, 570 g/l), Ilimetrin 50/5 EC (clorpirifos+cipermetrin, (500+50) g/l), Marvel (deltametrin, 25 g/l), Opercot 5 WP (lambda-cihalotrin, 50 g/kg), Successor 400 EC (dimetoat, 400 g/l), Valsarel 530 EC (clorpirifos+cipermetrin, (480+50) g/l), modul recomandat de utilizare fiind pulverizarea în perioada de vegetație (Registrul de Stat al produselor de uz fitosanitar și fertilizanților, 2023).

În cazul în care există în medie de la 3 până la 6 adulți din speciile *Sitona lineatus* și *Hypera postica* pe m², în primele faze de creștere a plantelor, efectuarea unui control chimic este justificat. În Republica Moldova au fost înregistrate și omologate următoarele preparate: Decis f-Luxx EC 25 (deltametrin, 25 g/l), LAMBDA 050 CS (lambda-cihalotrin, 50 g/l), Proteus OD 110, (tiaclopid+deltametrin, 100+10 g/l), Sirocco, EC (dimetoat, 400 g/l). Pentru combaterea speciei *H. postica* au fost înregistrate și omologate următoarele preparate: Arrivo 25 EC (cipermetrin, 250 g/l), Dursban 480 EC (clorpirifos, 480 g/l) (Registrul de Stat al produselor de uz fitosanitar și fertilizanților, 2023).

Adulții speciei *Protapion apricans* perforează frunzele iar larvele distrug ovaarele trifoiului. Pragul economic de dăunare pentru trifoiul roșu variază între 4-10 adulți pe m². O densitate a insectei egală cu 2-3,5 indivizi din specia *Protapion apricans* per plantă implică necesitatea de a interveni cu măsuri fitosanitare de control (Kolarik, Rotrekl, 2013). În Republica Moldova nu sunt înregistrate și omologate preparate contra speciei *P. apricans* doar preparate cu spectru larg de acțiune contra coleopterelor curculionoide, precum Actellic 50 EC (pirimifos-metil, 500 g/l), Decimid EC, FASTAC 100 EC, (alfa-cipermetrin, 100 g/l), Karate Zeon 5 CS (lambda-cihalotrin, 50 g/l), aplicate prin stropire în perioada de vegetație (Moldovan *et al.*, 2022).

Registrul de Stat al Produselor de Uz Fitosanitar include cca 30 de preparate omologate pentru combaterea speciilor *Leptinotarsa decemlineata*, *Helicoverpa armigera* și *Spodoptera exigua* (Registrul de Stat al produselor de uz fitosanitar și fertilizanților, 2023). Insecticidele sunt aplicate ca intervenție unică, repetat sau continuu. Datorită duratei lungi de vară a dăunătorului, se efectuează 3-4 tratamente consecutive la intervale de 5-7 zile pentru fiecare generație. Pentru a preveni apariția rezistenței, se recomandă alternarea tratamentelor cu preparate din diferite grupuri.

O modalitate de a combate un focar masiv al speciei *Lymantria dispar* presupune prelucrarea plantațiilor cultivate și zonelor forestiere cu insecticide. În Republica Moldova au fost înregistrate și omologate 4 preparate printre care Actellic 50 EC (pirimifos-metil, 500 g/l), Karate Zeon 5 CS (lambda-cihalotrin, 50 g/l), Sămpai, EC (esfenvalerat, 50 g/l) și Sumi-alpha 5 EC (esfenvalerat, 50 g/l) (Registrul de Stat al produselor de uz fitosanitar și fertilizanților, 2023).

Utilizarea insecticidelor chimice rămâne a fi cea mai extensiv utilizată metodă de reducere a efectivului numeric al populațiilor insectelor dăunătoare. Metodele chimice sunt preferate din cauza costurilor mai reduse și posibilității de a controla printr-o aplicare a unui spectru larg de specii dăunătoare. Există date cu privire la toxicitatea și pericolul substanțelor active din majoritatea pesticidelor. Acestea prezintă un risc semnificativ pentru sănătatea omului, atât în cazul contactului direct în timpul manipulării cu aceste substanțe, cât și a reziduurilor de pesticide care sunt identificate în produsele alimentare și sursele de apă potabilă. Produsele alimentare cu reziduuri de pesticide, fiind consumate, afectează calitatea vieții și pot determina apariția unor patologii grave. De asemenea, pesticidele au un impact negativ asupra mediului, cât și asupra biodiversității (Damalas, Eleftherohorinos, 2011; Nicolopoulou-Stamati *et al.*, 2016). Mai mult de 98% din insecticidele utilizate pe lângă speciile considerate dăunătoare, distrug și un număr semnificativ de specii benefice (Miller, 2004). Insecticidele chimice duc la reducerea populațiilor de polenizatori sau inamici naturali care în mod natural reduc numericul dăunătorilor. Totodată, aplicarea repetată a preparatelor chimice sporește probabilitatea apariției rezistenței dăunătorilor la produsul utilizat (Damalas, Eleftherohorinos, 2011; Nicolopoulou-Stamati *et al.*, 2016). Din cauza efectelor adverse unele din aceste produse (spre exemplu forat, aldicarb, carbofuran, carbosulfan ș.a) deja sunt interzise spre utilizare în mai multe state (Anexa III, Convenția de la Rotterdam). Sunt realizate cercetări în scopul identificării unor produse alternative, fiind dezvoltate noi tipuri de preparate 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 (Nishimoto, 2019; Moldovan *et al.*, 2022).

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.

• Preparatele entomopatogene bacteriene

Controlul biologic reprezintă una din abordările de succes în managementul populațiilor de insecte dăunătoare. Acesta promovează utilizarea agenților de control, organisme vii (parazitoizi, prădători, microorganisme) și virusuri, sau aplicarea atractanților, pentru a gestiona efectivul numeric al dăunătorilor.

Cca 5 % din cantitatea de pesticide vândute global sunt biopesticide pe bază de microorganisme entomopatogene. Putem atesta o tendință internațională de creștere a vânzărilor de biopesticide, ponderea cărora pe piața mondială este în creștere. Specia *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) este una din cel mai intens exploatate bacterii în scopul utilizării în calitate de biopesticid microbial. În cadrul speciei au fost identificate numeroase subspecii cu diferit grad de specificitate și potențial de a fi utilizate împotriva unor grupuri variate de dăunători. Au fost identificate tulpini care pot fi utilizate în calitate de agenți de control biologic, a speciilor de insecte din ordinele Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, și alte ordine de insecte (Schnepf *et al.*, 1998; van Frankenhuyzen 2000; Moldovan *et al.*, 2017). Datorită faptului că tulpinile de *B. thuringiensis* manifestă specificitate înaltă de acțiune, și totodată inofensivitate pentru om și pentru flora și fauna nevizată (Hernandez-Fernandez, 2016), acestea sunt considerate agenți de control biologic promițători. Biopesticidele pe bază de *Bt* sunt cotate ca cel mai de succes bioinsecticid al ultimului secol (Fernandez-Chapa *et al.*, 2019). În baza tulpinilor de *Bt* și a substanțelor produse de acestea, sunt dezvoltate peste 100 de preparate bacteriene de control al insectelor dăunătoare, reprezentând peste 90% din pesticidele biologice disponibile în comerț (Olson, 2015; Fernandez-Chapa *et al.*, 2019).

Pe piața internă a Republicii Moldova sunt înregistrate mai multe bioinsecticide de natură virală, și anume: Virin ABB-3, Virin HS-P, Virin HS-2, Virin-MB, Virin-OS, Vitin-CP utilizate împotriva dăunătorilor *Hyphantria cunea*, *Heliothis armigera* (*sin. Helicoverpa armigera*), *Mamestra brassicae*, *Agrotis segetum*, *Agrotis exclamationis*, *Autographa gamma*, *Cydia pomonella* și *Trialeurodes vaporariorum* (Volosciuc, 2015; Zavtoni *et al.*, 2019; Registrul de Stat al produselor de uz fitosanitar și fertilizanților, 2023) și un preparat de natură fungică Verticilină granulară – BL, pe baza tulpinii din specia *Verticillium lecani*. Norma de consum constituie 0,1-0,2 l/m² fiind aplicată pentru protecția castraveților în sere de larvele speciei *Trialeurodes vaporariorum* (Timuș, 2021). De asemenea, pe piața națională există 4 produse pe bază de *B. thuringiensis*, spre exemplu preparatul Bio Star 2,2% (Marea Britanie), cu activitate insecticidă împotriva speciilor *Cydia funebrana*, *Rhagoletis cerasi*, *Lobesia botrana* și *Cydia pomonella* și Aktoverm Formula (Ucraina) care acționează asupra dăunătorilor *Oulema melanopus*, *Etiella zinckenella*, *Meligethes aeneus*, *Ceuthorrhynchus quadridens*,

Cydia pomonella și *Aphis pomi* (Registrul de Stat al produselor de uz fitosanitar și fertilizanților, 2023).

Toate preparatele comerciale de *Bacillus thuringiensis* și *B. sphaericus* provin dintr-o tulpină producător care este utilizată pentru a obține culturi starter, ulterior cultivate în biofermentatoare în mediu lichid, procesul de producție finalizând cu recoltarea și depozitarea. Tulpina producător este de obicei menținută sub formă de spori liofilizați sau pulberi depozitate în condiții controlate. Tulpina este brevetată și menținută în colecție.

Din punct de vedere al costurilor producția locală de biopesticide este semnificativ mai eficientă pentru fermieri decât importul de preparate, deoarece prețurile de pe piața internațională depășesc capacitatea de cumpărare a acestora. Astfel, obținerea tulpinilor autohtone, caracterizarea proprietăților sale morfo-fiziologice, biochimice, molecular genetice, evidențierea patogenității și virulenței acestora, constituie un pas semnificativ în asigurarea pieții locale cu biopesticide. Obținerea unor tulpini native virulente va permite producerea bioinsecticidelor în țară, ceea ce va reduce semnificativ din costul final al produsului, devenind mai accesibil pentru producătorii agricoli. De asemenea, utilizarea tulpinilor autohtone va contribui la reducerea riscurilor ecologice asociate cu introducerea unor organisme străine în ecosisteme și dereglarea funcționării acestora. În perspectivă bioinsecticidele obținute în baza tulpinilor autohtone pot fi aplicate în cadrul diverselor tipuri de sisteme agricole (Moldovan, 2017; Moldovan *et al.*, 2022).

3 | METODE DE STUDIU A BACTERIILOR ENTOMOPATOGENE

3.1. Colectarea materialului pentru izolarea bacteriilor entomopatogene

Recunoașterea insectelor bolnave în câmp sau ulterior în laborator se bazează pe diagnosticul patologic inițial și constatarea prezenței unor semne evidente ale infecțiilor. Insectele care sunt infectate evident cu entomopatojeni manifestă adesea simptome și semne caracteristice (numite uneori sindrom), de exemplu, schimbări ale culorii, semne ale agentului patogen sau etiologic din interiorul gazdei care sunt vizibile prin cuticulă, comportament deosebit inclusiv lipsa comportamentului de hrănire sau poziția neobișnuită pe planta gazdă, tremurături, mumificare, fragilitate sau întărire a tegumentului, diferență notabilă în mărime, și alte semne și simptome. În unele cazuri, simptomele bolii pot fi foarte subtile sau inițial nevizibile, de exemplu, efecte subletale, longevitate redusă etc.

Din păcate, insectele moarte reprezintă un mediu excelent pentru o mare diversitate de specii de microorganisme saprofite. Chiar și insectele care au fost ucise ca urmare a unora dintre speciile entomopatogene pot fi invadate de bacterii nepatogene. Aceste invazii, de obicei, au ca rezultat, o populație mixtă constituită din diverse specii de microorganisme. Când în insectă se găsește doar o specie de bacterii sau o specie bacteriană predominantă, este un indiciu că insecta ar fi murit din cauza septicemiei bacteriene. Unii entomopatojeni bacterieni inițial nu sunt letali pentru insectele lor gazdă, dar la insectele vii pot fi observate unele semne și simptome ale infecției. Modificările de culoare datorate unor bacteriemii ale insectelor sunt destul de distincte. Larvele infectate pot deveni albe, roșii, negre sau maro. Insectele recent ucise devin zbârcite și fragile. În timp, corpul insectelor devine rigid. Agentul de control microbial cel mai frecvent utilizat, *Bacillus thuringiensis*, poate produce o serie de simptome la insecte, în funcție de subspecia sau tulpina bacteriei și de insecta gazdă. Deoarece modul de acțiune predominant este toxicitatea în intestinul mediu, insectele pot fi ucise din cauza toxemiei cu sau fără reproducerea ulterioară a bacteriei în hemocel. Înainte de moarte, multe specii încetează să se hrănească și părăsesc locul lor inițial de hrănire sau chiar planta gazdă. Astfel diagnosticul primar în câmp poate sugera anumite infecții bacteriene dar nu este un criteriu determinant pentru selecția specimenilor care urmează a fi utilizați pentru izolarea entomopatogenilor bacterieni.

Bacteriile patogene pentru insecte pot fi găsite într-o varietate de habitate din întreaga lume, inclusiv apă, sol, plante și animale. Majoritatea bacteriilor entomopatogene fac parte din diviziunile Gracilicutes (în principal bacterii Gram-negative) și Firmicutes (bacterii Gram-pozitive) și aparțin în mare parte familiilor *Bacillaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Streptococcaceae* și *Micrococcaceae* (Ta-

nada, Kaya, 1992). Cele mai cunoscute bacterii patogene pentru insecte fac parte din familia *Bacillaceae*. Speciile din genul *Bacillus* sunt în principal bacterii din sol (Nicholson, 2002), dar sunt omniprezente și pot fi izolate dintr-o mare varietate de surse. Metodele generale de izolare a tulpinilor de *Bacillus* spp. presupun prelevarea aleatorie de sol, frunze, materie vegetală, animale și insecte moarte (larve sau adulți). Dacă se dorește izolarea unei tulpini entomopatogene, cercetările urmează a fi orientate spre identificarea exemplarelor infectate în habitatelor lor naturale. Fiecare exemplar urmează a fi colectat într-un recipient individual, steril pentru a evita contaminarea. Este important de a înregistra datele privind data colectării, coordonatele geografice ale locului de unde s-a prelevat specimenul, caracteristicile descriptive ale habitatului, specia/genul, dacă pot fi identificate în timpul colectării, starea fiziologică, ș.a. Este important de a nota informații cu privire la măsurile de management al dăunătorilor aplicate în cadrul ecosistemului investigat (Fisher, Garczynski, 2012).

În scopul izolării tulpinilor de bacterii entomopatogene, pe parcursul anilor 2007-2022 au fost întreprinse un șir de expediții în ecosisteme agricole pe teritoriul Republicii Moldova. În perioada lunilor septembrie 2007 și aprilie-iulie 2008 au fost cercetate nouă livezi din partea centrală și de sud-est a Republicii Moldova. Insectele au fost prelevate de pe pomi de măr, prun și cireș infestați. În câmpurile cu lucernă au fost realizate investigații pe parcursul anilor 2010 – 2016 iar în culturile de tomate au fost realizate cercetări pe parcursul anilor 2017-2022 în 14 localități din 4 raioane ale Republicii Moldova. Pentru colectarea insectelor au fost utilizate metode clasice entomologice (Bacal *et al.*, 2014), care includ cosirea cu fileul entomologic, scuturarea insectelor pe bucăți de pânză, colectarea manuală. Insectele au fost colectate cu un interval de 10 zile pe parcursul perioadei de vegetație (Bacal *et al.*, 2014). Detaliile privind locurile de colectare sunt prezentate în tabelul 3.1. (Malevanciuc, Munteanu, 2010; Munteanu *et al.*, 2014 a; Munteanu-Molotievskiy *et al.*, 2019; Moldovan *et al.*, 2022).

Pentru realizarea cercetărilor au fost colectate exemplare adulte din speciile *Neocoenorhinidius pauxillus*, *Sciaphobus squalidus*, *Tatianaerhynchites aequatus*, *Phyllobius oblongus*, *Sitona lineatus*, *Hypera postica*, *Protapion apricans*, *Leptinotarsa decemlineata* și larve de *Byctiscus betulae*, *Helicoverpa armigera*, *Spodoptera exigua*, *Lymantria dispar* ș.a. (tabelul 3.1)

Tabelul 3.1. Date privind colectarea materialului biologic

Nr.	Planta gazdă	Specia	Stadiul	Locul colectării	Coordonate geografice
1.	cireș	<i>Tatianaerhynchites aequatus</i> (L.)	adult	com. Bacioi, mun. Chișinău	46°54'44"N 28°53'02"E
				s. Butuceni, r. Criuleni	47°18'05"N 28°58'21"E
				s. Iordanovca, r. Basarabeasca	46°23'38"N 28°54'33"E
2.	măr	<i>Byctiscus betulae</i> (L.)	larvă	or. Chișinău	47°00'20"N 28°51'07"E
				s. Volintiri, r. Ștefan-Vodă	46°25'36"N 29°36'21"E
		<i>Neocoenorhinidius pauxillus</i> Germ.	adult	s. Volintiri, r. Ștefan-Vodă	46°25'36"N 29°36'21"E
				<i>Phyllobius oblongus</i> (L.)	adult
		s. Pânășești, r. Strășeni	47°09'11"N 28°31'07"E		
		<i>Sciaphobus squalidus</i> (Gyll.)	adult	com. Bacioi, mun. Chișinău	46°54'44"N 28°53'02"E
				s. Calfa, r. Anenii-Noi	46°54'15"N 29°22'31"E
		<i>Tatianaerhynchites aequatus</i> (L.)	adult	s. Calfa, r. Anenii-Noi	46°54'15"N 29°22'31"E
				or. Chișinău	47°00'20"N 28°51'07"E
				s. Căpriana, r. Strășeni	47°15'08"N 28°46'08"E
s. Pânășești, r. Strășeni	47°09'11"N 28°31'07"E				
3.	prun	<i>Sciaphobus squalidus</i> (Gyll.)	adult	s. Peresecina, r. Orhei	47°15'08"N 28°46'08"E
				s. Volintiri, r. Ștefan-Vodă	46°25'36"N 29°36'21"E
		<i>Neocoenorhinidius pauxillus</i> Germ.	adults	s. Volintiri, r. Ștefan-Vodă	46°25'36"N 29°36'21"E

Nr.	Planta gazdă	Specia	Stadiul	Locul colectării	Coordonate geografice
4.	lucernă	<i>Sitona lineatus</i> L., <i>Hypera postica</i> (Gyll.) <i>Protapion apricans</i> (Hbst.)	adult	s. Copanca, r. Căușeni	46°42'55"N 29°37'37"E
				s. Ivancea, r. Orhei	47°17' 08" N 28°51'17" E
				or. Glodeni	47°46' 15" N 27°30' 52" E
				s. Sireți, r. Strășeni	47°08'02" N 28°42'51" E
				s. Lozova, r. Codrii	47°07'58" N 28°23'09" E
				s. Vrancești, r. Orhei	47°24'11" N 27°36'07" E
				s. Congaz, UTA Găgăuzia	46°03' 04" N 28°34' 13" E
				5.	tomate
s. Boșcana, r. Criuleni	47.1244 N 29.0072 E				
s. Corjova, r. Criuleni	47.0963 N 29.1716 E				
s. Dubăsari-Vechi, r. Criuleni	47.1338 N 29.1977 E				
s. Slobozia-Dușca, r. Criuleni	47.16654 N 29.12052 E				
s. Puhăceni, r. Anenii-Noi	47°5'20"N 29°20'48"E				
s. Mereni, r. Anenii-Noi	46.96333°N 29.05500°E				
s. Speia, r. Anenii-Noi	47.00667°N 29.29722°E				
s. Răzeni, r. Ialoveni	46.767°N 28.9°E				
s. Horești, r. Ialoveni	46°49'36"N 28°52'19"E				
s. Pelivan, r. Orhei	47°13'02"N 29°09'05"E				
or. Nisporeni (Bălănești)	47.2061 °N 28.0658 °E				
<i>Leptinotarsa decemlineata</i> Say	adult	or. Căușeni	46°40'00"N 29°15'00"E		
<i>Leptinotarsa decemlineata</i> Say	adult	s. Brăviceni, r. Orhei	47°25'54"N 28°39'33"E		

Pentru experiențele privind evaluarea activității insecticide, insectele vii din aceeași specie au fost transportate în cutii cu material vegetal proaspăt, asigurând accesul aerului, evitând expunerea la radiațiile UV și căldură excesivă. Pentru izolarea bacteriilor exemplare din fiecare specie studiată au fost plasate în eprubete sterile și transportate în laborator pe gheață pentru a preveni dezvoltarea microorganismelor. Dacă izolarea bacteriilor nu a fost realizată imediat după transportarea insectelor în laborator, acestea au fost plasate în congelator la $t = -20^{\circ}\text{C}$. Determinarea apartenenței specifice a exemplarelor prelevate a fost realizată cu utilizarea lupei binoculare BEL Photonics și a cheilor dihotomice de identificare (Mike's Insect Keys, *Opredelitel' nasekomyh evropejskoj chasti SSSR v pjati tomah*, 1965).

3.2. Izolarea și menținerea în cultură pură a bacteriilor entomopatogene

Izolarea bacteriilor din speciile *B. betulae*, *N. pauxilus*, *S. squolidus* și *T. aequatus* în perioada 2007-2008 a fost efectuată după metoda descrisă de autorii Thiery și Frachon (1997). Insectele utilizate pentru analiză inițial au fost sterilizate în alcool de 70% timp de 5 minute, ulterior acestea au fost spălate în apă distilată prin 5-6 mișcări de rotație. Insectele spălate au fost transferate în tuburi Eppendorf unde s-a adăugat 500 μl soluție tampon fosfat (PBS - Phosphat Buffered Saline, NaCl 0,137 M, KCl, 0,0027 M, Na_2HPO_4 0,01 M, KH_2PO_4 , 0,0018 M) ulterior conținutul fiind omogenizat bine. Insectele omogenizate au fost filtrate prin pânză de bumbac sterilă, din soluția filtrată 1 ml a fost transferat în tub steril în care s-au adăugat 3ml lichid NB (Nutrient Broth) și s-a incubat la temperatura de 30°C pentru 3-4 ore. După incubare 300 μl de omogenizat a fost transferat în altă eprubetă Eppendorf cu 3ml de mediu NB lichid și s-au preparat o serie de diluții decimale succesive (figura 3.1). Din eprubetele cu aceste diluții ulterior au fost însămânțate câte două cutii Petri, fiind plasate în termostat pentru creștere la întuneric, temperatura de 30°C pentru 1-3 zile.

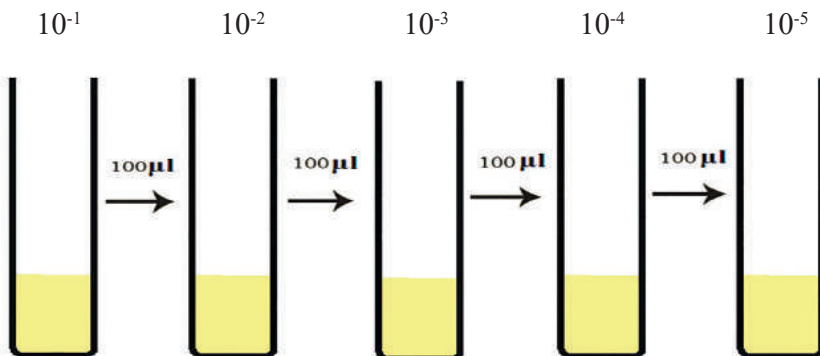


Fig. 3.1. Metoda diluțiilor decimale succesive (orig.)

Culturile bacteriene au fost reînsămânțate pe mediu nutritiv NA steril (tabelul 3.2) până la obținerea culturilor pure, fiind cultivate în aceleași condiții menționate mai sus. Pentru a asigura o izolare mai eficientă a tulpinilor native de *Bacillus thuringiensis* în cadrul cercetărilor efectuate în perioada anilor 2017-2019, a fost realizată sinteza literaturii de specialitate cu privire la izolarea tulpinilor noi de *Bt* din eșantioanele de insecte și a fost elaborat un protocol selectiv de izolare. Pentru a obține rezultate mai bune au fost efectuate unele ajustări, cum ar fi: temperatura și durata tratamentului termic, cantitatea de inocul per cutie Petri. Corpul insectelor a fost triturat intens în apă distilată sterilă, omogenatul a fost incubat la temperatura de 80°C, 10 min. sau la 65°C, 30 min., după care răcit rapid. Această etapă presupune distrugerea formelor vegetative a reprezentanților clasei Bacilli și altor bacterii nesporulate, sporind probabilitatea germinării sporilor bacteriilor din genul *Bacillus* (Fisher, Garczynskiy, 2012). Strategia experimentală este prezentată în figura 3.2.

După precipitarea componentelor solide din eprubete, o cantitate de 100 μ l, 150 μ l și 200 μ l și diluțiile zecimale ale acesteia (10^{-1} , 10^{-2} și 10^{-3}) din fiecare probă au fost distribuite uniform la suprafața cutiilor Petri cu mediu nutritiv T3 (tabelul 3.2) (Travers *et al.*, 1987; Moldovan *et al.*, 2018).

Se cunoaște că mediul nutritiv T3 inhibă parțial creșterea și sporularea *Bacillus* spp. în afară de *Bacillus thuringiensis*. Cutiile Petri au fost incubate la 30°C, monitorizate în fiecare zi și fotodocumentate la a 3-a zi de la însămânțare. Pentru a obține culturi pure, coloniile izolate au fost selectate vizual și transferate aseptice în cutii Petri pe mediu curat T3 și incubate la 30°C. Creșterea tulpinilor a fost monitorizată vizual fiecare 24 ore, fiind înregistrată prezența unui tip morfologic al culturilor bacteriene per cutie Petri. Pentru întreținerea de rutină culturile au fost inoculate pe mediu nutritiv NA (tabelul 3.2). Tulpinile izolate au fost lăsate timp de 10 zile pentru creștere. Ulterior acestea au fost plasate pentru păstrare de scurtă durată la temperatura de 4°C, iar pentru păstrare de lungă durată în soluție de glicerol 10%, la temperatura de -80°C.

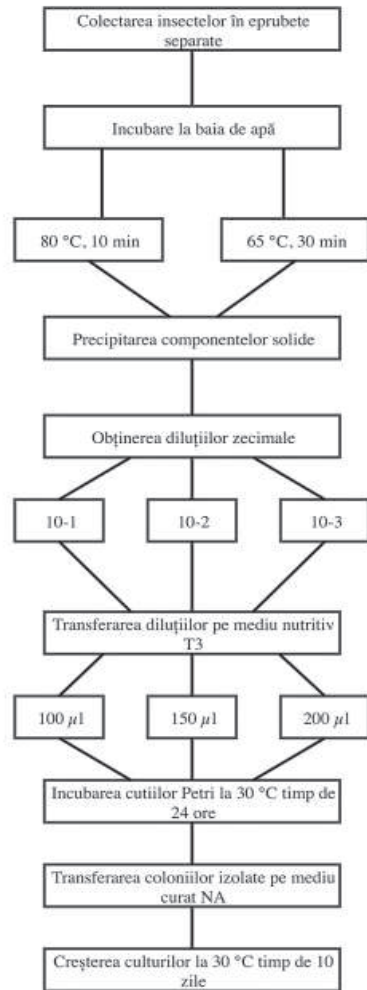


Fig. 3.2. Strategia experimentală de izolare a tulpinilor bacteriene (orig.)

Tabelul 3.2. Denumirea și compoziția mediilor nutritive utilizate pentru izolarea și cultivarea bacteriilor

Denumirea	Compoziție	Sterilizare
NA (Nutrient Agar)	Tryptose (Hidrolizat pancreatic din făină de pește) – 12 g/l; Tryptone – 12 g/l; NaCl – 6 g/l; Agar microbiologic – 10 g/l.	autoclavare 15 min., 121°C, 1,1 bar
NB (Nutrient Broth)	Tryptose (Hidrolizat pancreatic din făină de pește) – 12 g/l; Tryptone – 12 g/l; NaCl – 6 g/l;	autoclavare 15 min., 121°C, 1,1 bar
T3 (Travers <i>et al.</i> , 1987)	Triptonă (casein Trypsic Peptone) – 3 g/l; Triptoză – 2 g/l; Extract de drojdii – 1,5 g/l; NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O – 6,9 g/l; MnCl ₂ x 4 H ₂ O – 0,008 g/l; Agar microbiologic – 15 g/l N.B! pH 6,8 (se aduce la valoare cu NaOH).	autoclavare 15 min., 121°C, 1,1 bar

Tulpinile de bacterii entomopatogene izolate în cultură pură sunt cultivate la suprafață pe un mediu de îmbogățire, de exemplu mediul NA pentru întreținerea de rutină sporulare și producerea de cristale proteice (figura 3.3). Pentru a evita deshidratarea cutiile Petri pot fi sigilate cu parafilm. Reinocularea în serie pe medii artificiale urmează a fi evitată, deoarece acest lucru duce la modificări genetice care pot afecta fenotipul (atenuarea virulenței). Factorii care influențează creșterea bacteriilor pot include cerințe fizice (de exemplu, temperatură, pH, oxigen, presiunea osmotică) și cerințele de nutrienți (adică surse de energie, carbon, azot, minerale, apă, creștere factori). Creșterea se realizează de obicei la 30°C (Fisher, Garczynski, 2012). Sporularea se produce în decurs de 2-3 zile.

Păstrarea tulpinilor bacteriene trebuie să le mențină pe ambele: atât viabilitatea culturii, cât și caracteristicile sale biotehnologice. Numeroase probleme pot apărea fie în timpul manipulării, fie în timpul depozitării (mutație genetică, pierdere de plasmide, pierdere de caracteristici, selecția populațiilor rezistente) până când o tulpină este complet pierdută. Nicio metodă nu este 100% fiabilă iar unele sunt mai mult sau mai puțin adaptate anumitor specii. Există și alți parametri care dictează alegerea unei anumite metode de păstrare, cum ar fi costul, necesitatea de a expedia materialul, numărul de tulpini de depozitat, gestionarea stocurilor etc.. Pentru depo-



Fig. 3.3. Tulpina *Bacillus sp.*, aspect macroscopic (orig.)

zitarea pe termen scurt cea mai simplă metodă este de a menține cultura bacteriană pe cutii Petri sigilate cu parafilm și menținute la +4°C. Reinocularea culturii se face lunar (Fisher, Garczynski, 2012). Menținerea amestecurilor de spori și cristale în frigider la +4°C este fezabilă timp de 1-2 săptămâni. Pentru a extinde perioada de viabilitate a acestora amestecul de spori și cristale este mai bine să fie păstrat congelat la - 20°C. Cea mai potrivită formă de depozitare sunt granulele (Fisher, Garczynski, 2012). Depozitarea pe termen lung poate fi realizată prin congelare la temperaturi joase, depozitarea sporilor pe hârtie de filtru, și prin liofilizare. În cazul congelării la temperaturi joase (- 20°C) în calitate de crioprotector se utilizează soluția de glicerol de 10% (Fisher, Garczynski, 2012).

3.3. Caracterizarea proprietăților morfologice, fiziologice și biochimice ale tulpinilor bacteriene

Procedura de identificare a bacteriilor izolate a fost efectuată în conformitate cu „Manualul lui Bergey de bacteriologie sistematică”, („*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*”, Sneath *et al.*, 1986), cu „Manualul de tehnici în patologie a insectelor” („*Manual of Techniques in Insect Pathology, first edition*” Thiery, Frachon 1997) și „Manualul de tehnici în patologia nevertebratelor” a doua ediție, („*Manual of Techniques in Invertebrate Pathology, second edition*”, Ed. Lacey, 2012). Pentru a identifica tulpinile bacteriene, sunt studiate caracterele de cultură, morfologia și structura celulei, prezența/lipsa sporului și a cristalelor proteice, și proprietățile biochimice (figura 3.4).

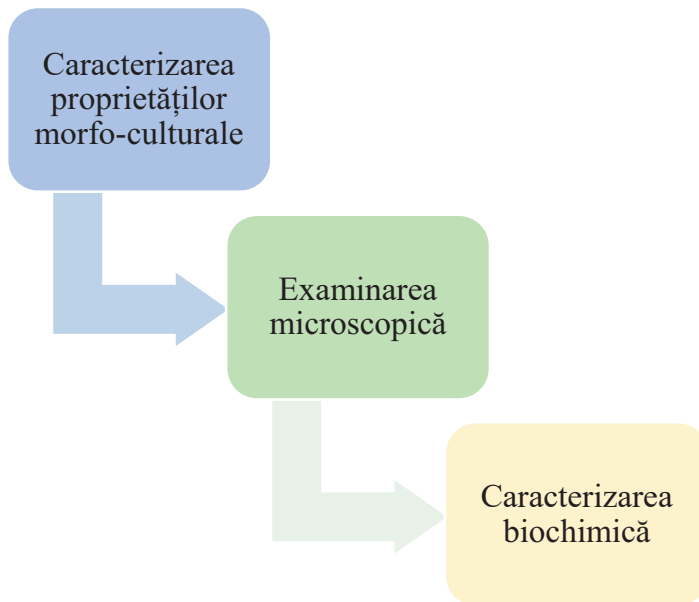


Fig. 3.4. Schema de caracterizare a tulpinilor bacteriene izolate (orig.)

• Caracterizarea proprietăților morfo-culturale ale tulpinilor izolate

Proprietățile morfo-culturale au fost studiate pe colonii inoculate în cultură pură pe mediul NA. Pentru studierea macroscopică a coloniilor bacteriene în lumina trecătoare, cutia se plasează perpendicular luminii. Se indică următoarele:

1. **Dimensiunile coloniilor** (mari, $\geq 4-5$ mm; medii, 2-4 mm; punctiforme < 2 mm).
2. **Forma coloniilor** (circulară regulată, neregulată, ameboidală, rizoidală, filamentoasă).
3. Înșușirile optice (transparentă, semitransparentă, netransparentă).
4. **Culoarea coloniilor** (transparentă/pigmentată – culoarea pigmentului).
5. **Caracterul suprafeței** (netedă/rugoasă, lucidă/opacă, umedă/uscată).
6. **Situarea coloniilor pe mediu** (la suprafață, în profunzime, bentonic).
7. **Profilul coloniei** (plat, bombat, convex, sub formă de crater sau de con).

Pentru studierea microscopică a coloniilor cutia Petri se instalează pe măsura microscopului. Folosind obiectivul 8X sau 10X se studiază cultura indicând următoarele:

1. **Marginea coloniei** (regulată, ondulată, lobată, filiformă).
2. **Structura coloniei** (omogenă, amorfă, granulară, fibrilară).

• Caracterizarea morfologiei și structurii celulare

Colorația Gram. Colorația Gram a fost efectuată conform metodei standard (Bartholomew, Mittwer, 1952; Claus, 1992). Frotiul din cultura bacteriană a fost uscat la temperatura camerei și fixat prin flambare. Pe frotiul fixat au fost adăugate 2 picături de gentian violet (5 mg/ml). Colorantul a fost menținut timp de 1-2 min. și înlăturat fără spălare. Se aplică soluție Lugol (I_2 în KI, 1%) și se menține timp de 1 min., după care se înlătură fără spălare. Frotiul se decolorează cu etanol timp de 30 sec., până la dispariția completă a culorii violete. Preparatul se spală cu apă și se colorează suplimentar cu fuxină Pfeiffer (5 mg/ml) (1-2 min). Colorantul se înlătură prin spălare cu apă, frotiul se usucă și se examinează la obiectivul 100x. Bacteriile Gram pozitive se colorează în violet, iar cele Gram negative se colorează în roz.

Colorația Schaeffer-Fulton (evidențierea endosporului). Pentru a determina prezența sporilor culturile au fost inoculate pe mediu nutritiv T3 (tabelul 3.2) și incubate în termostat la 30°C timp de 48 ore. Ulterior a fost aplicată colorarea după metoda Schaeffer-Fulton (Schaeffer, Fulton, 1933) cu unele modificări. Pe frotiul uscat a fost plasată hârtie de filtru și s-a picurat soluție verde de brilliant (3-4 picături). Lama se pune pe baia de apă și se menține timp de 5 minute, se răcește și se spală cu apă timp de 30 sec. Se aplică al doilea colorant – soluția de fuxină (în metoda originală se utilizează safranina) și se menține 20 de sec., după care colorantul se înlătură prin spălare. Frotiul se usucă și se examinează la obiectivul 90x cu ulei de imersie. Sporii se colorează în verde, iar celulele vegetative în roșu sau roz (Hussey, Zayaitz, 2007).

Evidențierea prezenței de spori și cristale (metoda Spore crystal mixture). Pentru a determina prezența cristalelor parasporale, culturile bacteriene au fost inoculate pe mediu T3 (tabelul 3.2) și crescute în termostat la 30°C timp de 5 zile

pentru a facilita sporularea. Culturile sporulate au fost suspendate în 1 ml soluție NaCl 1M și centrifugate timp de 5 min la 13 mii de rotații/min. După centrifugare probele au fost suspendate în H_2O_d și examinate la microscop cu contrast de fază la obiectivul 100x cu ulei de imersie (Kati *et al.*, 2007).

• **Verificarea capacității de creștere a coloniilor de bacterii pe medii cu diverse pH-uri.**

Se prepară mediul lichid NB (tabelul 3.2), se ajustează valoarea pH de la 5 la 9 și se sterilizează. Ulterior pentru fiecare cultură de bacterii se pregătesc eprubete cu 3 ml de mediu nutritiv preparate, ulterior în eprubete se inoculează bacteriile, eprubetele sunt incubate la temperatura de 30°C pentru 24 ore. Concentrația bacteriilor a fost verificată cu ajutorul spectrofotometrului (SpectraMax M2). pH-ul optim a fost determinat pentru tulpinile cercetate, după 16 ore de incubare la 30°C prin măsurarea densităților folosind un spectrofotometru (Spectramax M2) la OD600 (Ben-Dov *et al.*, 1995).

• **Caracterizarea proprietăților biochimice ale tulpinilor bacteriene**

Utilizarea Kitului de reactive API 20E. Pentru evidențierea caracteristicilor biochimice ale culturilor de bacterii poate fi utilizat kitul de reactivi API 20 E, care este un sistem standard pentru identificarea bacteriilor *Enterobacteriaceae* și altor bacterii Gram negative. Setul pentru identificare conține 21 teste mici cu substanțele biochimice deshidratate în care sunt inoculate coloniile de bacterii (figura 3.5).

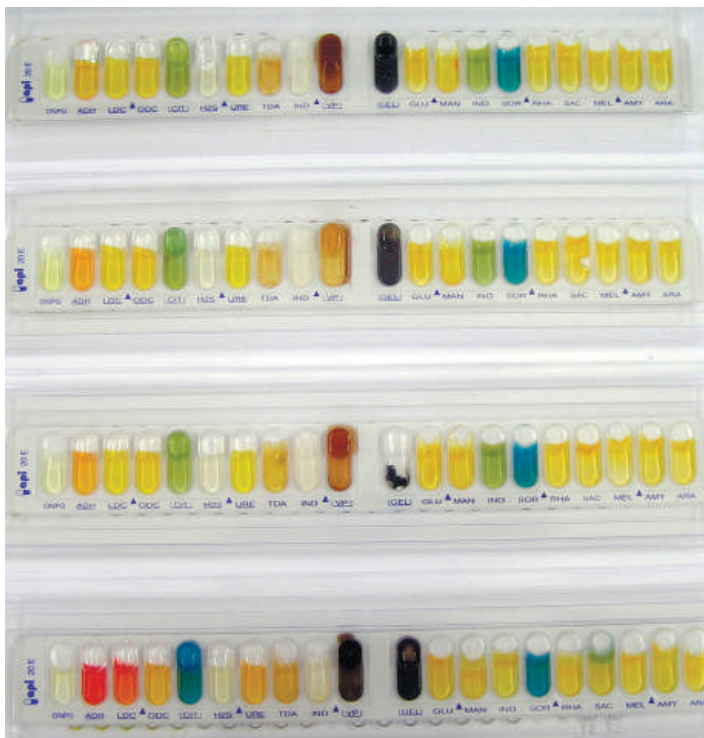


Fig. 3.5. Testul API 20E (bioMérieux). (orig.)

Kitul de reactivi API 20E a fost utilizat conform procedurii sugerate de Alsina și Blanch (1994), cu unele modificări. Culturile bacteriene au fost diluate în soluție de NaCl 0,85%. Cantitatea de bacterii a fost ajustată la $1 \times 10^{15-16}$ CFU/mL. Două sute de microlitri din această soluție au fost transferați în fiecare godeu al panourilor API 20E. Pentru a preveni contactul cu aerul, eprubetele au fost umplute cu ulei mineral. Panourile au fost incubate timp de 18-24 ore la 30°C. Rezultatele testelor au fost analizate prin raportare la tabelul de referință a kitului API 20E (Munteanu *et al.*, 2014).

În lipsa kit-urilor proprietățile biochimice pot fi determinate folosind metode standard, selectând un set de caracteristici definitorii care urmează a fi studiate.

Determinarea activității catalazei. Acest test demonstrează prezența catalazei, enzimei care accelerează descompunerea peroxidului de hidrogen în apă și oxigen. Catalaza servește pentru neutralizarea efectului bactericid al peroxidului de hidrogen (Reiner, 2010). Reacția pozitivă este confirmată de apariția rapidă a bulelor de oxigen (Clarke, Cowan, 1952).

În scopul stabilirii capacității tulpinilor bacteriene de a produce catalaza și de a estima activitatea acesteia tulpinile bacteriene au fost cultivate pe mediul nutritiv NA (tabelul 3.2) timp de 24h, la temperatura de 30°C. Pe suprafața coloniilor bacteriene se picură 2-3 picături de peroxid de hidrogen (H_2O_2). Apariția bulelor atestă că testul este pozitiv, iar absența lor atestă că testul este negativ. Intensitatea formării bulelor se evaluează pe o scară de la 1-5 (Reiner, 2010).

Determinarea activității proteolitice. Proteaza, numită și peptidaza sau proteinaza, este o enzimă care catalizează proteoliza, descompunerea proteinelor în polipeptide mai mici sau în aminoacizi, datorită clivării legăturilor peptidice. Celulele bacteriene produc proteaza pe parcursul creșterii. Activitatea proteolitică poate fi determinată prin evaluarea capacității culturilor bacteriene de a hidroliza cazeina și gelatina.

a) *Hidroliza cazeinei.* Pentru a evalua abilitatea tulpinii de a hidroliza cazeina, se pregătește mediul nutritiv MA (Milk Agar, Agar cu lapte). În H_2O_d se adaugă glucoza și agarul microbiologic și se amestecă minuțios până la dizolvarea agarului. Mediul se autoclavează timp de 15 min. la 121°C (tabelul 3.3). După autoclavare în mediul nutritiv se adaugă laptele ultrapasteurizat și se amestecă minuțios până la obținerea unei culori omogene.

Mediul nutritiv se distribuie în cutii Petri a câte 20 ml per cutie, și se lasă în cabinetul de biosiguranță până la solidificarea completă a acestuia. Mediul se inoculează cu cultură proaspătă care a fost cultivată preventiv pe mediul NA timp de 24 ore la 30°C, apoi se transferă în termostat la 37°C pentru 24 ore. După incubare se analizează rezultatul. Apariția zonelor transparente în jurul coloniilor confirmă hidroliza cazeinei.

b) *Hidroliza gelatinei.* Pentru a evalua abilitatea tulpinii de a hidroliza gelatina, se pregătește mediul nutritiv NG (Nutrient gelatin, Gelatină nutritivă tabelul 3.3). În H_2O_d se adaugă treptat triptoză, triptonă, NaCl și gelatina (tabelul 3.3). Toate ingredientele se amestecă până la dizolvarea gelatinei, apoi mediul se autoclavează timp de 15 min la 121°C. După autoclavare mediul este distribuit în eprubete de sticlă

sterile acoperite cu dop steril. După solidificarea mediului acesta este inoculat cu cultură proaspătă care a fost cultivată preventiv pe mediul nutritiv NA timp de 24 ore la 30°C. Inocularea se efectuează prin străpungerea mediului cu ajutorul ansei în așa mod, ca cultura să pătrundă în interiorul mediului nutritiv. Eprubeta martor nu se inoculează cu cultura bacteriană. Culturile se incubează la 37°C timp de 24 ore. După incubare culturile se transferă în frigider pentru următoarele 48 ore. După 48 ore se analizează rezultatul. Dacă mediul este lichid, gelatina a fost hidrolizată, respectiv, testul este pozitiv. Dacă mediul a rămas solid, testul este negativ (Tille, Forbes, 2014).

Tabelul 3.3. Denumirea și compoziția mediilor nutritive utilizate pentru caracterizarea biochimică

Denumirea	Compoziție	Condiții de sterilizare
MA (Milk agar)	Glucoză – 20 g/l, Agar microbiologic – 20 g, H ₂ O _d – 667 ml, Lapte UHT – 333 ml.	autoclavare 15 min., 121°C, 1,1 bar
NG (Nutrient Gelatin)	Tryptose (Hidrolizat pancreatic din făină de pește) – 5,2 g/l; Tryptone – 5,2 g/l; NaCl – 2,6 g/l; Gelatină 150 g/l.	autoclavare 15 min., 121°C, 1,1 bar
SA (Starch Agar)	Tryptose (Hidrolizat pancreatic din făină de pește) – 5,2 g/l; Tryptone – 5,2 g /l; NaCl – 2,6 g/l; Amidon solubil – 4 g/l, Agar microbiologic – 15 g/l	autoclavare 15 min., 121°C, 1,1 bar

Determinarea activității amilazei. Acest test demonstrează capacitatea culturilor bacteriene de a produce amilaza. Amilaza este o enzimă care catalizează hidroliza amidonului, rezultând dextrină, maltoză și glucoză (Simair *et al.*, 2017). Aceste zaharuri mai simple ulterior pot fi transportate în celulă pentru a fi catabolizate (Sigmon, 2008). Pentru a evalua abilitatea tulpinii de a scinda amidonul se prepară mediul nutritiv SA (Starch Agar, Agar cu amidon) (tabelul 3.3). În 350 ml H₂O_d se adaugă treptat componentele, până la dizolvare. Mediul se autoclavează timp de 15 min la 121°C. După autoclavare mediul se distribuie în cutii Petri (20 ml/cutie), și se lasă în cabinetul de biosiguranță până la solidificarea completă. Mediul se inoculează cu cultură proaspătă care a fost cultivată preventiv timp de 24 ore la 30°C. Culturile se incubează în termostat la 37°C timp de 24 ore. După incubare se picură 3-4 picături de soluție Lugol pe o porțiune de cultură. Apariția culorii albastre atestă că amidonul nu s-a scindat, respectiv, testul este negativ. Dacă culoarea rămâne cafenie, amidonul s-a scindat, respectiv, testul este pozitiv.

3.4. Identificarea tulpinilor bacteriene folosind metode molecular-genetice

În mod tradițional identificarea tulpinilor bacteriene a fost realizată folosind chei de identificare în baza unui set de caracteristici fenotipice. Pentru simplificare, o cheie pentru 22 dintre cele mai frecvent întâlnite bacterii entomopatogene este dată de autorii Fisher și Garczynski (2012). Pentru o descriere completă a trăsăturilor și tehnicilor fenotipice, drept referință poate servi Manualul lui Bergey de Sistematică Bacteriologică, Vol. 3, (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology de Vos *et al.*, 2009). O dată cu dezvoltarea metodelor molecular-genetice secvențele genei care codifică ARNr 16S au devenit un instrument util care a permis de a accelera și simplifica procedurile de stabilire a identității taxonomice a tulpinilor bacteriene izolate.

I. Extragerea ADN genomic din tulpinile bacteriene

Pentru extragerea ADN celulele bacteriene pot fi recoltate de pe mediu solid sau mediu lichid după caz. La recoltarea de pe mediu solid câteva colonii bacteriene se prelevează cu ajutorul ansei microbiologice și se transferă într-un tub steril de 1,5 ml. Este necesar de a utiliza culturi de cel mult 24h. După recoltare, pentru distrugerea peretelui celular și a membranelor plasmatică pot fi utilizate metode fizice, chimice sau strategii combinate. Celulele pot fi omogenizate până la o pulbere folosind azotul lichid, sau materialul biologic poate fi plasat direct într-o soluție tampon potrivită pentru a asigura liza celulară (Gols *et al.*, 2007; Machado *et al.*, 2010). Dacă celulele bacteriene au fost recoltate din mediu lichid, aproximativ 1 ml cultură se transferă într-un tub din plastic steril de 1,5 ml, ulterior celulele fiind precipitate prin centrifugare. Procedura în continuare este similară cu cea descrisă mai sus pentru culturile de pe mediu nutritiv solid. Extragerea unei cantități suficiente de ADN genomic intact, de o puritate înaltă, este o etapă importantă în cercetarea molecular-genetică a tulpinilor bacteriene. Pe parcursul anilor au fost dezvoltate numeroase protocoale de extragere și purificare a ADN, fiind adaptate cerințelor specifice înaintate. În linii mari însă toate strategiile includ un set de pași esențiali printre care: distrugerea peretelui celular, liza celulară, îndepărtarea proteinelor și altor biomolecule contaminante și recuperarea ADN (Atashpaz *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011; Fisher, Garczynski, 2012).

În cele ce urmează sunt prezentate metodele de extragere și purificare a ADN-ului realizate în cadrul acestei lucrări.

Protocolul de extragere a acizilor nucleici din materialul experimental folosind metoda standard fenol-cloroform (după Sambrook *et al.*, 1980)

Pentru extragerea ADN-ului, fiecare din tulpinile investigate au fost inoculate în 3ml LB (Lichid Broth) și incubate la temperatura de 30°C, fiind agitate continuu timp de 16 ore. Ulterior, culturile au fost transferate în tuburi Eppendorf de 1,5 ml și centrifugate la 13,2 mii rotații/min. timp de 3 minute. După realizarea centrifugării super-

natantul a fost înlăturat. În fiecare tub apoi au fost adăugate 500 µl soluție tampon TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0). Amestecul a fost agitat intens și la acesta s-a adăugat lizozimă solidă (20 mg/ml). Tuburile au fost incubate la temperatura de 37°C pentru o oră. După incubare în fiecare tub se adaugă 50 µl SDS (Sodium Dodecil Sulfate, dodecil sulfat de sodiu) și iarăși se incubează la temperatura de 37°C pentru 30 minute. Ulterior, conținutul tuburilor se tratează cu 55 µl 3M acetat de Na și se incubează la temperatura de 65°C pentru 30 minute. În fiecare tub apoi s-au adăugat 500 µl de amestec (fenol: cloroform: alcool izoamilic 25:24:1). Tuburile sunt centrifugate la 13,2 mii rotații/min. timp de 4 minute. După centrifugare, faza superioară este transferată cu pipeta, ușor, într-un nou tub Eppendorf de 1,5 ml, se adaugă 500 µl cloroform și se centrifughează iarăși la 13,2 mii rotații/min. timp de 4 minute, faza superioară este transferată într-un nou tub Eppendorf de 1,5 ml. Ulterior se adaugă 55 µl acetat de Na 3M pH 5,2 și 1 ml etanol 96% și se păstrează 45 minute la temperatura de -20°C, apoi tuburile sunt centrifugate 15 minute la 13,2 mii rotații/min. Supernatantul se înlătură și sedimentul de ADN rezultat este spălat cu 500 µl etanol 76% și centrifugat la 13,2 mii rotații/min. timp de 2 minute. După centrifugare etanolul este înlăturat și tuburile sunt incubate la temperatura de 37°C pentru uscare. Sedimentul de ADN este redizolvat în 50 µl TE și păstrat 10 minute în baia de gheață. Soluția stoc se păstrează la temperatură de -20°C până la utilizare.

Extragerea acizilor nucleici din materialul experimental cu ajutorul kit-ului de extragere a ADN-ului genomic, Pure Link Genomic DNA Mini Kit (TermoFisher)

ADN a fost extras din culturile bacteriene cultivate timp de 48h folosind Pure Link Genomic DNA Mini Kit (TermoFisher), Protocolul de extragere a ADN din bacterii Gram pozitive. Pentru etapa de liză celulară au fost setate două termostate la temperaturile de $t^{\circ} = 37^{\circ}\text{C}$ și $t^{\circ} = 55^{\circ}\text{C}$. A fost pregătit Lysozyme Digestion Buffer (25mM Tris-HCl, pH 8.0, 2,5 mM EDTA, 1% Triton X-100). La ~200 µL Lysozyme Digestion Buffer per probă adăugăm lizozimă proaspăt pregătită pentru a obține concentrația finală de 20 mg/ml. Aproximativ 10^9 celule de bacterii au fost transferate în 180 µl Lysozyme Digestion Buffer + Lysozyme, amestecate prin vortexare și plasate la temperatura de 37°C timp de 30 min. Ulterior se adaugă 20 µl Proteinaza K și se agită prin vortexare. Se adaugă 200 µl Pure Link Genomic Lysis/Binding Buffer și amestecă bine prin vortexare pentru a obține o soluție omogenă. Eprubeta a fost incubată la 55°C pentru 30 min. După expirarea timpului de incubare au fost adăugate 200 µl etanol de 96-100%, conținutul eprubetei fiind agitat intens prin vortexare 5 sec. Lizatul a fost transferat în coloana Pure Link Spin Column. Coloana a fost centrifugată la $10000 \times g$ timp de 1 min., temperatura camerei ($t^{\circ} = \sim 20\text{-}25^{\circ}\text{C}$). Tubul de colectare a fost aruncat, iar coloana plasată într-un tub de colectare Pure Link curat. Pentru purificarea ulterioară a ADN pe coloane adăugăm 500µl Wash Buffer 1, în care a fost adăugat preventiv etanol. Centrifugăm coloana la $10000 \times g$, 1 min., la temperatura camerei. Repetăm procedura de purificare a ADN folosind

500 μ l Wash Buffer 2. Centrifugăm coloana, 3 min., v max., la temperatura camerei. Aruncăm tubul de colectare și plasăm coloana într-un tub Eppendorf steril de 1,5 ml având pe capac notate inscripțiile corespunzătoare inscripțiilor de pe coloane. Eluarea a fost realizată folosind 100 μ L PureLink Genomic Elution Buffer în două etape. Înainte de centrifugare coloana a fost menținută în repaus la temperatura camerei timp de 1 min. Ulterior coloana este centrifugată la v max, 1 min., temperatura camerei. ADN-ul purificat a fost plasat pentru păstrare la temperatura de -20°C (figura 3.6).

Figure 1—Easy-to-follow PureLink™ spin column–based purification method.

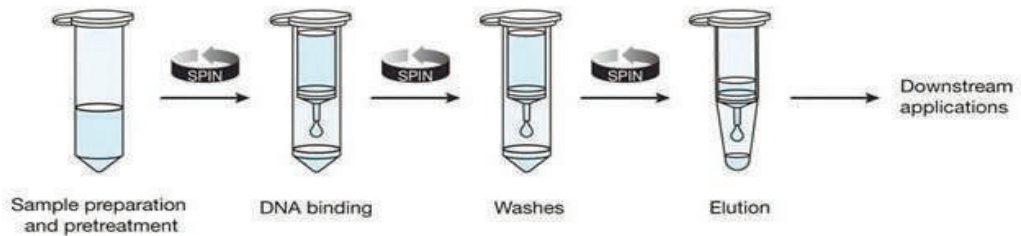


Fig. 3.6. Procedura simplificată de extragere și purificare a ADN folosind kit-ul de reactivi PureLink™ Genomic DNA Mini Kit

(Sursa: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K182001>)

II. Verificarea calității și cantității ADN

Acest lucru poate fi realizat prin electroforeză într-un gel folosind Ladder și soluție tampon, și colorarea ulterioară și vizualizarea ADN-ului. Electroforeza în gel este o metodă de separare și de analiză a macromoleculelor de ADN, ARN și proteine, sau a unor fragmente din aceste molecule, pe baza mărimii și a sarcinii lor. Cel mai des, cantitățile de ADN sunt estimate prin electroforeză în gel de agaroză. Pentru a separa fragmente de ADN de diferite lungimi, se utilizează un gel cu concentrații diferite de agaroză în funcție de diapazonul lungimilor fragmentelor care urmează a fi separate (tabelul 3.4). Dacă fragmentele diferă în lungime cu doar zeci de perechi de baze gelul de agaroză nu va avea suficientă rezoluție pentru a le separa, astfel încât în aceste cazuri este recomandat utilizarea gelului de poliacrilamidă.

Tabelul 3.4. Concentrații recomandate ale agarozei

<i>Intervalul de lungimi a fragmentelor de ADN</i>	<i>Concentrația de agaroză, %</i>
50-1500	2
300-3000	1,5
400-6000	1,2
500-10000	1
800-10000	0,7
1000-20000	0,5

De obicei, pentru a vizualiza ADN se folosește bromura de etidiu, un 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 (Moldovan *et al.*, 2022).

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 μl bromură de etidiu) timp de 60 min., la tensiunea curentului electric de 5V/cm. soluția tampon utilizată fiind TAE 1X (40mM Tris, 20mM acid acetic glacial, 1mM EDTA). În calitate de marker molecular a fost utilizat GeneRuler 100 bp plus DNA Ladder (TermoFisher Scientific).

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-dezghet. De obicei concentrațiile mari de ADN sunt mai stabile la păstrare decât ADN diluat.

III. Amplificarea secvențelor de ADN a genei care codifică 16S ARNr

Identificarea și diferențierea pe bază de PCR a speciilor bacteriene a devenit o tehnică standard de lucru în laborator (Tailliez *et al.*, 2006; Dingman, 2009). Amplificarea porțiunii conservative din gena care codifică ARNr 16 S poate fi utilizată atât pentru identificarea apartenenței specifice cât și pentru detecția prezenței anumitei specii de bacterii într-o probă investigată (Fisher, Garczynski, 2012).

În cercetările prezentate amplificarea porțiunii de genă care codifică 16S ARNr a fost realizată după metoda descrisă anterior de Ben-Dov *et al.* (1997), cu utilizarea primerilor universali UNI Primers F 5' ATT CTA GAG TTT GAT CAT GGC TCA 3' și UNI Primers R 5' ATG GTA CCG TGT GTG ACG GGC GGT GTG TA 3', care amplifică aproape complet gena 16S ADNr (William *et al.*, 1991). Condițiile de realizare a reacției PCR au fost ajustate după lucrarea autorilor William *et al.* (1991).

Amestecul de reacție pentru fiecare probă (25 μl) a fost compus din: 10X PCR Buffer (concentrația finală 1X), 150 μM deoxinucleozid trifosfați (fiecare), 0,5 μM primeri și 0,5 U ADN Taq polimerază Taq și 1μl ADN testat. De asemenea fiecare experiment a fost asociat cu utilizarea unui martor negativ.

Amplificarea ADN s-a realizat automat în termocicler Hybaid în următoarele regimuri termice:

- | | | |
|--|---|------------|
| <ol style="list-style-type: none"> 1. 95°C – 2 min. – 1 ciclu 2. 94°C – 1 min. 3. 50°C – 1 min. 4. 72°C – 2 min. 5. 72°C – 5 min. – 1 ciclu 6. 4°C – ∞ | } | 36 cicluri |
|--|---|------------|

Validarea reacției PCR. pentru verificarea rezultatului reacției PCR și determinarea lungimii produsului PCR a fost utilizat gelul de agaroză 1,2 sau 2%, tensiunea curentului electric de 5V/cm, timp de 60 min. soluția tampon utilizată a fost 1X TAE (40 mM Tris, 20 mM acid acetic glacial, 1mM EDTA). În calitate de marker molecular a fost utilizat GeneRuler 100 bp plus DNA Ladder (TermoFisher Scientific) (Munteanu *et al.*, 2014).

ADN legarea. Produsele PCR cu fragmentele din structura gena ARNr 16S amplificate au fost excizate direct din gel și ulterior legate cu un vector pGEM-T Easy cloning vector (Promega). Amestecul de reacție pentru fiecare probă (10,5 μ l) a fost compus din: 10x Lig Buffer 1,5 μ l, enzimă T4 DNA ligaze 1 μ l, vector pGEM-T 1 μ l, PCR product 7 μ l. Ulterior tuburile Eppendorf au fost incubate la temperatura de 16°C pentru 16 ore. Produsul legat a fost transformat și introdus în tulpinile de *Escherichia coli* DH 10B și M 101. Procedura a fost efectuată în felul următor: 3 μ l produs legat (plasmidă recombinată) sunt introduse în tuburile cu celule competente (*E. coli* DH 10B și *E. coli* JM 101) și ținute un minut în baia de gheață, ulterior acestea sunt introduse în cuvele pentru transformare care se efectuează în aparat pentru electrotransformare BioRad Micropulser. Imediat după transformare produsul transformat se scoate din cuve cu 1 ml LB și se transferă în tuburi pentru test, acestea sunt agitate timp de o oră la temperatura de 37°C. În continuare produsul transformat este inoculat în cești Petri cu LB Agar și ampicilină (5g triptonă, 2,5 g NaCl, 2,5 g extract de drojdii, 6 g agar, 1ml ampicilină) pregătite din timp și 40 μ l IPTG (Isopropil β - d-1-tiogalactopiranozidă) și 40 μ l XGal (bromo-cloro-indolil-galactopiranozidă) pentru fiecare cutie Petri. Conținutul tuburilor pentru test este transferat în tuburi Eppendorf și centrifugat la 6 mii rotații/min. timp de 3 minute și ulterior transferat în cutii Petri. Acestea se incubează la temperatura de 37°C pentru creștere (Munteanu *et al.*, 2014).

Extragerea plasmidelor. ADN-ul plasmidelor din celulele bacteriene a fost extras după metoda de liză alcalină modificată (Jensen *et al.*, 1995; Porcar *et al.*, 1999). Celulele au fost crescute în 3 ml LB cu adaos de 6 μ l ampicilină pentru fiecare tub, fiind plasate în incubatorul cu agitare pentru 16 ore, la temperatura de 37°C. În continuare 1,5 ml au fost centrifugate la $13,2 \times 1000$ rotații/min timp de 2 minute, cultura de celule a fost tratată cu 300 μ l TENS (500 μ l Tris, 100 μ l 0,5 M EDTA, 5 ml 1M NaOH, 2,5 ml 10% SDS, ddH₂O) și 150 μ l Na-acetat 3M pH 5,2, amestecul a fost plasat în gheață pentru 10 minute, ulterior amestecul a fost centrifugat la $14,0 \times 1000$ rotații/min timp de 4 minute, lichidul transparent este transferat în alte tuburi Eppendorf și tratate cu 800 μ l etanol 95% și centrifugate la $13,2 \times 1000$ rotații/min timp de 3 minute, lichidul este înlăturat și iarăși se adaugă 500 μ l etanol 70%, tuburile se centrifughează la $13,2 \times 1000$ rotații/min timp de 2 minute, lichidul se înlătură și tuburile sunt incubate la temperatura de 37°C pentru uscare. După uscare în tuburi se adaugă 25 μ l ddH₂O. Rezultatul este vizualizat prin electroforeza în gel de agaroză (1%).

Digestia cu enzime. ADN-ul plasmidelor extras din celulele bacteriene recombinate este în continuare digerat, amestecul pentru digestie pentru fiecare probă (20 μ l)

este compus din: 2 μ l Buffer, 0,5 μ l enzimă EcoRI, 7,5 μ l H₂O, ARN-ază 10 μ l produs de digestie, tuburile sunt incubate la temperatura de 65°C pentru 10 min pentru degradarea enzimei. Rezultatul este vizualizat prin electroforeza în gel de agaroză (1%).

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, spre exemplu setul de reagenți Mini Elute PCR Purification Kit (QIAGEN).

Purificarea produselor PCR. În placa specială MiniElute PCR Purification Plate (Qiagen, Valencia, CA) sunt adăugate 20 μ l product PCR și 180 μ l apă deionizată. Ulterior placa este transferată în Millipore pentru înlăturarea apei în condiții de vid. După înlăturarea apei în fiecare alveolă se introduc 50 μ l apă și se amestecă timp de 20 minute la 1,4 mii rotații/min. Amestecul pentru purificare este transferat în eprubetă sterilă.

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 enzimatică ulterioare (Munteanu *et al.*, 2014).

V. Secvențierea produselor PCR

Secvențierea produselor PCR a fost realizată prin metoda dideoxi-terminală (metoda Sanger). În cercetările prezentate secvențierea produselor PCR a fost realizată utilizând kit-ul ABI PRISM TM Dye Terminator Cycle Ready Reaction, AmpliTaq® DNA Polymerase (Perkin-Elmer) și analizatorul genetic ABI PRISM TM 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems). Pentru reacția de secvențiere a fost utilizat kit-ul Big Dye termination cycle 1,0. Amestecul de reacție pentru realizarea analizei PCR Big Dye termination cycle 1,0 a conținut: 3 μ l H₂O, 3 μ l Big Dye, 3 μ l produs PCR și 1 μ l primer. Amestecul a fost plasat în amplificatorul Applied Biosystems 9200 (Munteanu *et al.*, 2014).

Condițiile de desfășurare a reacției PCR sunt prezentate mai jos:

1. 96°C – 5 minute – 1 ciclu
 2. 96°C – 30 secunde
 3. 55°C – 20 secunde
 4. 60°C – 2 minute
 5. 15°C – ∞
- } 25 cicluri

Precipitarea cu etanol. În amestecul obținut după PCR Big Dye au fost adăugate 16 μl apă deionizată și 64 μl alcool etilic de 100% după care probele au fost menținute la întuneric timp de 15 min. Ulterior, amestecul a fost supus centrifugării la viteza de 3000 rotații/min timp de 30 minute, la finalizarea timpului eprubetele au fost deschise și centrifugate timp de 1 minut la 800 rotații/min pentru evaporarea amestecului. Pentru următoarea etapă în eprubete se adaugă 25 μl apă deionizată și se amestecă la Vortex timp de 10 minute. Produsul reacției de secvențiere este introdus în analizatorul genetic automatizat și este realizată electroforeza în capilare. Semnalul fluorescent este preluat de camera de detecție și transformat în cromatogramă de către soft. Cromatogramele obținute sunt ulterior analizate (figura 3.7).

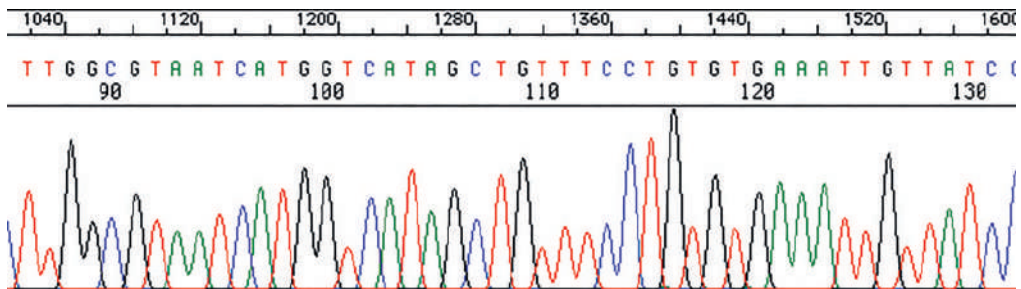


Fig. 3.7. Aspectul exterior al rezultatelor secvențierii produsului PCR (orig.)

VI. Metode bioinformaționale

Secvențele obținute au fost utilizate pentru a efectua căutări BLAST (Altschul *et al.*, 1990) folosind baza de date NCBI GenBank. S-a efectuat compararea a aproximativ 1400 pb de fragmente ale secvențelor genei ARNr 16S ale fiecărui izolat cu alte secvențe ARNr 16S din baza de date NCBI GenBank (Altschul *et al.*, 1997).

Alinierea secvențelor a fost efectuată prin intermediul funcției CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) a programului MEGA (Tamura *et al.*, 2007) folosind un ADN IUB sau o matrice de greutate a proteinei Gonnet, respectiv. Statisticile de aliniere ca de ex. identificarea siturilor informative filogenetic au fost evaluate în MEGA. Filogeniile organismelor au fost reconstruite cu metoda Maximum Likelihood (ML) folosind instrumentul software PhyML (Guindon, Gascuel, 2003), modelul de substituție a nucleotidelor Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) (Hasegawa *et al.*, 1985). Limitele de încredere în topologia arborelui au fost explorate în analize bootstrap neparametrice a peste 1.000 de pseudo-replicate. Arborele a fost înrădăcinat folosind *Vibrio cholerae* ca grup extern (Munteanu *et al.*, 2014).

3.5. Caracterizarea proprietăților insecticide ale tulpinilor bacteriene

- **Predicția potențialului insecticid prin amplificarea genelor Cry**

Activitatea insecticidă a proteinelor Cry corelează într-o anumită măsură cu tipurile de gene a acestor protoxine. Astfel, identificarea prezenței și tipului genelor Cry în genomul unei tulpini de bacterii poate fi utilizată pentru a prezice potențialul insecticid al acestei tulpini. Dezvoltarea metodelor molecular-genetice a facilitat identificarea genelor Cry în tulpinile deja izolate, reducând timpul și costurile necesare pentru screening-ul activității insecticide a unui număr mare de tulpini bacteriene. Identificarea genelor δ -endotoxinei *B. thuringiensis* prin metoda PCR s-a dovedit a fi o metodă foarte utilă pentru caracterizarea tulpinilor, iar utilizarea ei ca pas preliminar de selecție oferă multe avantaje în ceea ce privește rapiditatea și reproductibilitatea (Porcar, Juarez-Perez, 2003).

Identificarea bazată pe tehnica PCR a genelor Cry la specia *B. thuringiensis* a fost dezvoltată de Carozzi și colaboratorii săi (Carozzi *et al.*, 1991), care a introdus această tehnică ca instrument de predicție a activității insecticide. A fost propusă o metodologie exactă și rapidă de identificare a tulpinilor noi și predicția activității insecticide a acestora. Totodată a fost propusă utilizarea PCR pentru descoperirea genelor cry necunoscute anterior. Autorii au sugerat că tulpinile care produc profiluri PCR neobișnuite urmează a fi selectate pentru analize ulterioare favorizând identificarea și caracterizarea unor noi gene Cry (Carozzi *et al.*, 1991).

În anii ce au urmat metoda PCR a fost utilizată intens în scopul determinării prezenței genelor Cry în multe colecții de tulpini din specia *B. thuringiensis* (Gleave *et al.* 1993; Bravo *et al.*, 1998; Porcar *et al.*, 2003). Deoarece PCR permite screening-ul rapid și simultan a multor tulpini, acesta a înlocuit parțial testele de evaluare insecticidă în caracterizarea preliminară a tulpinilor de bacterii din colecții. Astăzi, PCR a devenit un instrument utilizat în screening-ul de rutină a colecțiilor mari de tulpini la prezența genelor Cry atât în laboratoarele de cercetare publice, cât și private. Cu toate acestea, predicția activității insecticide prin PCR trebuie să fie întotdeauna însoțită de evaluarea activității insecticide prin metode clasice (Bobrowski *et al.*, 2001; Porcar *et al.*, 2003).

Cea mai ușoară strategie de identificare a genelor Cry prin PCR este utilizarea unei perechi de primeri care recunoaște în mod specific o singură genă. Acest lucru poate fi realizat cu o pereche de primeri specifici sau prin combinarea unui primer universal, care amplifică o regiune conservată din familia de gene sau un primer specific, care se aliniază unei regiuni variabile (Ben-Dov *et al.*, 1997; Bobrowski *et al.*, 2001; Porcar *et al.*, 2003). Creșterea vitezei de screening a colecțiilor poate fi asigurată prin utilizarea PCR multiplex (Juárez-Pérez *et al.*, 1997; Bobrowski *et al.*, 2001; Porcar *et al.*, 2003; Jain *et al.*, 2017). Această abordare presupune utilizarea mai multor perechi de primeri în același amestec de reacție.

În lucrare sunt prezentate rezultatele cercetărilor privind amplificarea genelor Cry 1 cu utilizarea primerilor CJI-1 (TG TAGAAGAGGAAGTCTATCCA), și CJI-2

(TATCGGTTTCTGGGAAGTA) (Ceron *et al.*, 1995) și a polimerazei Dream Taq Hot Start Green DNA polymerase (tabelul 3.5).

Tabelul 3.5. Componentele amestecului de reacție

	Conc. inițială	Conc. finală	1 tub, μl	28 tub, μl
Apă			18,3	512,4
Dream Taq Green Buffer	10X	1X	2,5	70
dNTP	10 Mm	0,2 Mm	0,5	14
Primer 1	10 μM	0,5 μM	1,25	35
Primer 2	10 μM	0,5 μM	1,25	35
Dream Taq Hot Start Polymerase	5u/ μL	1u/25 μl	0,2	5,6
Volum total			24	672
ADN			1	

**De vortexat bine reagenții înainte de utilizare, ! cu excepția polimerazei !*

Condiții de desfășurare a reacției PCR:

<i>Pasul 1</i>	<i>95°C</i>	<i>3 min</i>] <i>35 cicluri</i>
<i>Pasul 2</i>	<i>95°C</i>	<i>0:30 min</i>	
<i>Pasul 3</i>	<i>40°C</i>	<i>0:30 min</i>	
<i>Pasul 4</i>	<i>72°C</i>	<i>1:40 min</i>	
<i>Pasul 5</i>	<i>72°C</i>	<i>5 min</i>	
<i>Pasul 6</i>	<i>4°C</i>	<i>∞</i>	

Pentru a determina dimensiunile fragmentelor de ADN cercetate, se utilizează curbele etalon construite în baza markerului de masă moleculară. Pe axa Y este distanța parcursă de fiecare bandă în scară în milimetri, pe axa X lungimea fragmentului de ADN asociat fiecărei benzi. După amplasarea punctelor pentru markerul de masă moleculară și realizarea curbei etalon putem aplica ecuația obținută în baza curbei etalon pentru probele ce conțin fragmente de ADN de lungimi necunoscute. Determinarea lungimii fragmentului de ADN amplificat a fost realizată folosind aplicația MS Excel 2010.

• **Estimarea susceptibilității insectelor țintă la infecția cu tulpinile bacteriene potențial patogene**

Tulpinile bacteriene au fost cultivate timp de o zi pe agitator la temperatura de 30°C pe mediu nutritiv agarizat T3. Celulele au fost precipitate, resuspendate în apă distilată și incubate în agitator circular pentru o noapte la 30°C. În acest timp

celulele lizează, eliberând spori și cristale. Ulterior este determinată concentrația de spori și cristale de δ -endotoxină din lichidul cultural rezultat. Concentrația de spori este determinată după numărul de colonii în creștere pe mediu agarizat T3 după însămânțarea diluției. Prezența cristalelor este monitorizată prin microscopie cu contrast de fază. Se pregătește suspensia de contaminare în apă distilată cu concentrație de aproximativ 10^8 - 10^9 spori/ml. În calitate de martor a fost utilizată soluția de 0,9% NaCl. În suspensiile pregătite au fost introduse frunze de plante preferate de insecta respectivă (măr, lucernă, cartof ș.a.) de aproximativ aceeași mărime. Frunzele au fost uscate la temperatura de 20°C și plasate în cutii Petri. Alternativ, suspensiile au fost diluate, folosind 4 ml de apă sterilă distilată, iar întregul volum a fost pulverizat peste frunze, folosind un dispozitiv de pulverizare manual steril. Insectele au fost obținute din populații naturale ale dăunătorului fără aplicarea măsurilor de protecție a plantelor, transportate în laborator în cuști cu hrană, menținute în laborator și inspectate la prezența infecțiilor. În experiențe au fost incluși doar indivizi adulți fără simptome. De asemenea, insectele au fost menținute în condiții de laborator fiind urmărite stadiile de dezvoltare ou-larvă-pupă-imago. Diferite stadii ontogenetice sunt prelevate pentru efectuarea testelor suplimentare privind eficiența tulpinilor bacteriene entomopatogene conform experimentului descris. Pentru fiecare diluție a tulpinii bacteriene au fost utilizate câte 10 insecte și 2-5 frunze tratate. Experiența a fost realizată în 3 repetiții. Mortalitatea insectelor a fost cuantificată zilnic, insectele fiind menținute la 21°C și intervalul de zi 18 ore. Datele de mortalitate obținute au fost corectate folosind formula Abbott. Această metodă se bazează pe constatarea că în calculul eficacității insecticidelor este evident că mortalitatea cauzată de factori naturali trebuie să fie luată în considerație. Astfel diferența dintre procentul de insecte vii în proba martor netratat și cel al insectelor vii în proba experimentală reflectă cu adevărat mortalitatea cauzată de agentul entomopatogen investigat. Astfel mortalitatea poate fi estimată conform formulei (Abbott, 1925):

$$M = \frac{X - Y}{X} \quad (3.1)$$

unde: X – procentul de insecte vii în proba martor,
Y – procentul de insecte vii în proba experimentală.

• Determinarea activității insecticide a tulpinilor selectate

În scopul stabilirii corelației doză-timp-mortalitate pentru tulpinile bacteriene, 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 de insecte investigate. 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 bacteriene (Rath, 2011) (3.2) (Moldovan *et al.*, 2022):

$$\log_{10} LC_{50} = \log_{10} C_m - \delta \left(\sum L - 0,5 \right) \quad (3.2)$$

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

$$L = \frac{(p_0 - p_k)}{(1 - p_k)} \quad (3.3)$$

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

4 CERCETĂRI PRIVIND DEZVOLTAREA AGENȚILOR BACTERIENI DE CONTROL BIOLOGIC AL DĂUNĂTORILOR

4.1. Izolarea și identificarea noilor tulpini bacteriene pentru a fi utilizate împotriva dăunătorilor culturilor pomicole

Scopul principal al acestui studiu a fost de a caracteriza comunitatea microbiană a dăunătorilor *Sciaphobus squalidus*, *Tatianaerhynchites aequatus* și *Byctiscus betulae* (Coleoptera, Curculionoidea) folosind metode de cercetare a particularităților morfologice, fiziologice, biochimice și molecular-genetice (amplificarea fragmentelor de genă 16S ARNr și secvențiere). În rezultatul cercetărilor privind izolarea noilor tulpini bacteriene cu potențial de a fi utilizate în controlul biologic al dăunătorilor au fost obținute și caracterizate treisprezece tulpini.

Pentru izolarea bacteriilor au fost utilizate larve de *Byctiscus betulae* și imago pentru celelalte două specii incluse în studiu. În baza proprietăților morfo-culturale au fost selectate pentru cercetările ulterioare 5 tulpini bacteriene izolate din microflora speciei *Tatianaerhynchites aequatus* (Ta1, Ta2, Ta3, Ta4 și Ta5), patru tulpini izolate din microflora exemplarelor de *Byctiscus betulae* (Bb1, Bb2, Bb3 și Bb4) și patru tulpini pentru *Sciaphobus squalidus* (S1, Ss2, Ss3 și Ss4). În ceea ce privește proprietățile morfo-culturale, majoritatea tulpinilor au avut culoare albă crem, cu excepția a două tulpini (Bb3 și Ss3) coloniile cărora pe mediul NA aveau culoare galbenă. Toate coloniile obținute au avut marginea netedă și erau rotunde cu excepția tulpinii Ss1, a cărei colonii au avut creștere filamentoasă și neregulată. Testul de motilitate a fost pozitiv pentru toate tulpinile. Din tulpinile investigate 11 au fost bacilare, o tulpină fiind reprezentată de coci. Majoritatea tulpinilor au fost Gram negative cu excepția tulpinilor Ta5 și Ss1. Au fost relevată prezența endosporului la doar 4 (Ta1, Ta3, Ta4 și Ss2) din cele 13 tulpini cercetate. Caracteristicile fenotipice au fost comparate cu Manualul lui Bergey de Bacteriologie Sistematică, volumele 1 și 2 (Krieg, Holt, 1986). Rezultatele cercetării creșterii culturilor în mediu cu diferite valori ale pH au relevat faptul că pH-ul optim a variat între 6 și 9, cu 53,85% din tulpini având pH-ul optim egal cu 8 (Munteanu *et al.*, 2014).

Tulpinile au fost caracterizate în continuare în funcție de particularitățile biochimice (tabelul 4.1) și moleculare (figura 4.1). La evaluarea acestor date, tulpinile au fost identificate la nivel de gen sau specie.

Toate tulpinile au fost capabile să producă arginin- dihidrolază și acetoina (reacția Voges Proskauer) și au prezentat rezultate negative pentru producția de H₂S, triptofan deaminază și indol. Pe de altă parte, producția de urează și incapacitatea de a produce β-galactozidază au fost observate numai pentru tulpinile Ss1, Ss2 și Ss4; D-glucoza nu a fost metabolizată de Ss1. Fermentarea L-ramnozei, D-melibiozei și L-arabinozei au fost negative pentru tulpinile Ta5 și Ss1. Lipsa fermentației inozitolului a fost determinată numai în cazul Bb4 și Ta2 (Munteanu *et al.*, 2014).

Tabelul 4.1. Proprietățile biochimice ale tulpinilor izolate
(adaptat după Munteanu *et al.*, 2014)

Testul	Tulpina												
	Bb1	Bb2	Bb3	Bb4	Ta1	Ta2	Ta3	Ta4	Ta5	Ss1	Ss2	Ss3	Ss4
ONPG (2-nitrofenil- β D-galactopiranozida)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
ADH (L-arginina)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LDC (L-lizina)	-	-	-	+	-*	+	-*	-*	+	+	+	+	+
ODC (L-ornitina)	-*	-*	-	-*	-	+	-	-	+	+	+	+	+
ICITI (triso-dium citrat)	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H₂S (tiosulfat de sodiu)	-*	-*	-	-*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
URE (urea)	-*	-*	-	-	-*	-	-*	-*	-	+	+	-	+
TDA (L-triptofan)	-*	-*	-	-*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IND (L-triptofan)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IVPI (piruvat de sodiu)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IGELI (gelatina de origine bovină)	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+
GLU (D-glucoza)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-*	+	+	+
MAN (D-mannitol)	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-*	+	-*
INO (inozitol)	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
SOR (D-sorbitol)	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-
RHA (L-ramnoza)	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
SAC (D-zaharoza)	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-
MEL (D-melibioza)	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
AMY (amigdalina)	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
ARA (L-arabinoza)	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+

+ = creștere; - = lipsa creșterii, * - profilul biochimic diferă față de datele din cercetările similare

Majoritatea proprietăților biochimice ale tulpinilor Bb3 și Ss3, sunt caracteristice pentru specia *Pantoea agglomerans*. Totodată capacitatea de a produce lizin-decarboxilaza și ornitin-decarboxilaza deosebește tulpina Ss3 de tulpina Bb3 și alte tulpini de *Pantoea agglomerans* cercetate (Beji *et al.*, 1988; Asis, Adachi, 2003; Medrano, Bell, 2007; Deletoile *et al.*, 2009). Tulpinile Ta1, Ta3 și Ta4, au demonstrat proprietăți biochimice similare speciei *Klebsiella pneumoniae* în 90,0 % din testele efectuate (Swanson, Collins, 1980; Messaoudi, 2009). Nu a fost observată producție de urează și lizin-decarboxilază de către Ta1, Ta3 și Ta4 spre deosebire de cercetările citate mai sus (Munteanu *et al.*, 2014). Ta2 împărtășește aceleași proprietăți biochimice cu *Erwinia billingiae* (Geider *et al.*, 2006). Comparativ cu tulpina *Erwinia billingiae* Eb661 (Geider *et al.*, 2006), tulpina Ta2 este capabilă să utilizeze citratul trisodic. Tulpina Ta5 a demonstrat 90% proprietăți similare tulpinilor de *Staphylococcus haemolyticus*. Spre deosebire de rezultatele prezentate (Gutz *et al.*, 2006), Ta5 produce β -galactozidaza și ornitin decarboxilaza (tabelul 4.1, Munteanu *et al.*, 2014). Tulpina Ss1, a prezentat un profil biochimic similar *Bacillus cereus*, în 85,0 % din cazuri, tulpina demonstrând rezultate diferite în testele de producere a lizin- și ornitin-decarboxilazelor și fermentației D-glucozei (Logan, Berkeley, 1984; Te Giffel *et al.*, 1997; Haque, Russell, 2005). Pentru tulpina Ss2, 90% din rezultatele testelor au fost similare cu cele pentru *Pseudomonas fluorescens* cu excepția testelor pozitive la urează și fermentația D-manitolului (Hernandez-Rodriguez *et al.*, 2003; Franzetti, Scarpellini, 2007). Tulpina Ss4 a prezentat un profil biochimic similar speciei *Pseudomonas moraviensis* în 80% de cazuri (Tvrzova *et al.*, 2006, Munteanu *et al.*, 2014). Pentru tulpinile Bb1, Bb2 și Bb4 identificate la nivel de gen ca *Erwinia* spp. au demonstrat proprietăți biochimice semnificativ diferite față de alte studii (Mergaert *et al.*, 1984; Geider *et al.*, 2006) (tabelul 4.1).

Arborele filogenetic a fost reconstruit folosind secvențe parțiale ale genei ARNr 16S disponibile în GenBank (figura 4.1). Astfel, dintre toate tulpinile bacteriene izolate, Bb3 și Ss3 au 100% omologie de secvență a genei ARNr 16S cu tulpina *Pantoea agglomerans* Eh239, utilizată în calitate de agent de control biologic (Rezzonico *et al.*, 2009). Tulpinile Ta1, Ta3 și Ta4 au prezentat 98% omologie în secvența analizată cu *Klebsiella pneumoniae*, Ta2 a avut o asemănare de 99% cu *Erwinia billingiae* și Ta5 a avut o asemănare de 97% cu *Staphylococcus haemolyticus*. Ss1 are 100% omologie de secvență a genei ARNr 16S cu *Bacillus cereus*. Tulpinile Ss2 și Ss4 aparțin grupului *Pseudomonas fluorescens*, Ss2 grupându-se cu *Pseudomonas fluorescens* și Ss4 cu *Pseudomonas moraviensis*. Izolatele Bb1, Bb2 și Bb4 au fost determinate la nivel de gen și grupate în *Erwinia* spp., omologie de secvență 97% (figura 4.1) (Munteanu *et al.*, 2014).

Rezultatele fiziologice și biochimice au fost confirmate prin analiza filogenetică a tulpinilor bacteriene izolate pe baza secvențelor genei ARNr 16S. Tulpinile Bb3 și Ss3 au format un grup cu tulpina *Pantoea agglomerans* Eh239 (Rezzonico *et al.*, 2009), prezentând o asemănare de 100%. Diferențele de teste fiziologice și biochimice pentru aceste două tulpini au fost evidențiate în arborele filogenetic, Ss3 fiind grupat separat cu tulpina *Pantoea agglomerans* ACW 55802 (Rezzonico *et al.*,

2009) (Munteanu *et al.*, 2014). Diferențele biochimice și doar 72% similaritate în testul bootstrap ne permit să spunem că izolatele Bb1, Bb2 și Bb4 aparțin genului *Erwinia*. Cercetările realizate de către autori au constituit prima înregistrare privind izolarea speciilor *Staphylococcus haemolyticus*, *Erwinia billingiae* și *Pseudomonas moraviensis* din microflora coleopternelor (Munteanu *et al.*, 2014).

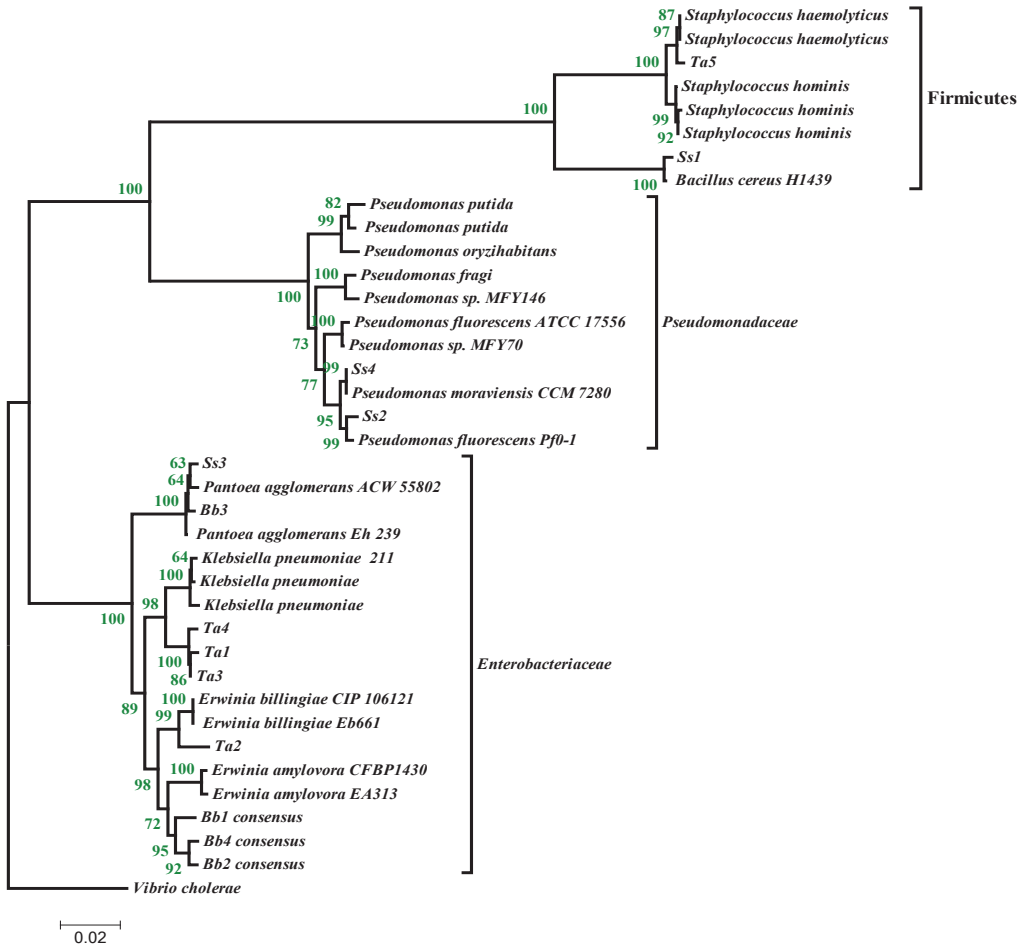


Fig. 4.1. Arborele filogenetic reconstruit în baza secvenței parțiale a genei 16S ARNr (după Munteanu *et al.*, 2014)

Pe baza studiilor fiziologice, biochimice și moleculare, în microflora bacteriană a dăunătorului *B. betulae* au fost identificate speciile de *Pantoea agglomerans* (Bb3) și *Erwinia* spp. (Bb1, Bb2 și Bb4). Comunitatea bacteriană a dăunătorului *S. squa-lidus* a fost reprezentată de *Bacillus cereus* (Ss1), *Pseudomonas fluorescens* (Ss2), *Pantoea agglomerans* (Ss3) și *Pseudomonas moraviensis* (Ss4), în timp ce tulpinile bacteriene izolate din *T. aequatus* au fost identificate ca *Klebsiella pneumoniae* (Ta1, Ta3 și Ta4), *Erwinia billingiae* (Ta2) și *Staphylococcus haemolyticus* (Ta5) (Munteanu *et al.*, 2014).

Pseudomonas fluorescens, precum și *Bacillus cereus* au fost izolate anterior din corpul coleopterelor curculonoide (Yaman *et al.*, 1999; Sezen, Demirbag, 1999; Sezen *et al.*, 2004; Yakupoğlu *et al.* 2009) demonstrând utilitatea în controlul biologic al organismelor dăunătoare. Astfel rezultatele obținute au permis de a caracteriza microflora dăunătorilor *Sciaphobus squalidus* (Gyll.), *Tatianaerhynchites aequatus* (L.) și *Byctiscus betulae* L. relevând noi tulpini cu potențial de a fi utilizate împotriva insectelor dăunătoare.

Cercetările au fost continuate în scopul izolării din mediul natural a unor tulpini autohtone de *Bacillus thuringiensis* care ar putea fi valorificate în scopul combaterii biologice a dăunătorilor pomilor fructiferi. Astfel în rezultatul investigațiilor au fost obținute 3 tulpini noi de *Bt*. Din corpul insectei *N. pauxillus* a fost izolată tulpina Np1, din corpul dăunătorului *P. oblongus* tulpina Po4 și din corpul insectei *T. aequatus* tulpina Ta16. Pentru izolare a fost folosit mediul nutritiv T3 (vezi capitolul 3).

În rezultatul investigațiilor a fost constatat că tulpinile reprezintă bacterii gram-pozitive cu spori. Celulele vegetative sunt mari și mobile, dispuse câte una, în perechi sau în lanțuri. Mărimea celulelor variază de la 1,5-1,7 până la 3,6-6,2 μm. Formează și produc incluziuni proteice cristalice de formă bipiramidală. Pe mediul NA peste 24 ore tulpinile formează colonii de culoare albă-gri cu marginea filiformă și suprafața mată. Sunt microorganisme aerobe, facultativ anaerob. Tulpinile cresc în limitele de temperatură +5...+40 °C. Temperatura optimă de creștere constituie +28...+32 °C. Valoarea optimă a pH-ului pentru dezvoltarea tulpinilor a fost constatată fiind egală cu 5.2. Tulpinile produc catalază, hidrolizează amidonul și cazeina, lichefiază gelatina. Formează acetilmetilcarbinol, lecitinază și urează. Nu descompun esulina și salicina. Nu formează acizi și gaze din maltoză, lactoză și zaharoză. Asimilează glucoza, manoza cu formarea de acid. Nu formează sulfat de hidrogen și indol. A fost constata că tulpinile produc δ - endotoxine cu proprietăți insecticide. Gradul de puritate al tulpinilor a fost verificat prin Reacția de Polimerizare în Lanț cu utilizarea primerilor specifice ITS (Internal Transcribed Spacer) 16S-23S și amplificarea porțiunii de genă *Cry1*.

În rezultatul cercetărilor efectuate tulpinile au fost identificate ca *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, fiind depozitate în Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie cu numerele CNMN-BB-03, CNMN-BB-04 și CNMN-BB-05.

Genele ARNr 16S sunt considerate unul dintre principalii markeri moleculari care permit de a cerceta diversitatea bacteriilor. Acest marker molecular este utilizat pe scară largă pentru analiza filogenetică și pentru studiile de metagenomică (Joung, Cote, 2001; Yarza *et al.*, 2014; Rabinovitch *et al.*, 2017). Gena ARNr 16S conține atât regiuni conservate, cât și regiuni variabile care fac posibilă aplicarea acestei porțiuni de ADN în studiile care vizează diferite niveluri taxonomice. În ultimele decenii, aplicarea secvențelor genei 16S ARNr a permis de a extinde semnificativ cunoștințele cu privire la diversitatea procariotelor. Datele pot fi generate prin secvențierea unor regiuni ale acestei gene sau prin utilizarea tehnicii RFLP (Rabinovitch *et al.*, 2017). Principala piedică în utilizarea ARNr 16S este similitudinea mare

între secvențele speciilor strâns înrudite (Christensen *et al.*, 1998), așa cum este cazul genului *Bacillus*. Pentru a depăși aceste piedici, poate fi aplicată o strategie alternativă în care alături de secvențele genelor 16S ARNr, sunt folosiți și alți markeri moleculari, crescând capacitatea de a diferenția tulpinile *Bt* și alte specii de *Bacillus* (Vidal-Quist *et al.*, 2013; Caamano-Antelo *et al.* 2015; Rabinovitch *et al.*, 2017).

În studiul diversității speciilor din cadrul genului *Bacillus* poate fi utilizată de asemenea analiza regiunilor repetitive ale genomului. Utilizarea sa a făcut posibilă diferențierea între tulpinile de *Bt* și *B. cereus* (Reyes-Ramirez, Ibarra, 2005; Cherif *et al.*, 2007; Sauka *et al.*, 2012; Katara *et al.*, 2013; Rabinovitch *et al.*, 2017). Studiul acestor regiuni poartă numele de amprenatare ADN (*DNA-fingerprinting*) și se bazează pe amplificarea prin PCR a secvenței palindromice repetitive enterobacteriene (REP – *Repetitive Enterobacterian Palindrome*) și secvenței intergenice repetitiv consensus pentru enterobacterii (ERIC - *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus sequences*) (Rabinovitch *et al.*, 2017). Variabilitatea genetică găsită în aceste secvențe face posibilă aplicarea cu succes a acestei abordări în studiul diversității intra- și interspecifice în cadrul genului *Bacillus*. Eficiența de diferențiere a speciilor pentru strategia ERIC este mai mare decât bazată pe secvențele ARNr 16S (Rai *et al.*, 2015). Tehnica constă în proiectarea unor primeri care se aliniază în vecinătatea secvențelor repetitive. Specificitatea primerilor asigură amplificarea unor porțiuni de ADN de lungime variabilă, ceea ce permite, în rezultatul realizării electroforezei de a obține profiluri polimorfe distincte pentru fiecare specie (Versalovic *et al.*, 1994; Lima *et al.*, 2002; Rabinovitch *et al.*, 2017). Avantajele suplimentare ale acestei tehnici sunt implementarea ușoară și rapidă, simplitatea și faptul că rezultatele sunt fiabile și reproductibile. Aceste regiuni sunt distribuite de-a lungul genomului bacteriei, iar amplificarea lor generează modele electroforetice care sunt asociate cu specifice specii sau tulpini (Versalovic *et al.*, 1994, Reyes-Ramirez, Ibarra, 2005; Cherif *et al.*, 2007). Aplicarea ERIC-PCR a făcut posibilă diferențierea tulpinilor de *Bt* provenind din diferite localități, regiuni, demonstrând capacitățile metodei de a discrimina tulpinile după proveniența acestora (Garcia *et al.*, 2015). Rezultate similare au fost obținute folosind tehnica REP-PCR pentru a diferenția tulpinile din diferite probe (Sauka *et al.*, 2012; da Silva, Valicente, 2013; Rabinovitch *et al.*, 2017). Aceste abordări urmează a fi explorate în scopul caracterizării tulpinilor virulente de *Bt* și dezvoltării în baza lor a unor biopreparate insecticide.

4.2. Izolarea și identificarea noilor tulpini bacteriene pentru a fi utilizate împotriva dăunătorilor culturilor legumicole

Pentru izolarea eficientă a tulpinilor entomopatogene, în special obținerea tulpinilor din genul *Bacillus*, este necesar un proces selectiv. Pentru a realiza acest lucru, a fost efectuată o revizuire a literaturii privind izolarea tulpinilor noi de *Bt* din probe de insecte și a fost stabilit un protocol de izolare. Pentru rezultate

mai bune s-au făcut diferite ajustări (temperatura și timpul tratamentului termic; cantitatea de probă pe placă). Specimenele de insecte colectate au fost plasate în recipiente separate pentru a evita contaminarea. După sosirea în laborator, probele au fost păstrate la frigider la 4°C înainte de izolare pentru a preveni dezvoltarea microorganismelor. După prelucrarea specimenelor, din fiecare localitate, s-a selectat câte 1 exemplar din speciile țintă pentru izolare bacteriană. Probele au fost incubate în baie de apă la 80°C timp de 10 minute sau 65°C timp de 30 de minute, iar apoi tuburile au fost răcite rapid la temperatură scăzută. Acest pas ucide cele mai multe celule vegetative ale bacililor și bacteriilor care nu formează spori, îmbogățind astfel sporiile speciilor de *Bacillus* (datorită naturii lor rezistente la căldură). După ce s-a lăsat să se sedimenteze conținutul solid al tuburilor, 100 μl, 150 μl sau 200 μl fiecare din proba încălzită și diluțiile probei încălzite sau numai diluțiile au fost distribuite pe suprafața cutiilor Petri care conțineau mediul T3 (Travers *et al.*, 1987). Este cunoscut faptul că mediul T3 inhibă parțial creșterea și sporularea *Bacillus* spp. altele decât *B. thuringiensis*. Cutiile Petri au fost incubate la 30°C pentru a permite creșterea bacteriilor. Creșterea bacteriană a fost verificată zilnic. Pentru a obține culturi pure, coloniile individuale au fost selectate vizual fiind ulterior repicate în cutii Petri cu mediu NA steril în fiind incubate la 30°C. Creșterea bacteriană a fost verificată vizual la fiecare 24 de ore fiind înregistrată prezența unui morfotip per cutie Petri. Tulpinile au fost lăsate să crească timp de 10 zile în incubator, ulterior fiind păstrate la frigider la 4°C. Pe baza cercetărilor efectuate, a fost constatat că cele mai bune rezultate au fost obținute la tratarea probelor la 65°C timp de 30 de minute, iar după aceea însămânțarea cutiilor Petri cu câte 150 μl.

În rezultatul cercetărilor efectuate au fost izolate și evidențiate în cultură pură 154 tulpini bacteriene, 80 de tulpini fiind izolate din microflora speciei *Helicoverpa armigera* și 74 tulpini din microflora speciei *Spodoptera exigua*. Datele cu privire la localitatea unde au fost colectate insectele, insecta gazdă și numărul de tulpini izolate, sunt prezentate în figura 4.2.

Din cele 154 cutii Petri reinoculate în cultură pură în baza unui screening vizual al caracteristicilor morfo-culturale similare bacteriei *B. thuringiensis* au fost selectate 23 tulpini (Moldovan *et al.*, 2018; Popov, 2020). În calitate de martor pozitiv au fost utilizate două tulpini de *Bt* (*kurstaki* și *tenebrionis*) din colecția Institutului de Zoologie. Criteriile de selecție au fost culoarea coloniilor albă cremoasă, netransparente sau semitransparente, cu forma circulară neregulată, cu suprafața netedă, lucidă, umedă, colonii cu profil plat, situate pe suprafața mediului. Tulpinile selectate au fost inoculate central pe cutii Petri cu mediu nutritiv T3 steril, ulterior fiecare tulpină a fost caracterizată detaliat din punct de vedere morfologic. Aspectul extern al coloniei pentru unele tulpini bacteriene este prezentat în figura 4.3.

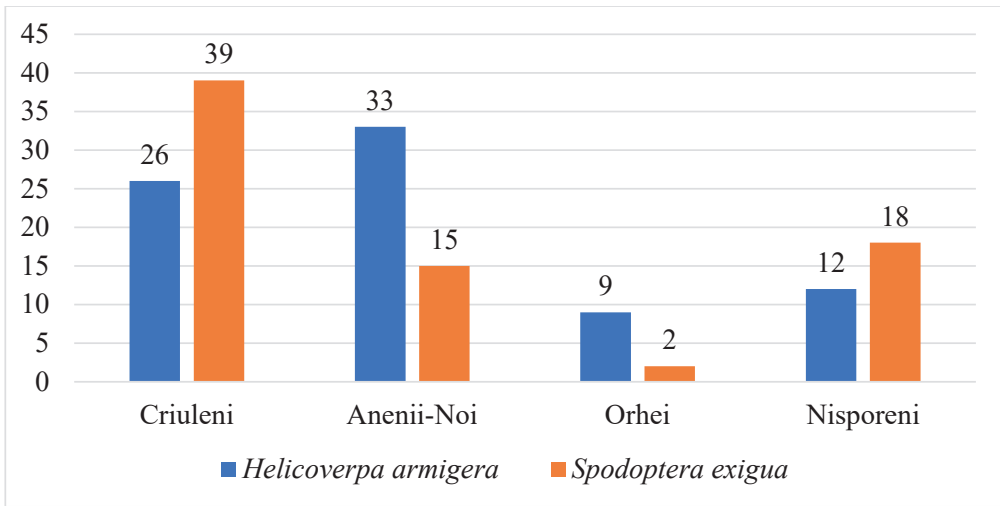


Fig. 4.2. Numărul de tulpini bacteriene izolate conform localității și insectei gazdă

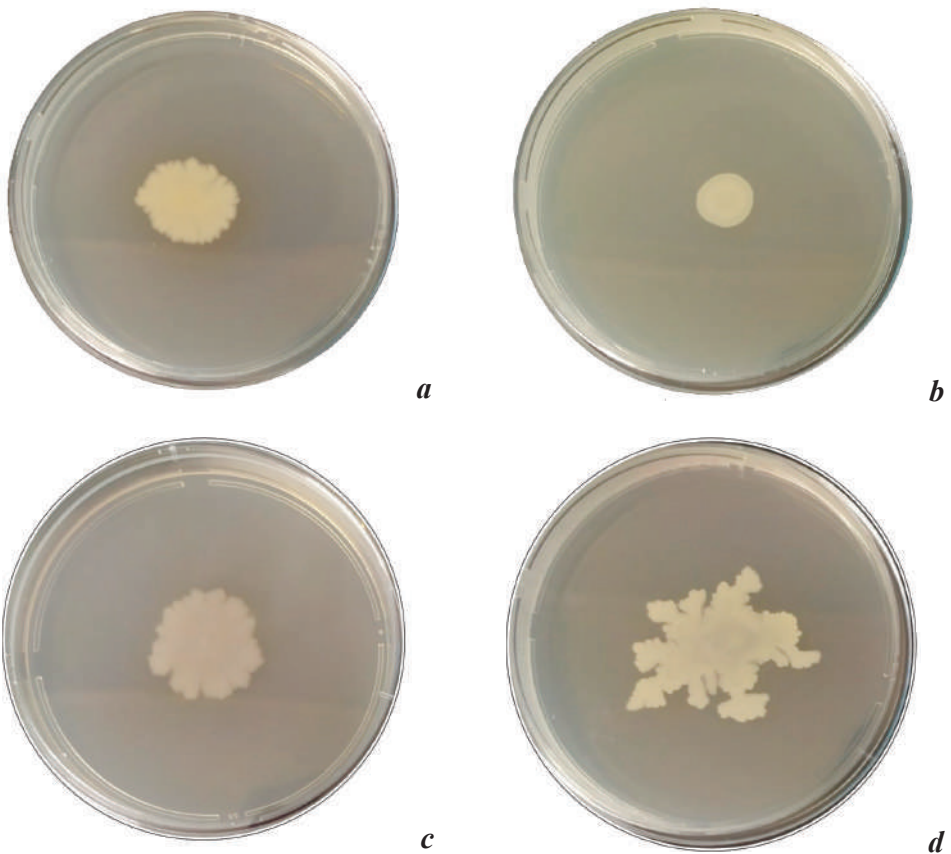


Fig. 4.3. Morfologia coloniilor (orig.)

a – Tulpina *Bt tenebr.*; *b* – Tulpina № 1; *c* – Tulpina № 2; *d* – Tulpina № 4

În rezultatul efectuării colorației Gram din 24 tulpini investigate 13 au fost Gram pozitive, 9 Gram negative și o cultură mixtă (bacili Gram pozitivi și Gram negativi) (figura 4.4).

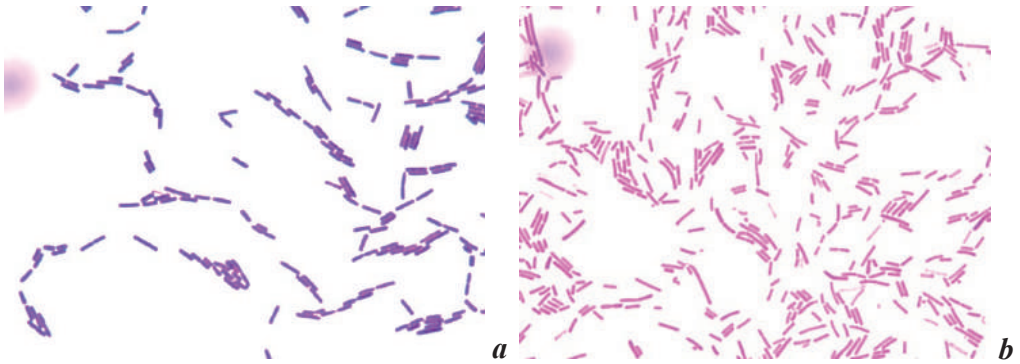


Fig. 4.4. Evidențierea structurii peretelui celular (colorația Gram) (orig.)

a – tulpină Gr⁺, *c* – tulpină Gr⁻.

În rezultatul analizei datelor privind colorația Gram și colorația Schaeffer-Fulton a fost stabilit faptul că 13 din 23 tulpini investigate sunt Gram pozitive sporulate, similar tulpinilor martor *Bt tenebr.* și *Bt kurskaki* (figura 4.5). O tulpină a reprezentat o cultură mixtă de bacili Gram pozitivi și Gram negativi sporulați, și nu a fost inclusă în studiile ulterioare privind caracterizarea proprietăților biochimice.

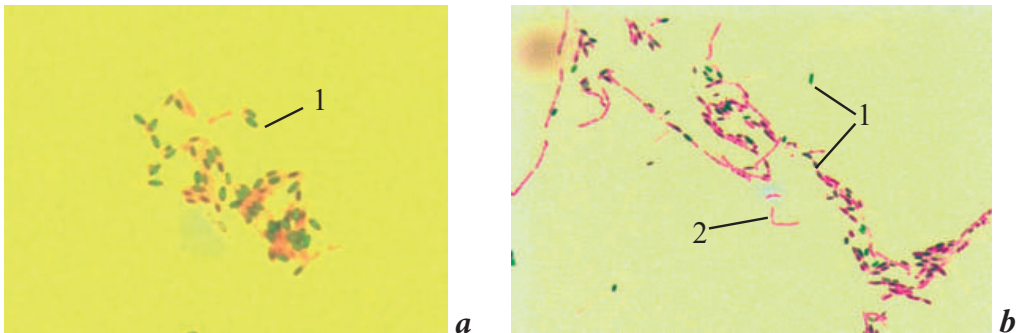


Fig. 4.5. Evidențierea endosporului (colorația Schaeffer-Fuelton) (orig.)

a – *Bt tenebr.* (martor pozitiv), *b* – tulpina № 8,

1 – sporul (evidențiat cu verde), *2* – citoplasma (evidențiată cu roșu).

Proprietățile biochimice ale tulpinilor bacteriene investigate

Pentru studierea proprietăților biochimice au fost selectate 13 tulpini bacteriene, bacili, Gram pozitivi sporulați care au manifestat proprietăți morfologice asemănătoare speciei *Bacillus thuringiensis*. În cadrul testărilor biochimice au fost analizate activitatea catalazei și a amilazei și capacitatea tulpinilor de a hidroliza gelatina și cazeina.

• Activitatea catalazei

Activitatea catalazei poate fi remarcată prin formarea bulelor la suprafața coloniilor care denotă reacție pozitivă. Intensitatea de formare a bulelor se evaluează pe o scară de la 1-5. Toate tulpinile luate în studiu au demonstrat prezența activității catalazei (figura 4.6, tabelul 4.2), însă unele tulpini au manifestat o intensitate a reacției mai pronunțată, iar altele mai slabă.



Fig. 4.6. Rezultatele testului activitatea catalazei (orig.)

a – *Bt kurstaki* (intensitatea 3); *b* – Tulpina № 16 (intensitatea 3-4);
c – Tulpina № 8 (intensitatea 1)

Tabelul 4.2. Rezultatele testului activitatea catalazei

Nr. d/o	Insecta gazdă	Cultura	Rezultatul testului	Intensitatea
1.		Martor pozitiv <i>Bt tenebr.</i>	+	1-2
2.		Martor pozitiv <i>Bt kurstaki</i>	+	3
3.	<i>Helicoverpa armigera</i>	Tulpina № 1	+	1
4.		Tulpina № 2	+	1
5.		Tulpina № 3	+	3-4
6.	<i>Spodoptera exigua</i>	Tulpina № 4	+	5
7.		Tulpina № 5	+	1
8.		Tulpina № 6	+	2
9.		Tulpina № 7	+	1
10.		Tulpina № 8	+	1-2
11.		Tulpina № 9	+	1
12.		Tulpina № 10	+	1
		Tulpina № 11	+	2
		Tulpina № 12	+	2
		Tulpina № 13	+	3

• **Activitatea proteolitică**

Hidroliza cazeinei poate fi observată prin apariția zonelor transparente în jurul coloniilor. În urma efectuării testului a fost constatat faptul că toate tulpinile cu excepția tulpinilor *Bt kurstaki* și tulpina № 11 au manifestat abilitatea de a hidroliza cazeina (figura 4.7, tabelul 4.3).

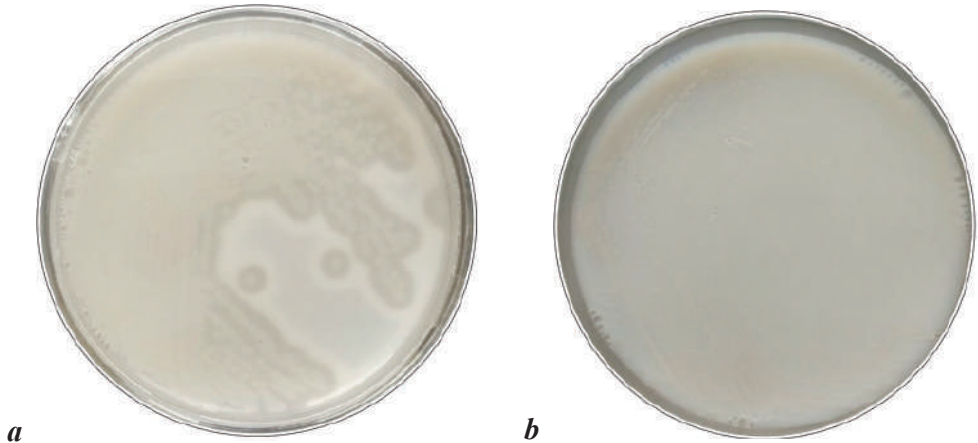


Fig. 4.7. Rezultatele testului hidroliza cazeinei (orig.)

a – tulpina № 8 (rezultat pozitiv); **b** – *Bt kurstaki* (rezultat negativ)

Hidroliza gelatinei poate fi observată prin lichefierea mediului nutritiv cu conținut de gelatină. Din tulpinile investigate izolate luate în studiu, 9 tulpini au demonstrat această abilitate, și 6 nu au fost capabile de a hidroliza gelatina. Tulpina martor *Bt tenebr.* a demonstrat abilitatea de a produce gelatinaza, pe când tulpina martor *Bt kurstaki* nu posedă această proprietate. 6 tulpini au avut o activitate înaltă proteolitică hidrolizând complet gelatina (tabelul. 4.3).

Tabelul 4.3. Activitatea enzimatică a tulpinilor incluse în studiu

Nr. d/o	Insecta gazdă	Cultura	Hidroliza		
			cazeinei	gelatinei	amidonului
1.		Martor pozitiv <i>Bt tenebr.</i>	+	+ (parțial)	+
2.		Martor pozitiv <i>Bt kurstaki</i>	-	-	-
3.	<i>Helicoverpa armigera</i>	Tulpina № 1	+	+ (parțial)	+
4.		Tulpina № 2	+	-	+
5.		Tulpina № 3	+	+ (total)	+
6.	<i>Spodoptera exigua</i>	Tulpina № 4	+	+ (total)	-
7.		Tulpina № 5	+	-	-
8.		Tulpina № 6	+	+ (total)	+
9.		Tulpina № 7	+	-	+
10.		Tulpina № 8	+	+ (parțial)	+

Nr. d/o	Insecta gazdă	Cultura	Hidroliza		
			cazeinei	gelatinei	amidonului
11.		Tulpina № 9	+	+(total)	+
12.		Tulpina № 10	+	-	+
13.		Tulpina № 11	-	-	-
14.		Tulpina № 12	+	+(total)	+
15.		Tulpina № 13	+	+(total)	+

• Activitatea amilazei

În testul activitatea amilazei apariția culorii albastre atestă că amidonul nu a fost degradat, iar culoarea cafenie – gălbuie confirmă hidroliza amidonului până la oligozaharide.

Din 15 tulpini evaluate, 11 tulpini au demonstrat activitate amilolitică (figura 4.8), iar 4 tulpini nu au fost capabile de a hidroliza amidonul (figura 4.8; tabelul 4.3). Tulpinile martor au demonstrat proprietăți variabile, tulpina *Bt tenebr.* manifestând prezența activității enzimatică a amilazei, pe când tulpina *Bt kurstaki* – lipsa acestei proprietăți.

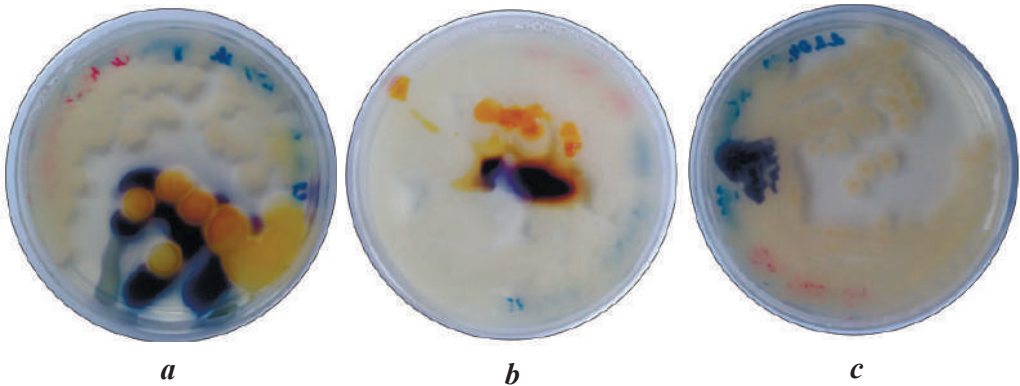


Fig. 4.8. Rezultate obținute la efectuarea testului privind activitatea amilazei (orig.) a - b – test pozitiv, c - test negativ

În rezultatul cercetărilor efectuate au fost evidențiate tulpini bacteriene cu proprietăți morfologice și biochimice similare tulpinilor bacteriene din specia *Bacillus thuringiensis* Berliner 1915. Acestea au format colonii circulare regulate/neregulate, netransparente, albe cremoase, cu suprafața netedă, lucidă/opacă, umedă/uscată, situate la suprafața mediului nutritiv, marginea fiind lobată/ondulată, structura coloniilor omogenă/granulară similar tulpinilor martor pozitiv *Bt tenebr.* și *Bt kurstaki*. Tulpinile au fost Gram pozitive și sporulate. Date similare pot fi evidențiate în lucrările autorilor Rabinovitch *et al.* (2017) și Astuti *et al.* (2018).

Toate tulpinile inclusiv două tulpini martor au manifestat reacție pozitivă la testul activitatea catalazei, ceea ce corespunde cu datele raportate de către Turnbull

(1996), Lee *et al.* (2004), Chatterjee *et al.* (2007), Astuti *et al.* (2018) și Sharma, Iyer (2018).

Dintre tulpinile cercetate 8 tulpini prezintă un profil biochimic similar tulpinii martor *Bt tenebrionis*, în ceea ce privește capacitatea acestora de a scinda hidroliza cazeina și gelatina și de a hidroliza amidonul. Aceleași date sunt prezentate și de alți autori în studiile lor (Sharma, Iyer, 2018). Cinci tulpini bacteriene izolate au manifestat reacție variabilă la testul hidroliza gelatinei și hidroliza amidonului, date consistente cu cercetările realizate de către autorii Alvarez și Loto, (2012), în lucrarea acestor autori fiind argumentat că aceste abilități pot varia la diferite tulpini de *Bt*. O tulpină nu produce proteaza, gelatinaza și amilaza la fel ca tulpina martor *Bt kurstaki* (tabelul 4.4)

Tabelul 4.4. Date sumare privind proprietățile tulpinilor izolate

Nr. d/o	Tulpina	Colorația Gram	Endospor	Incluziuni parasporale	Activitatea catalazei	Hidroliza cazeinei	Hidroliza gelatinei	Hidroliza amidonului
Date proprii								
1.	Martor pozitiv <i>Bt tenebr.</i>	+	+	+	+	+	+	+
2.	Martor pozitiv <i>Bt kurstaki</i>	+	+	+	+	-	-	-
3.	Tulpinile noi izolate	+	+	*	+	+/-	+/-	+/-
Datele din literatura de specialitate								
Chatterjee <i>et al.</i> , 2007		+	+	+	+	+	+	*
Alvarez, Loto, 2012		*	*	+	+	+	+/-	+/-
Sharma, Iyer, 2018		+	*	+	+	+	+	+

«+» - reacție pozitivă; «-» - reacție negativă; «*» - nu a fost analizat acest parametru

4.3. Prognozarea potențialului insecticid al tulpinilor autohtone de *Bacillus*

Prognozarea potențialului insecticid este extrem de importantă în studiile privind patogenitatea și virulența tulpinilor de *Bt* deoarece permite de a reduce numărul de teste de evaluare a activității insecticide în condiții de laborator.

Identificarea genelor δ -endotoxinei *B. thuringiensis* prin metoda PCR s-a dovedit a fi o metodă foarte utilă pentru caracterizarea tulpinilor, iar utilizarea ei ca pas preliminar de selecție oferă multe avantaje în ceea ce privește rapiditatea și reproducibilitatea (Porcar *et al.*, 2003). Identificarea bazată pe tehnica PCR a genelor cry de *B. thuringiensis* a fost dezvoltată pentru prima dată de Carozzi *et al.* (1991), care a introdus această tehnică ca instrument de predicție a activității insecticide. Carozzi *et al.* au propus PCR ca o metodologie precisă și rapidă pentru identificarea tulpinilor noi și predicția activității insecticide a noilor tulpini izolate și, de asemenea,

au prognozat posibila utilizare a PCR pentru descoperirea genelor Cry necunoscute anterior. Ei au sugerat că tulpinile care produc profiluri PCR neobișnuite ar putea fi selectate pentru analize ulterioare care să conducă la identificarea și caracterizarea unor noi gene ipotetice de Cry (Carozzi *et al.*, 1991).

Reacția în lanț a polimerazei (PCR) a fost utilizată pe scară largă pentru a caracteriza colecțiile de tulpini *Bt* (Ceron *et al.*, 1995; Beron *et al.*, 2005; Vidal-Quist *et al.*, 2009). Această tehnică este o metodă extrem de sensibilă care asigură detecția secvențelor țintă din genele cry, responsabile de producerea toxinelor parasporale. Pentru realizarea amplificării sunt suficiente cantități mici de ADN. Metoda permite de a efectua un screening extensiv al colecțiilor de tulpini bacteriene. Tulpinile pot fi clasificate conform tipului de genă Cry pe care o posedă și de asemenea conform spectrului potențial de gazde. Eficiența metodei PCR în identificarea pe reprezentanților familiei de gene Cry este garantată de prezența regiunilor conservate în secvența acestora. În scopul sporirii vitezei de lucru și reducerii costurilor PCR standard poate fi substituit cu multiplex PCR, abordare în care în același amestec de reacție se folosesc mai multe perechi de primeri pentru detecția simultană a mai multor reprezentanți ai familiei de gene Cry (Jain *et al.*, 2017).

Activitatea insecticidă a proteinelor Cry corelează într-o măsură cu tipurile de gene a acestor protoxine. Astfel, un anumit tip de genă identificat în genomul tulpinii poate permite de a prezice potențialul insecticid al acestei tulpini *Bt*. Utilizarea pe larg a genelor cry în scopul modificării genetice a plantelor, a generat apariția rezistenței dăunătorilor la toxinele respective. Astfel a reapărut interesul pentru identificarea unor noi variante ale genelor Cry care ar produce variante modificate ale toxinelor la care dăunătorii nu sunt încă adaptați. Totodată relevarea unor tulpini cu activitate insecticidă sporită, implică cercetarea genelor și proteinelor cry pe care le posedă și produc acestea. Apariția metodelor molecular-genetice a facilitat identificarea genelor Cry deja descoperite și testarea unui număr mare de tulpini, reducând timpul și costurile asociate.

În ultimul deceniu, PCR a fost exploatat pe scară largă pentru a determina conținutul genei Cry al multor colecții de tulpini de *B. thuringiensis* (Bobrowski *et al.*, 2001; Porcar *et al.*, 2003). Deoarece PCR permite screening-ul rapid și simultan a multor tulpini, acesta a înlocuit parțial evaluarea în condiții de laborator a activității insecticide în caracterizarea preliminară a colecțiilor de *B. thuringiensis*. Astăzi, PCR a devenit o etapă de rutină de screening pentru care au un număr mare de tulpini, atât în laboratoarele de cercetare publice, cât și private. Cu toate acestea, predicția activității insecticide prin PCR trebuie să fie întotdeauna însoțită de evaluarea activității insecticide pe obiecte biologice vizate și nevizate, pentru a evalua potențialul tulpinilor de a fi dezvoltate în calitate de biopesticide (Masson *et al.*, 1998; Bobrowski *et al.*, 2001, Porcar *et al.*, 2003).

În studiu au fost incluse 14 tulpini din genul *Bacillus* izolate anterior și caracterizate morfologic de către colaboratorii Institutului de Zoologie (Moldovan *et al.*, 2018; Popov, 2020) și două tulpini de *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus thuringiensis*

subsp. *kurstaki* și *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* în calitate de tulpini maritor. Tulpinile de *Bacillus* selectate la cultivarea pe mediul nutritiv Nutrient Agar formează colonii mari, circulare regulate/neregulate, netransparente, albe cremoase, cu suprafața netedă, lucidă/opacă, umedă/uscată, situate la suprafața mediului nutritiv, marginea fiind lobată/ondulată, structura coloniei omogenă/granulară similar tulpinilor maritor pozitiv *Bt tenebrionis* și *Bt kurstaki*. Tulpinile au fost Gram pozitive și sporulate (Popov, 2020).

Utilizarea kitului Pure Link Genomic DNA Mini Kit a permis de extrage ADN din toate tulpinile incluse în studiu. Reacția PCR a permis de a amplifica gena *Cry1* la 12 din cele 14 tulpini incluse în studiu (figura 4.9).

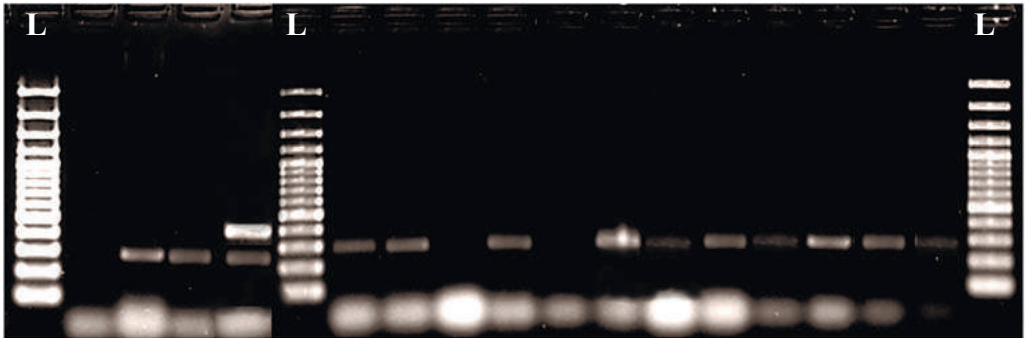


Fig. 4.9. Rezultatele electroforezei produsului PCR obținut cu utilizarea perechii de primeri CJI-1 și CJI-2

În urma analizei rezultatelor electroforezei produsului PCR au fost construite curbe etalon pentru fiecare Ladder plasat (figurile 4.10 și 4.11).

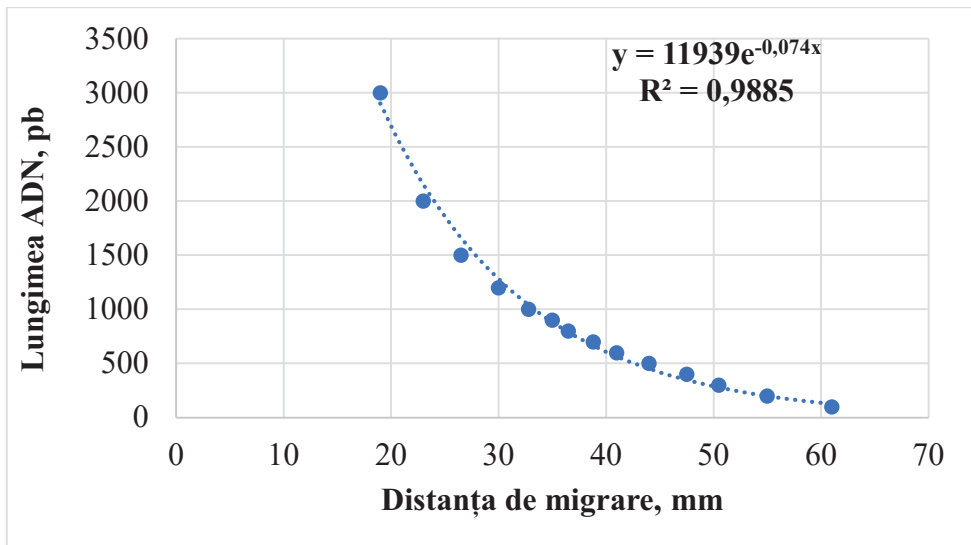


Fig. 4.10. Curba etalon nr. 1 construită în baza distanței de migrarea a Ladder-ului în gelul de agaroză de 2%

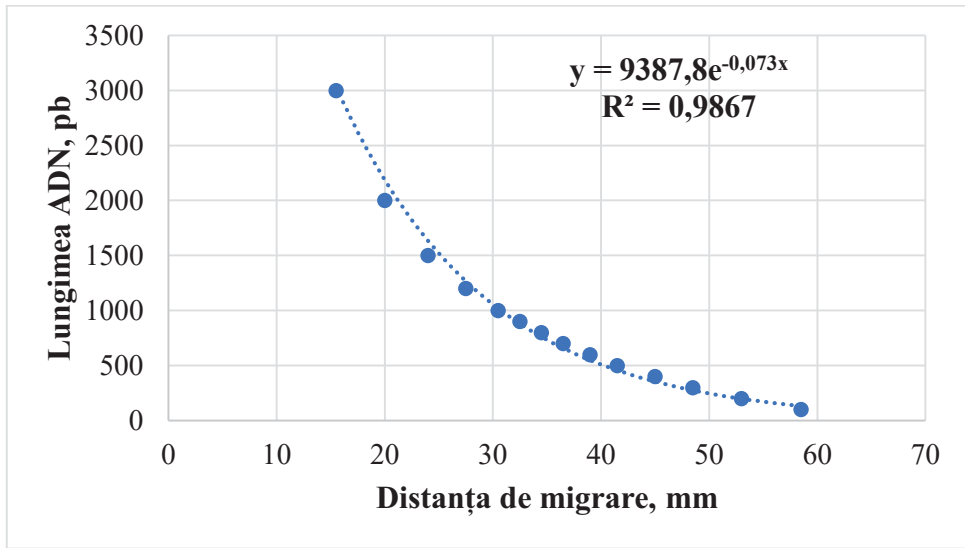


Fig. 4.11. Curba etalon nr. 2 construită în baza distanței de migrarea a Ladder-ului în gelul de agaroză de 2%

În baza curbelor etalon au fost deduse ecuațiile $y_1 = 11939e^{-0,074x}$ ($R^2 = 0,9885$) și $y_2 = 9387,8e^{-0,073x}$ ($R^2 = 0,9867$). Valoarea R^2 a confirmat veridicitatea modelului dedus și a permis de a utiliza aceste ecuații pentru estimarea lungimii produsului amplificat cu utilizarea perechii de primeri CJI-1 și CJI-2. Lungimea produsului PCR obținut pentru cele 14 tulpini investigate și 2 tulpini martor incluse în studiu a fost egal cu 272-274 pb. În cazul unei tulpini a fost obținut încă un produs de amplificare egal cu 355pb.

În cercetarea potențialului insecticid a tulpinilor de *Bacillus sp.*, s-a realizat analiza speciei *Bacillus thuringiensis* și subspeciile ei. A fost realizat studiul comparativ al rezultatelor obținute în prezenta lucrare și în lucrări similare în care a fost utilizată perechea de primeri CJI-1 și CJI-2 (Ceron *et al.*, 1995). În rezultatul cercetărilor întreprinse a fost stabilit că din 14 tulpini autohtone investigate, 13 tulpini posedă genele Cry1, ceea ce denotă faptul că acestea au potențialul de a produce proteine toxice pentru Diptere, Lepidoptere și Coleoptere (tabelul 4.5).

Caracterizarea moleculară a probelor cercetate a fost efectuată în scopul identificării genelor ce codifică proteinele Cry1. În cercetările din prezenta lucrare a fost utilizată o pereche de primeri universali pentru amplificarea unei game largi de variante ale genei Cry1, inclusiv cryIAa, cryIAb, cryIAc, cryIB ș.a. (Ceron *et al.*, 1995). Rezultatele obținute demonstrează eficiența metodei PCR în detecția potențialului insecticid a tulpinilor de *Bacillus sp.* Tulpinile locale urmează a fi incluse în cercetări privind activitatea insecticidă împotriva unei game largi de dăunători. Studiile ulterioare urmează a fi orientate pe screening-ul colecției de tulpini privind prezența genelor din alte familii de gene Cry. De asemenea pot fi utilizați primeri specifici care vor permite de a amplifica variante ale genelor.

Tabelul 4.5. Analiza comparativă a rezultatelor obținute cu datele din literatura de specialitate

Autorii	Produs PCR 272-274 pb	Produs PCR 350pb
Bobrowski <i>et al.</i>, 2001	+	-
Salekjalali <i>et al.</i>, 2012	+	-
Kumar <i>et al.</i>, 2013	+	-
Mohammadou <i>et al.</i>, 2014	+	-
Lucrarea de față	+	+

Proteinele Cry cuprind cel puțin 80 de subgrupuri cu mai mult de 200 de membri. Aceste proteine au o masă moleculară de la 50 până la 160 kDa (Bravo *et al.*, 2005; Salekjalali *et al.*, 2012). Modul de acțiune al toxinelor Cry este un proces în mai multe etape care implică interacțiunea cu mai multe molecule de receptor care duce la inserarea membranei și liza celulelor. Caracterizarea modului de acțiune al toxinelor Cry în alte organisme susceptibile va fi importantă pentru a înțelege pe deplin modul de acțiune al acestei familii de proteine. De asemenea, identificarea moleculelor receptorilor și a epitopilor de legare va ajuta la dezvoltarea strategiilor de a face față problemei potențiale a rezistenței insectelor. În plus, screening-ul de noi proteine Cry cu noi specificități pentru insecte și receptori va fi fundamental pentru dezvoltarea de noi produse pentru controlul diferitor specii de insecte dăunătoare. Prezintă interes cercetarea în continuare a produsului de 350 pb identificat, secvențierea acestuia și analiza secvenței prin comparație cu secvențele disponibile în baza de date NCBI GenBank.

4.4. Evaluarea patogenității și virulenței tulpinilor bacteriene

• Evaluarea activității insecticide a tulpinilor native împotriva unor lepidoptere dăunătoare

Pentru pregătirea inoculului tulpina *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* CN-MN-BB-04 este cultivată timp de o zi pe agitator la temperatura de 30°C pe mediu nutritiv agarizat T3 cu următoarea componentă (g/l): Tripton (sau Casein Trypsic Peptone) – 3, triptoză – 2; extract de drojdii – 1,5; NaH₂PO₄ × H₂O – 6,9; MnCl₂ × 4H₂O – 0,008; agar – 15; pH – 6,8. Celulele sunt precipitate, resuspendate în apă distilată și incubate în agitator circular pentru o noapte la 30°C. În acest timp celulele lizează eliberând spori și cristale. Ulterior este determinată concentrația de spori și cristale de δ-endotoxină din lichidul cultural rezultat. Concentrația de spori este determinată după numărul de colonii în creștere pe mediu agarizat T3 după însămânțarea diluției. Prezența cristalelor poate fi monitorizată prin microscopie cu contrast de fază.

A fost evaluată activitatea culturii bacteriene *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* BB-04 împotriva a 3 dăunători semnificativi ai pomilor fructiferi din ordinul Lepidoptera.

Activitatea insecticidă a tulpinii *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* CN-MN-BB-04 a fost testată pe larvele provenite din populația naturală a speciilor, fiind selectați pentru studii doar indivizi sănătoși. În ecosistemul din care au fost prelevate exemplarele dăunătorului nu au fost aplicate metode chimice sau biologice de combatere a dăunătorilor. A fost pregătită o serie din 5 diluții decimale ale suspensiei tulpinii bacteriene în soluție 0,9% NaCl sterilă cu diferite concentrații de spori: $0,9 \times 10^9$ spori/ml, $0,9 \times 10^8$ spori/ml, $0,9 \times 10^7$ spori/ml, $0,9 \times 10^6$ spori/ml, $0,9 \times 10^5$ spori/ml. În calitate de martor a fost utilizată soluția de 0,9% NaCl. În suspensiile pregătite sunt introduse frunze de măr de aproximativ aceeași mărime, frunzele sunt uscate la temperatura de 20°C și plasate în vase Petri. Pentru fiecare diluție sunt utilizate câte 10 insecte și 2-5 frunze de măr tratate. Experiența a fost realizată în 3 repetiții. Mortalitatea insectelor a fost cuantificată zilnic, la 21°C și intervalul de zi 18 ore. Activitatea biologică a tulpinii exprimată în LC_{50} a fost calculată după formula lui Kerber în valorile concentrației de spori în diluții ale culturii bacteriene: $\lg LC_{50} = \lg C_M - \sigma (\Sigma L - 0.5)$, unde C_M – concentrația maximă testată; σ – logaritmul multiplicării diluției; ΣL – suma valorilor L pentru toate concentrațiile.

A fost constatat faptul că o concentrație de $0,9 \times 10^9$ spori/ml, provoacă o reducere cu 96,67% a efectivului dăunătorului *Lymantria dispar*, cu 93,33% a efectivului speciei *Cydia pomonella* și cu 90,0% în cazul dăunătorului *Archips rosana* (tabelul 4.6) (Moldovan et al., 2017).

Tabelul 4.6. Mortalitatea insectelor după aplicarea suspensiei din cultura bacteriană a tulpinii *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* BB-04
(după Moldovan et al., 2017)

Specia	Mortalitatea insectelor după prelucrare cu diverse concentrații (%)					Martor NaCl (0,9 %)	Activitatea insecticidă LC_{50} , spori/ml
	$0,9 \times 10^9$ spori/ml	$0,9 \times 10^8$ spori/ml	$0,9 \times 10^7$ spori/ml	$0,9 \times 10^6$ spori/ml	$0,9 \times 10^5$ spori/ml		
<i>Cydia pomonella</i> (L.)	93,33	93,33	86,67	73,33	63,33	6,6	$2,618 \times 10^5$
<i>Archips rosana</i> L.	90,0	86,67	80,0	70,0	56,67	3,3	$4,578 \times 10^5$
<i>Lymantria dispar</i> L.	96,67	96,67	90,0	76,67	73,33	3,3	$1,392 \times 10^5$

Cea mai efektivă dintre concentrațiile testate, pentru *Lymantria dispar* L. 1758, s-a dovedit a fi $0,9 \times 10^8$ spori/ml. Astfel o reducere cu 50% a efectivului dăunătorului *Lymantria dispar* L., poate fi obținută la aplicarea culturii bacteriene *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* CNMN-BB-04 în concentrație de $1,392 \times 10^5$ spori/ml, în soluție de 0,9% NaCl. Rezultatele comparative cu alte cercetări simiplare sunt prezentate în tabelul 4.7 (Brevet de invenție MD 4304).

Tabelul 4.7. Virulența tulpinii *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* CNMN-BB-04 împotriva speciei *Lymantria dispar* L. (Brevet de invenție MD 4304)

Nr.	Tulpina	Titrul sporilor, mlrd spori/ml	Activitatea insecticidă LC ₅₀ , spori/ml
1.	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> CNMN-BB-04	0,9	1.392×10^5
2.	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> B159/252Bt etalon	4,03	2.377×10^5

Datele tabelului 4.7 denotă că tulpina bacteriană propusă *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* CNMN-BB-04 posedă o activitate insecticidă pronunțată asupra lepidopterelor și poate fi utilizată ca agent biologic în controlul efectivului lor numeric. 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 (Brevet de invenție MD 4304).

Bacillus thuringiensis este o bacterie cunoscută ca un agent important în controlul biologic. Aceasta este utilizată pe scară largă ca bioinsecticid pentru controlul multor insecte dăunătoare, și constituie baza a peste 90% din biopesticidele disponibile în comerț, datorită absenței efectelor toxice asupra omului și altor organisme homeoterme, și lipsei poluării mediului ambiant. Este cunoscută tulpina *Bt.* subsp. *kurstaki* Z-52, utilizată pentru obținerea preparatului "Lepidocid", insecticid biologic pentru combaterea lepidopterelor (Zurabova *et al.*, Patent SU 769787). Cea mai apropiată după esența tehnică și rezultatul tehnic de tulpina CNMN-BB-04 este tulpina de bacterii *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* B-159/252Bt, activă împotriva dăunătorilor din ordinul Lepidoptera (Aculova *et al.*, Patent RU 2179392). Dezavantajul acestor tulpini constă în faptul că activitatea lor insecticidă este mai puțin eficientă. Respectiv, pentru obținerea tulpinii în cantități industriale se vor consuma mai mulți reactivi pentru mediul de cultivare, implicând cheltuieli suplimentare, și ca urmare sporind costul produsului. Un alt dezavantaj este cantitatea sporită de spori per mililitru introduse în mediul ambiant, pentru asigurarea efectului insecticid (MD 4304; MD 4916; Moldovan *et al.*, 2017; Moldovan, 2019).

Problema pe care o rezolvă cercetările realizate constă în obținerea, din mediul natural, a unor tulpini autohtone noi de bacterii – *Bacillus thuringiensis*, care ar asigura producerea de proteine cu efecte insecticide, cu o activitate mai înaltă contra lepidopterelor.

În rezultatul investigațiilor desfășurate a fost propusă o tulpină nouă de bacterii *Bt. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, izolată din ecosistemele locale, depozitată în Colecția Națională de Microorganisme (Institutului de Microbiologie și Biotehnologie) sub nr. CNMN-BB-04, bioinsecticid pentru combaterea lepidopterelor. Rezultatul principal constă în faptul că tulpina nativă posedă o activitate insecticidă mai înaltă

asupra lepidopterelor față de alte tulpini analizate, este o tulpină autohtonă, ceea ce reduce semnificativ costurile pentru obținerea bioinsecticidelor și asigură micșorarea gradului de poluare al mediului ambiant. Acțiunea insecticidă ținută este determinată de particularitățile biochimice ale tulpinii și anume, capacitatea de a sintetiza δ -endotoxine.

Tulpina autohtonă CNMN-BB-04 posedă o activitate mai înaltă împotriva lepidopterelor incluse în studiul dat, comparativ cu alte tulpini de *Bt*, ca de exemplu tulpina Z-52, utilizată pentru obținerea preparatului "Lepidocid" (Brevete de invenție SU 769787; MD 4304).

• Evaluarea activității insecticide a tulpinilor native de bacterii împotriva unor coleoptere dăunătoare

Evaluarea activității insecticide a tulpinilor de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* CNMN-BB-03 și CNMN-BB-05 a fost realizată pe gândacii adulți proveniți din aceeași populație ai speciilor *Neocoenorhinidius pauxillus* Germ., *Phyllobius oblongus* L., *Sitona lineatus* L., *Tatianaerhynchites aequatus* L. și *Byctiscus betulae* (L.). A fost pregătită o serie din cinci diluții ale culturii tulpinilor cercetate în soluție de 0,9% NaCl cu pasul 10 (concentrațiile indicate în tabelele 4.8 și 4.9). În calitate de martor a fost utilizată soluția de 0,9% NaCl. În suspensiile pregătite au fost introduse frunze de măr și de lucernă de aproximativ aceeași mărime, frunzele au fost uscate la temperatura de 20°C și plasate în vase Petri. Pentru fiecare diluție au fost utilizate câte 10 insecte și 2-5 frunze de plante tratate. Mortalitatea insectelor a fost cuantificată după 3 zile de incubație în incubator la 21°C și intervalul de zi 18 ore (Moldovan *et al.*, 2017).

Activitatea biologică a tulpinii exprimată în LC_{50} a fost calculată după formula lui Kerber în valorile concentrației de spori în diluții ale culturii bacteriene: $\lg LC_{50} = \lg C_M - \sigma (\Sigma L - 0,5)$, unde C_M – concentrația maximă testată; σ – logaritmul multiplicării diluției; ΣL – suma valorilor L pentru toate concentrațiile.

Cultura bacteriană *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* BB-03 în soluție de 0,9% NaCl în concentrație de $1,3 \times 10^9$ spori/ml, provoacă o reducere cu 80% a efectivului dăunătorului *Neocoenorhinidius pauxillus* și o reducere cu 66,6% a efectivului speciei *Sitona lineatus*. Tulpina BB-03 în concentrație de $1,3 \times 10^8$ spori/ml, provoacă o reducere cu 73,3% a efectivului dăunătorului *Phyllobius oblongus* (tabelul 4.8) (Moldovan *et al.*, 2017).

Cultura bacteriană *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* CNMN-BB-05 în soluție de 0,9% NaCl în concentrație de $1,3 \times 10^9$ spori/ml, provoacă o reducere cu 83,3% a efectivului dăunătorului *Tatianaerhynchites aequatus* L. și o reducere cu 76,6% a efectivului dăunătorilor *Neocoenorhinidius pauxillus* Germ. și *Byctiscus betulae* (L.) pe pomi fructiferi și vița de vie (tabelul 4.9) (Brevet de invenție 4916; Moldovan *et al.*, 2017).

Tabelul 4.8. Mortalitatea insectelor după aplicarea suspensiei din cultura bacteriană a tulpinii *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* BB-03

Specia	Nivelul mortalității insectelor după prelucrare cu diverse concentrații (%)					Martor NaCl (0,9%)	Activitatea insecticidă LC ₅₀ , spori/ml
	1,3 × 10 ⁹ spori/ml	1,3 × 10 ⁸ spori/ml	1,3 × 10 ⁷ spori/ml	1,3 × 10 ⁶ spori/ml	1,3 × 10 ⁵ spori/ml		
<i>Neocoenorhinius pauxillus</i> Germ.	80,0	76,6	76,6	66,6	53,3	3,3	1,229 × 10 ⁶
<i>Phyllobius oblongus</i> L.	73,3	73,3	70,0	56,6	50,0	3,3	2,467 × 10 ⁶
<i>Sitona lineatus</i> L.	66,6	63,3	60,0	43,3	33,3	3,3	9,152 × 10 ⁶

Tabelul 4.9. Nivelul peirii dăunătorilor pomilor fructiferi după prelucrarea cu suspensie din cultura bacteriană a tulpinii *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* CNMN-BB-05 (Brevet de invenție 4916; Moldovan *et al.*, 2017).

Nr.	Specia	Nivelul peirii insectelor după prelucrare cu diverse concentrații (%)					Martor NaCl (0,9%)	Activitatea insecticidă LC ₅₀ , spori/ml
		1,3x10 ⁹ spori/ml	1,3 x 10 ⁸ spori/ml	1,3 x 10 ⁷ spori/ml	1,3 x 10 ⁶ spori/ml	1,3 x 10 ⁵ spori/ml		
1.	<i>Tatianaerhynchites aequatus</i> L.	83,3	80,0	76,6	70,0	53,3	3,3	1,068 × 10 ⁶
2.	<i>Neocoenorhinidius pauxillus</i> Germ.	76,6	73,3	66,6	60,0	50,0	6,6	2,961 × 10 ⁶
3.	<i>Byctiscus betulae</i> (L.)	76,6	70,0	60,0	53,3	50,0	3,3	3,801 × 10 ⁶

Datele obținute denotă că tulpinile bacteriene propuse *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* CNMN-BB-03 și CNMN-BB-05 posedă o activitate insecticidă pronunțată asupra coleopterelor curculionide și pot fi utilizate în calitate de agenți de control biologic al speciilor de dăunători cercetare. Tulpinile sunt ecologic inofensive, deoarece au fost extrase din mediul natural, nu sunt patogene pentru organismele vegetale și majoritatea organismelor animale nevizate, fără efecte adverse manifestate la organismele homeoterme. În natură nu sunt introduse organisme noi, ceea ce exclude efectele nedorite asupra ecosistemelor care pot fi înregistrate în cazul utilizării altor patogeni și preparate (Brevet de invenție MD4916; Moldovan *et al.*, 2017; Moldovan, 2019).

• **Evaluarea activității insecticide a tulpinilor bacteriene împotriva speciei *Leptinotarsa decemlineata* Say**

În scopul evaluării activității insecticide, adulții din specia *Leptinotarsa decemlineata* Say au fost transportați la laborator și hrăniți cu frunze proaspete de tomate. Pentru studiile ulterioare au fost selectați doar indivizi sănătoși, activi, fără semne de infecție (figura 4.12).



Fig. 4.12. Menținerea insectelor individual pentru prelevarea ouălor (orig.)

Câte 5 masculi și 5 femele au fost plasați în cuști individuale cu plante de tomate proaspete. Ulterior indivizii au fost plasați individual, ouăle depuse au fost colectate și depozitate în vase Petri sterile până la ecloziune. Larvele sănătoase au fost selectate pentru evaluarea activității insecticide împotriva acestora. Pentru testele biologice au fost selectate 10 tulpini bacteriene. Tulpinile au fost testate împotriva adulților și larvelor gândacului de Colorado. Pentru a identifica cea mai activă tulpină bacteriană, au fost dezvoltate trei modele experimentale (Moldovan *et al.*, 2022 *in press*).

În primul experiment au fost pregătite suspensii de unități formatoare de colonii bacteriene în apă distilată sterilă, cu concentrația de 10^8 ufc/ml. Ulterior, la 1 ml suspensie au fost adăugate alte 5 ml de apă distilată sterilă, și întreg volumul a fost pulverizat pe suprafața frunzelor de tomate. Adulții au fost transferați pe frunzele de

tomate și au fost lăsați să se hrănească timp de 24 de ore. După expunere, adulții au fost transferați în cuști sterile cu frunze de tomate proaspete. Datele privind mortalitatea au fost înregistrate zilnic, insectele primind zilnic frunze de tomate proaspete. Pentru fiecare tulpină bacteriană au fost utilizați 10 indivizi, testele fiind realizate în 3 repetiții (Moldovan *et al.*, 2022 *in press*).

În a doua configurație experimentală, larvele obținute din ouăle colectate au fost transferate în vase Petri sterile și hrănite cu frunze de roșii tratate cu suspensii bacteriene. După 24 de ore de expunere, larvele au fost transferate pe frunze proaspete (figura 4.13).

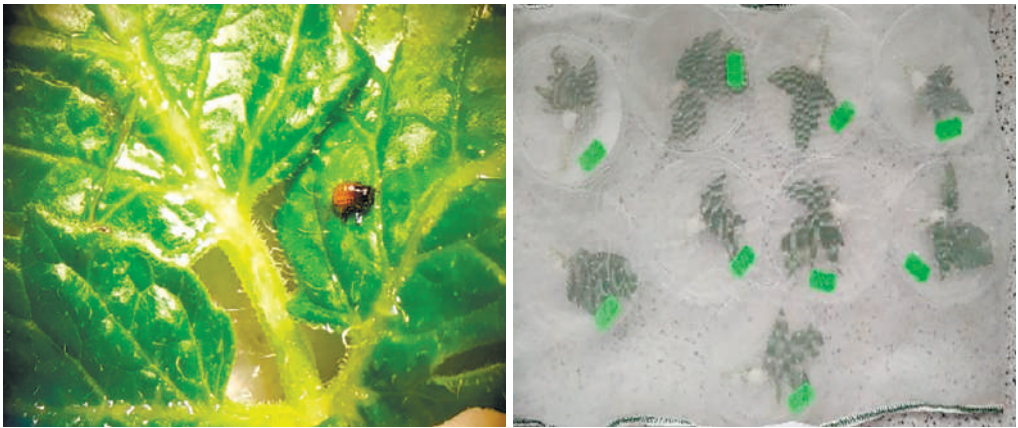


Fig. 4.13. Evaluarea activității insecticide împotriva larvelor (orig.)

Datele de mortalitate au fost înregistrate zilnic și au fost furnizate frunze proaspete de roșii. Datele de mortalitate obținute au fost corectate folosind formula lui Abbott. Procentul de insecte efectiv ucise de bacteriile entomopatogene a fost estimat prin evaluarea diferenței dintre procentul de insecte vii din proba martor și procentul de insecte care au supraviețuit după tratament, împărțit la procentul de insecte care trăiesc în proba martor (Abbott, 1925). Rezultatele sunt prezentate ca medie \pm eroarea standard a mediei.

În primul studiu, cele mai bune rezultate au fost demonstrate de tulpinile bacteriene 4 și 1, datele de mortalitate corectate după Abbott fiind egale cu $42,59 \pm 4,90\%$ și $28,52 \pm 3,29\%$, în ziua 5 după tratament. Pentru celelalte tulpini bacteriene nu au fost înregistrate date semnificative privind mortalitatea insectelor (figura 4.14; Moldovan *et al.*, 2022 *in press*).

În cel de al doilea studiu experimental nu au fost obținute date semnificative privind mortalitatea larvelor de *L. decemlineata* (figura 4.15). Mortalitatea maximă obținută a constituit $33,33 \pm 3,33\%$ pentru tulpinile *Bt* CNMN-BB-04 și *Bacillus* sp. S03 în ziua a 9-a după aplicarea suspensiei bacteriene (Moldovan *et al.*, 2022 *in press*).

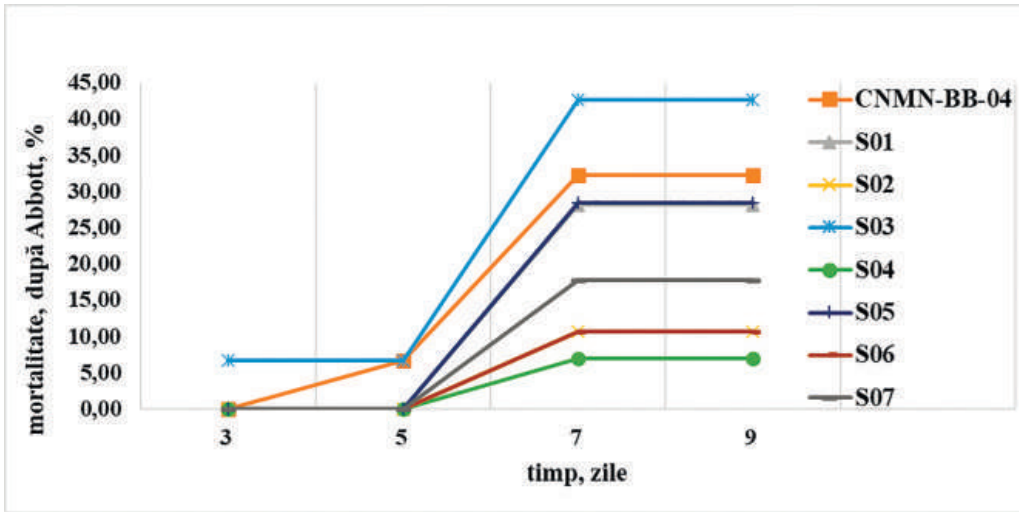


Fig. 4.14. Mortalitatea comparativ-cumulativă a adulților din specia *L. decemlineata* după expunere la tulpinile bacteriene (după Moldovan et al., 2022 *in press*)

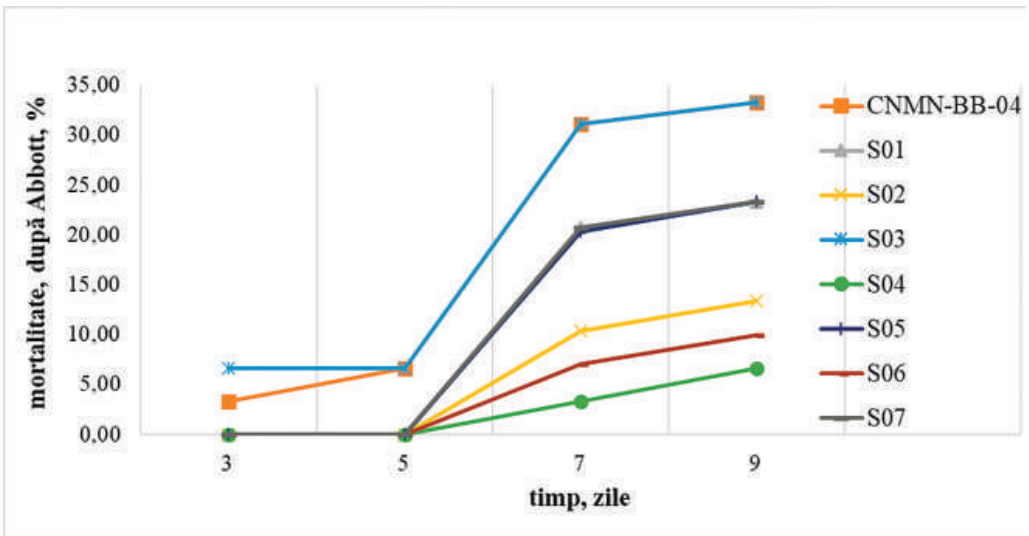


Fig 4.15. Mortalitatea cumulativă a larvelor din specia *L. decemlineata* după expunere la tulpinile bacteriene

În a treia configurație experimentală, două tulpini bacteriene care anterior au avut cele mai bune rezultate *Bt* CNMN-BB-04 și *Bacillus* sp. S03, și două tulpini adiționale *Bt* CNMN-BB-03 și CNMN-BB-05 au fost testate împotriva larvelor. De această dată au fost aplicate zilnic suspensiile bacteriene, ducând la infecția cronică a larvelor. Tulpinile bacteriene *Bt* CNMN-BB-05 și *Bacillus* sp. S03 au arătat cele mai bune rezultate, cu o mortalitate de $51,48 \pm 4,55\%$ și $41,11 \pm 4,84\%$ înregistrată în ziua a 9-a (figura 4.16; Moldovan et al., 2022 *in press*).

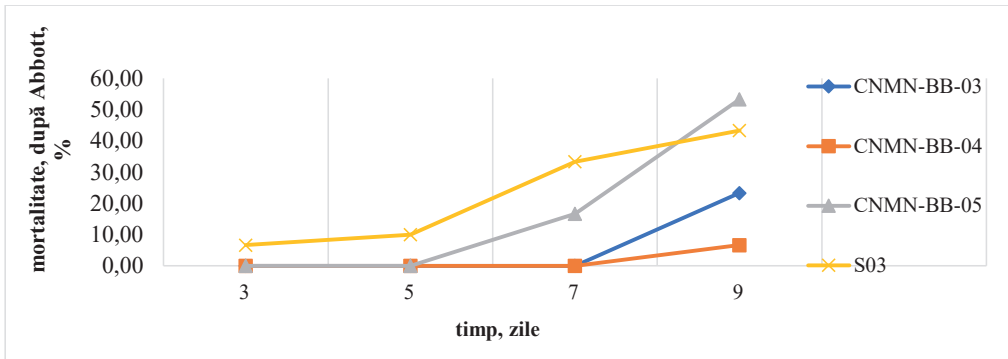


Fig 4.16. Mortalitatea cumulativă a larvelor din specia *L. decemlineata* după infectare repetată cu tulpinile bacteriene

Rezultatele obținute permite de a scoate în evidență tulpinile CNMN-BB-04, CNMN-BB-05 și *Bacillus* sp. S03 cu un anumit grad de patogenitate față de adulții și larvele gândacului de Colorado. Datele ulterioare urmează să abordeze utilizarea acestei tulpini în combinație cu tulpini fungice entomopatogene pentru atingerea unui efect sinergic (Moldovan *et al.*, 2022 *in press*).

CONCLUZII

La momentul actual agricultura se confruntă cu numeroase probleme, multe dintre care sunt cauzate de utilizarea excesivă a substanțelor chimice sintetice în controlul organismelor dăunătoare. Dezvoltarea unui sistem de agricultură durabilă este o prioritate pentru Republica Moldova, scopul principal fiind siguranța alimentară a populației, protecția mediului, conservarea biodiversității, susținerea fermierilor și sporirea competitivității pe plan internațional. Este necesar de a depune efort continuu pentru a soluționa cererea mediului de afaceri și a economiei naționale în preparate ecologice de control al insectelor dăunătoare. Controlul biologic reprezintă una din abordările de succes în gestionarea durabilă a insectelor dăunătoare.

În rezultatul izolării tulpinilor bacteriene din corpul insectelor au fost evidențiate tulpini care manifestă proprietăți morfologice și biochimice similare speciei *Bacillus thuringiensis* Berliner 1915. Optimizarea metodelor de izolare a tulpinilor locale *Bacillus thuringiensis* prezintă un interes major datorită daunelor considerabile produse de speciile de dăunători culturilor agricole și riscurile considerabile asociate cu utilizarea insecticidelor chimice.

În rezultatul cercetărilor efectuate a fost confirmată eficiența metodei basic PCR și a perechii de primeri CJI-1 și CJI-2 în detecția prezenței genelor Cry în genomul tulpinilor locale de bacterii din genul *Bacillus*. În urma analizelor a fost stabilit faptul că din 14 tulpini bacteriene investigate, 13 tulpini posedă genele Cry1, confirmând faptul că tulpinile autohtone, recent izolate, de *Bacillus* spp. posedă potențial insecticid contra reprezentanților ordinilor Lepidoptera, Diptera și Coleoptera. În rezultatul cercetărilor a fost demonstrat că microflora insectelor, dăunători ai culturilor agricole reprezintă un rezervor natural de tulpini care urmează a fi valorificate în scopul dezvoltării biopesticidelor locale. Tulpinile autohtone de *B. thuringiensis* obținute din mediul natural posedă o activitate insecticidă pronunțată ($1,392 \times 10^5$; $2,618 \times 10^5$; $4,578 \times 10^5$; $1,229 \times 10^6$; $2,467 \times 10^6$; $9,152 \times 10^6$ spori/ml de suspensie) asupra lepidopterelor și coleopterelor curculionide (*Lymantria dispar*, *Cydia pomonella*, *Archips rosana*, *Neocoenorhinidius pauxillus*, *Phyllobius oblongus* și *Sitona lineatus*) (Moldovan *et al.*, 2017; Moldovan, 2019). Prin urmare aceasta permite producerea locală a bioinsecticidelor, ceea ce va asigura costuri mai reduse și o disponibilitate crescută pentru producătorii agricoli. Utilizarea tulpinilor autohtone va permite evitarea riscurilor ecologice asociate cu introducerea unor organisme alohtone în ecosisteme și dereglarea funcționării acestora. În perspectivă bioinsecticidele obținute în baza tulpinilor CNMN-BB-03, CNMN-BB-04 și CNMN-BB-05 pot fi aplicate atât în cadrul sistemelor de agricultură tradițională, cât și ecologică.

Metodele biologice de control al organismelor dăunătoare reprezintă soluția pentru problemele de mediu și cele relaționate de sănătatea umană asociate cu aplicarea extensivă a produselor chimice de uz fitosanitar. Bacteriile entomopatogene, în special subspeciile de *Bacillus thuringiensis* reprezintă un inamic natural al dă-

unătorilor care urmează a fi valorificat rațional în scopul protecției plantelor. Crearea unor colecții locale de tulpini bacteriene reprezintă un pas important al foii de parcurs spre atingerea scopului de a asigura piața locală cu preparate biologice de combatere a dăunătorilor.

Cercetările urmează a fi continuate pentru a izola noi tulpini cu virulență sporită din mediul natural. Urmează a fi realizat screening-ul molecular genetic al colecției în scopul caracterizării potențialului insecticid și confirmarea ulterioară a acestuia prin testele de laborator. Tulpinile care prezintă interes din punct de vedere biotehnologic urmează a fi genotipate ceea ce 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. În concluzie elaborarea și utilizarea bioinsecticidelor pe bază de tulpini autohtone de *Bacillus thuringiensis* are potențial sporit de a contribui la dezvoltarea agriculturii sustenabile în Republica Moldova.

BIBLIOGRAFIE

1. ABBOTT, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.*, 18.2: 265-267.
2. ADANG, M. J.; CRICKMORE, N.; JURAT-FUENTES, J. L. 2014. Diversity of *Bacillus thuringiensis* crystal toxins and mechanism of action. In: *Advances in insect physiology*. Academic Press. p. 39-87.
3. AHMED, I.; YOKOTA, A.; YAMAZOE, A.; FUJIWARA, T. 2007. AHMED, Iftikhar, et al. Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57.5: 1117-1125.
4. AKIBA, Y. 1986. Microbial ecology of *Bacillus thuringiensis* VI. Germination of *Bacillus thuringiensis* spores in the soil. *Applied Entomology and Zoology*, 21.1: 76-80.
5. AKTAR, M. W.; SENGUPTA, D.; CHOWDHURY, A. 2009. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary TOXICOLOGY*, 2.1: 1.
6. ALSINA, M.; BLANCH, A. R. 1994. A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. *Journal of Applied Bacteriology*, 76.1: 79-85.
7. ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215.3: 403-410.
8. ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25.17: 3389-3402.
9. ALVAREZ, A; DEL VALLE LOTO, F. 2012. Characterization and biological activity of *Bacillus thuringiensis* isolates that are potentially useful in insect pest control. *Biodiversity Enrichment in a Diverse World*, 133.
10. ANANIEVA, I.I.; RUBEL, I.JE.; VALENTOVICH, L.N.; KOLOMIEC, JE.I.; TITOK, M.A. 2014. Molekuljarno-geneticheskiy i funkcional'nyy analiz cry-genov prirodnyh izoljatov bakterij *Bacillus thuringiensis*. *Vesci Nacyjanal'naj Akadzemii Navuk Belarusi*, 2: 50-55. [în belorusă]
11. ANGELOV, 1981, АНГЕЛЮВ, П.. Фауна на България. Coleoptera, Rhynchophora (*Urodonidae*, *Anthribidae*, *Brenthidae*, *Rhinomaceridae*, *Attelabidae*). Т. XI. София, 1981. 112 p.
12. *Anuarul statistic al Republicii Moldova* [online]. Chișinău: Biroul Național de Statistică al Republicii Moldova (Tipogr. "MS Logo"), col. red. CARA O. (președinte) et al. 2021, 473p. [citat 07.06.2023]. Disponibil: https://statistica.gov.md/ro/anuarul-statistic-al-republicii-moldova-2021-63_3706.html

13. ARGÔLO-FILHO, R. C.; LOGUERCIO, L. L. 2013. *Bacillus thuringiensis* is an environmental pathogen and host-specificity has developed as an adaptation to human-generated ecological niches. *Insects*, 5.1: 62-91.
14. ARNOLDI, L.V., ZASLAVSKIY, V.A., TER-MINASYAN, M.E. 1965. Se-meystvo Curculionidae – Dolgonosiki. In: BEJ-BIJENKO, V.G. ed., *Opredelitel nasekomykh Evropeiskoi chasti SSSR. Vol 2. Zhestkokrylye i veerokrylye*. Moskva, Leningrad: Nauka, pp. 485-621. [în rusă].
15. ASIS JR, C. A.; ADACHI, K. 2004. Isolation of endophytic diazotroph *Pantoea agglomerans* and nondiazotroph *Enterobacter asburiae* from sweetpotato stem in Japan. *Letters in Applied Microbiology*, 38.1: 19-23.
16. ASTUTI, D.; PUJASTUTI, Y.; SHK, S.; DAMIRI, N.; NUGRAHA, S.; SEM-BIRING, E.; MULAWARMAN. 2018. Exploration of *Bacillus thuringiensis* Berl. from soil and screening est its toxicity on insects of Lepidoptera order. In: *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. IOP Publishing, 2018. p. 012063.
17. ATASHPAZ, S.; KHANIA, S.; BARZEGARIA, A.; BARARA, J.; VAHED, S. Z.; AZARBAIJANI, R.; OMIDI, Y. 2010. A robust universal method for extraction of genomic DNA from bacterial species. *Microbiology*, 79: 538-542.
18. AZCON, R.; PERALVAREZ, M.; ROLDAN, A.; BAREA, J.M. 2010. Arbuscular mycorrhizal fungi, *Bacillus cereus*, and *Candida parapsilosis* from a multicontaminated soil alleviate metal toxicity in plants. *Microbial Ecology*, 2010, 59: 668-677.
19. AZIDAH, A. A.; SOFIAN-AZIRUN, Mohd. 2006. Some aspects on oviposition behaviour of *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Nocturidae). *Journal of Entomology*, 3.3: 241-247.
20. 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
21. BARTHOLOMEW, James W.; MITTWER, Tod. 1952. The Gram stain. *Bacteriological reviews*, 16.1: 1-29..
22. BEECHER, D.J.; OLSEN, T.W.; SOMERS. E.B.; WONG, A.C.L. 2000. Evidence for contribution of tripartite hemolysin BL, phosphatidylcholine-preferring phospholipase C, and collagenase to virulence of *Bacillus cereus* endophthalmitis. *Infection and Immunity*, 68.9: 5269-5276.
23. BEJI, A.; MERGAERT, J.; GAVIN, F.; IZARD, D.; KERSTERS, K.; LECLERC, H.; DE LEY, J. 1988. Subjective synonymy of *Erwinia herbicola*, *Erwinia mille-tiae*, and *Enterobacter agglomerans* and redefinition of the taxon by genotypic and phenotypic data. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 38.1: 77-88.
24. BEL, Y.; ZACK, M.; NARVA, K.; ESCRICHE, B. 2019. BEL, Yolanda, et al. Specific binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ea toxin, and Cry1Ac and Cry1Fa competition analyses in *Anticarsia gemmatalis* and *Chrysodeixis includens*. *Scientific Reports*, 9.1: 18201.

25. BEN-DOV, E.; ZARITSKI, A.; DAHAN, E.; BARAK, Z.; SINAI, R.; MANASHEROB, R.; KHAMRAEB, A.; TROITSKAYA, E.; DUBITSKY, A.; BEREZINA, N.; MARGALITH, Y. 1997. Extended screening by PCR for seven cry-group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 4883-4890.
26. BEN-DOV, Eitan. BOUSSIBA, S.; ZARITSKY, A. 1995. Mosquito larvicidal activity of *Escherichia coli* with combinations of genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Journal of Bacteriology*, 177.10: 2851-2857.
27. BENNETT, B.C. 2011. Twenty-five economically important plant families [online]. *Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)*. [citat 08.09.2022]. Disponibil: <http://www.eolss.net/sample-chapters/c09/e6-118-03.pdf>
28. BERON, C.M.; CURATTI, L.; SALERNO, G.L. 2005. New strategy for identification of novel Cry-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains. *App. Environ. Microbiol.*, 71.2:761-765.
29. BERRY, C. 2012. The bacterium, *Lysinibacillus sphaericus*, as an insect pathogen. *Journal of Invertebrate Pathology*, 109.1: 1-10.
30. BIZANI, D.; MOTTA, A.S.; MORRISSY, J.A.C.; TERRA, R.M.S.; SOUTO, A.A.; BRANDELLI, A. 2005. Antibacterial activity of cerein 8A, a bacteriocin-like peptide produced by *Bacillus cereus*. *International Microbiology*, 8.2: 125-131.
31. BIZZARRI, M. F.; BISHOP, A. H. The ecology of *Bacillus thuringiensis* on the phylloplane: colonization from soil, plasmid transfer, and interaction with larvae of *Pieris brassicae*. *Microbial Ecology*, 2008, 56: 133-139.
32. BOBROWSKI, V.L.; PASQUALI, G.; BODANESE-ZANETTINI, M.H.; FIUZA, L.M. 2001. Detection of cry1 genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from South of Brazil and activity against *Aantarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Brazilian Journal of Microbiology*, 2001, 32: 105-109.
33. BOGDANOWICZ, S.M.; WALLNER, W.E.; BELL, J.; ODELL, T.M.; HARRISON, R.G. 1993. Asian gypsy moths (Lepidoptera: Lymantriidae) in North America: evidence from molecular data. *Annals of the Entomological Society of America*, 86.6:710-715.
34. BOLTER, C.J.; DICKE, M.; van LOON, J.J.; VISSER, J.H.; POSTHUMUS, M.A. 1997. Attraction of Colorado potato beetle to herbivore-damaged plants during herbivory and after its termination. *Journal of chemical ecology*, 23: 1003-1023.
35. BONE, L. W.; TINELLI, R. 1987. *Trichostrongylus colubriformis*: larvicidal activity of toxic extracts from *Bacillus sphaericus* (strain 1593) spores. *Experimental Parasitology*, 64.3: 514-516.
36. BOONSERM, P.; DAVIS, P.; ELLAR, D.J.; LI, J. 2005. Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. *Journal of molecular biology*, 348.2: 363-382.
37. BOONSERM, P.; MO, M.; ANGSUTHANASOMBAT, C.H.; LESCAR, J.

2006. Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-angstrom resolution. *Journal of Bacteriology*, 188.9: 3391-3401.
38. BOROVEC, R.; SKUHROVEC, J. 2015. A review of *Sciaphobus* (*Neosciaphobus*) and descriptions of new species of *Sciaphobus* s. str. (Coleoptera: Curculionidae: Entiminae). *Acta Entomologica Musei Nationalis Pragae*, 2015, 55.2: 745-785.
39. BOUCHARD, P.; BOUSQUET, Y.; DAVIES, A. E.; ALONSO-ZARAZAGA, M. A.; LAWRENCE, J. F.; LYAL, C. H.; NEWTON, A.F.; REID, C.A.M.; SCHMITT, M.; ŚLIPIŃSKI, S.A.; SMITH, A. B. 2011. Family-group names in Coleoptera (Insecta). *ZooKeys*, 2011, 88: 1.
40. BRAVO, A.; GILL, S.; SOBERON, M. 2005. *Bacillus thuringiensis* mechanisms and use. In: *Comprehensive Molecular Insect Science*. Elsevier BV, 175-206.
41. BRAVO, A.; GILL, S.; SOBERON, M. 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49: 423-435.
42. BRAVO, A.; GOMEZ, I.; CONDE, J.; MUNOZ-GARAY, C.; SANCHEZ, J., MIRANDA, R.; ... SOBERON, M. 2004 Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1667.1: 38-46.
43. BRAVO, A.; GOMEZ, I.; PORTA, H.; GARCIA-GOMEZ, B.I.; RODRIGUEZ-ALMAZAN, C.; PARDO, L.; SOBERON, M. 2013. Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. *Microb. Biotechnol.* 6.1: 17-26. 2013.
44. BRAVO, A.; LIKITVIVATANAVONG, S.; GILL, S.; SOBERON, M. 2011. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect biochemistry and molecular biology*, 41.7: 423-431.
45. BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLALOBOS, F.J.; PEÑA, G.; NUÑEZ-VALDEZ, M.E.; SOBERON, M.; QUINTERO, R. 1998. Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Applied and environmental microbiology*, 64.12: 4965-4972.
46. BREED R., MURRAY E., SMITH N. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 1957. 7th Ed. 614 – 619.
47. Brevet de invenție MD 4304. MUNTEANU, N.; TODERAȘ, I.; MOLDOVAN, A.; MALEVANCIUC, N.; TODERAȘ, L.; BACAL, S.; RAILEAN, N. Tulpină de bacterii *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* – bioinsecticid pentru combaterea lepidopterelor din genul *Lymantria*. *BOPI*, 9: 25.
48. Brevet de invenție nr. 4916. MUNTEANU, N.; TODERAȘ, I.; MOLDOVAN, A.; MALEVANCIUC, N.; TODERAȘ, L.; RAILEAN, N. Tulpina *Bacillus*

- thuringiensis* subsp. *kurstaki* – insecticid biologic pentru combaterea coleoptelilor curculionide. *BOPI*, 2: 19.
49. CAAMANO-ANTELO, S.; FERNÁNDEZ-NO, I. C.; BÖHME, K.; EZ-ZAT-ALNAKIP, M.; QUINTELA-BALUJA, M.; BARROS-VELÁZQUEZ, J.; CALO-MATA, P. 2015. Genetic discrimination of foodborne pathogenic and spoilage *Bacillus* spp. based on three housekeeping genes. *Food microbiology*, 46: 288-298.
 50. CABI Compendium, *Leptinotarsa decemlineata*. 2022. cabicompendium.30380, doi:10.1079/cabicompendium.30380, CABI International.
 51. CABI Compendium, *Lymantria dispar*. 2022. cabicompendium.31807, doi:10.1079/cabicompendium.31807, CABI International.
 52. CABI Compendium, *Spodoptera exigua*. 2022. cabicompendium.29808, doi:10.1079/cabicompendium.29808, CABI International.
 53. CABI Compendium. *Helicoverpa armigera*. 2022. cabicompendium.26757, doi:10.1079/cabicompendium.26757, CABI International.
 54. CAPPELLO, M.; BUNGIRO, R.D.; HARRISON, L.M.; BISCHOF, L.J.; GRIFFITTS, J.S.; BARROWS, B.D.; AROIAN, R.V. 2006. A purified *Bacillus thuringiensis* crystal protein with therapeutic activity against the hookworm parasite *Ancylostoma ceylanicum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103.41: 15154-15159.
 55. CAROZZI, N.; KRAMER, V.; WARREN, G.; EVOLA, S.; KOZIEL, M.G. 1991. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3057-3061.
 56. CARROLL, K.C.; HOBDEN, J.A.; MILLER, S.; MORSE, S.A.; MIETZNER, T.A.; DETRICK, B.; MITCHELL, T.G.; MCKERROW, J.H.; SAKANARI, J.A. 2019. Sporeforming grampositive bacilli: *Bacillus* and *Clostridium* species. *Jawetz, Melnick, and Adelberg's Medical Microbiology*, 2019, 179-190.
 57. CERON, J.; ORTIZ, A.; QUINTERO, R.; GUERECA, L.; BRAVO, A. 1995. Specific PCR primers directed to identify cry I and cry III genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. *App. Environ. Microbiol.*, 61.11:3826-3831.
 58. CEUPPENS, S.; BOON, N.; UYTENDAELE, M. 2013. Diversity of *Bacillus cereus* group strains is reflected in their broad range of pathogenicity and diverse ecological lifestyles. *FEMS microbiology ecology*, 2013, 84.3: 433-450.
 59. CHATTERJEE, S.; BHATTACHARYA, T.; DANGAR, T.; CHANDRA, G. 2007. Ecology and diversity of *Bacillus thuringiensis* in soil environment. *African Journal of Biotechnology*, 2007, 6.13.
 60. CHERIF, A.; ETTOUMI, B.; RADDADI, N.; DAFFONCHIO, D.; BOUDABOUS, A. 2007. Genomic diversity and relationship of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* by multi-REP-PCR fingerprinting. *Canadian Journal of Microbiology*, 53.3: 343-350.
 61. CHRISTENSEN, H.; NORDENTOFT, S.; ELMERDAHL OLSEN, J. 1998.

- Phylogenetic relationships of salmonella based on rRNA sequences. *International Journal of Syst. Bacteriol.* 48:605–610
62. CIHAN, A.; TEKIN, N.; OZCAN, B.; COKMUS, C. 2012. The genetic diversity of genus *Bacillus* and the related genera revealed by 16S rRNA gene sequences and ardra analyses isolated from geothermal regions of turkey. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43: 309-324.
63. CLARKE, P.H.; COWAN, S. T. 1952. Biochemical methods for bacteriology. *Microbiology*, 6.1-2: 187-197.
64. CLAUS, M. 1992. A standardized Gram staining procedure. *World J. Microbial. Biotechnol.*, 8: 451-452. doi: 10.1007/BF01198764.
65. COHN, F. 1872. Untersuchungen über Bakterien. *Bertr. Biol.Pflanz.* (Heft II): 127-224.
66. COLLIER, F.A.; ELLIOT, S.L.; ELLIS, R. J. 2005. Spatial variation in *Bacillus thuringiensis/cereus* populations within the phyllosphere of broad-leaved dock (*Rumex obtusifolius*) and surrounding habitats. *FEMS Microbiology Ecology*, 54.3: 417-425.
67. CONTARINI, M.; ONUFRIEVA, K.S.; THORPE, K.W.; RAFFA, K.F.; TOBIN, P.C. 2009. Mate-finding failure as an important cause of Allee effects along the leading edge of an invading insect population. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 133.3: 307-314.
68. COX, M. L. 1996. The pupae of Chrysomeloidea. *Chrysomelidae biology*, JOLIVET, P., COX, M.L., eds, SPB Academic Publishing., 1: 119-265
69. CRICKMORE, N.; BAUM, J.; BRAVO, A.; LERECLUS, D.; NARVA, K.; SAMPSON, K.; SCHNEPF, E.; SUN, M.; ZEIGLER, D.R. 2018. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/intro.html
70. DA SILVA, R. B.; VALICENTE, F. H. 2013. Molecular characterization of *Bacillus thuringiensis* using rep-PCR. *SpringerPlus*, 2013, 2.1: 1-6.
71. DAGGA, A.; AZIZ M.; ELMANAMA, A.; AL-SHARIF M.; AL JUBB, A.; EL HINDI, M. 2016. Isolation, characterization & optimization of cultural condition for *Bacillus thuringiensis Bt* from soils of Gaza strip. *International Journal of Current Research*, 8: 29885-29891.
72. DAMALAS, C.; ELEFTHEROHORINOS, I. 2011. Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 8.5: 1402-1419.
73. DE BARJAC, H. 1978. Toxicité de *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* pour les larves d'*Aedes aegypti* et d'*Anopheles stephensi*. *C.R. Acad. Sci. Paris Ser. D.* 286.15: 1175-1178.
74. DE BARJAC, H.; BONNEFOI, A. A classification of strains of *Bacillus thuringiensis* Berliner with a key to their differentiation. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1968, 11.3: 335-347.
75. DE JONGHE, V.; COOREVITS, A.; DE BLOCK, J.; VAN COILLIE, E.;

- GRIJSPEERDT, K.; HERMAN, L.; DE VOS, P.; HEYNDRICKX, M. 2010. Toxinogenic and spoilage potential of aerobic spore-formers isolated from raw milk. *International journal of food microbiology*, 2010, 136.3: 318-325.
76. DE MAAGD, R.; BRAVO, A.; BERRY, C.; CRICKMORE, N.; SCHNEPF H. 2003. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annual Review of Genetics*, 37.1: 409-433.
77. DE MAAGD, R.A.; BRAVO, A.; CRICKMORE, N. 2001 How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends in Genet.*, 17: 193-199.
78. DE VOS, P. 2015. Bacillales. In: *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (M.E. TRUJILLO, S. DEDYSH, P. DEVOS, B. HEDLUND, P. KÄMPFER, F.A. RAINEY, W.B. WHITMAN eds.). Disponibil: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/9781118960608.obm00057>
79. DE VOS, P.; GARRITY, G.M.; JONES, D.; KRIEG, N.R.; LUDWIG, W.; RAINEY, F.A.; SCHLEIFER, K.-H.; WHITMAN, W.B. (eds.). 2009. *Bergey's manual of systematic bacteriology, 2nd ed.: Volume 3: The Firmicutes*. Springer Science & Business Media.
80. DE WILDE, J.; HSIAO, T. H. 1981. Geographic diversity of the Colorado potato beetle and its infestation in Eurasia. In: *Advances in potato pest management*. Hutchinson Ross Publishing Co., p. 47-68.
81. DEKA, B.; BARUAH, C.; BABU, A. 2021. Entomopathogenic microorganisms: their role in insect pest management. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31.1: 1-8.
82. DELETOILE, A.; DECRE, D.; COURANT, S.; PASSET, V.; AUDO, J.; GRIMONT, P.; ARLET, G.; BRISSE, S. 2009. Phylogeny and identification of *Pantoea* species and typing of *Pantoea agglomerans* strains by multilocus gene sequencing. *Journal of clinical microbiology*, 47.2: 300-310.
83. DINGMAN, D.W. 2009. DNA fingerprinting of *Paenibacillus popilliae* and *Paenibacillus lentimorbus* using PCR-amplified 16S–23S rDNA intergenic transcribed spacer (ITS) regions. *Journal of invertebrate pathology*, 2009, 100.1: 16-21.
84. DOANE, C. C.; MCMANUS, M. L. (ed.). *The gypsy moth: research toward integrated pest management*. US Department of Agriculture, USDA Forestry Service Technical Bulletin No. 158.
85. DOBROVOLSCHI, L. 2018. Pomicultura Republicii Moldova: situația actuală și tendințe de dezvoltare. In: *Perspectivile dezvoltării durabile a spațiului rural în contextul noilor provocări economice*, 14 septembrie 2018, Chișinău. Chișinău, Republica Moldova: Universitatea Agrară de Stat din Moldova, 50: 161-166.
86. DONOVAN, W.; ENGLEMAN, J.; DONOVAN, J.; BAUM, J.; BUNKERS, G.; CHI, D.; CLINTON, W.; ENGLISH, L.; HECK, G.; ILAGAN, O.; KRASOMIL-OSTERFELD, K.; PITKIN, J.; ROBERTS, J.; WALTERS, M. 2006. Dis-

- covery and characterization of Sip1A: A novel secreted protein from *Bacillus thuringiensis* with activity against coleopteran larvae. *Applied microbiology and biotechnology*, 2006, 72: 713-719.
87. DOOLOTKELDIEVA, T.; LECLERQUE, A.; BOBUSHEVA, S.; SCHUSTER C. 2018. Biodiversity of *Bacillus thuringiensis* strains and their Cry genes in ecosystems of Kyrgyzstan. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 2018, 9.03: 107-126.
88. DOWNES, W. 1938. The occurrence of *Sitona lineatus* in British Columbia. *The Canadian Entomologist*, 70.1: 22-22.
89. DUBOIS, T.; FAEGRI, K.; PERCHAT, S.; LEMY, C.; BUISSON, C.; NIELSEN-LEROUX, C.; GOHAR, M.; JACQUES, P.; RAMARAO, N.; KOLSTØ, A.-B.; LERECLUS, D. 2012. Necrotrophism is a quorum-sensing-regulated lifestyle in *Bacillus thuringiensis*. *PLoS pathogens*, 2012, 8.4: e1002629.
90. FAGERLUND, A.; LINDBACK, T.; STORSET, A.K.; GRANUM, P.E.; HARDY, S.P. 2008. *Bacillus cereus* Nhe is a pore-forming toxin with structural and functional properties similar to the ClyA (HlyE, SheA) family of haemolysins, able to induce osmotic lysis in epithelia. *Microbiology*, 154: 693-704.
91. FANG, Y.; LI, Z.; LIU, J.; SHU, C.; WANG, X.; ZHANG, X.; YU, X.; ZHAO, D.; LIU, G.; HU, S.; ... YU, J. 2011. A pangenomic study of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Genetics and Genomics*, 38.12: 567-576.
92. FAYAD N., AWAD M. K., MAHILLON J. 2019. Diversity of *Bacillus cereus sensu lato* mobilome. *BMC genomics*, 2019, 20: 1-11.
93. FEDERICI, B.A.; PARK, H.-W.; SAKANO, Y. 2006. Insecticidal protein crystals of *Bacillus thuringiensis*. In: *Inclusions in prokaryotes*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2006. p. 195-236.
94. FELIS, G.E.; DELLAGLIO, F.; TORRIANI, S. 2009. Taxonomy of probiotic microorganisms. In: CHARALAMPOPOULOS, Dimitris; RASTALL, Robert A. (ed.). *Prebiotics and probiotics science and technology*. Springer Science & Business Media.
95. FERNANDEZ-CHAPA D., RAMÍREZ-VILLALOBOS J., GALÁN-WONG L. 2019. Toxic potential of *Bacillus thuringiensis*: an overview. In: *Protecting rice grains in the post-genomic era*. Disponibil: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.85756>
96. FERRO, D.N.; ALYOKHIN, A.V.; TOBIN, D. B. 1999. Reproductive status and flight activity of the overwintered Colorado potato beetle. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 91.3: 443-448.
97. FIBIGER, M.; HACKER, H. Systematic List of the Noctuoidea of Europe (Noctodontidae, Nolidae, Arctiidae, Lymantriidae, Erebidae, Micronoctuidae, and Noctuidae). *Esperiana. Buchreihe zur Entomologie*. Band, Schwanfeld. 2004, nr. 11, p. 93-205. ISBN 3-938249-01-3.
98. FISHER T.W. AND S.F. GARCZYNSKI 2012. CHAPTER III. Isolation, culture, preservation, and identification of entomopathogenic bacteria of the Bacilli.

- In: L. A. Lacey (Ed.), *Manual of Techniques in Insect Pathology* New York: Academic Press. 1-13.
99. FRANZETTI, L.; SCARPELLINI, M. 2007. Characterisation of *Pseudomonas* spp. isolated from foods. *Annals of Microbiology*, 57: 39-47.
 100. FRIEDMAN, A. L. L.; FREIDBERG, A. 2007. The Apionidae of Israel and the Sinai Peninsula (Coleoptera: Curculionoidea). *Israel Journal of Entomology*, 37: 55-180.
 101. GALITSKY, N.; CODY, V.; WOJTCZAK, A.; GHOSH, D.; LUFT, J.R.; PAN-GBORN, W.; ENGLISH, L. 2001. Structure of the insecticidal bacterial δ -endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 2001, 57.8: 1101-1109.
 102. GARBEVA, P.; VAN VEEN, J. A.; VAN ELSAS, J. D. 2003. Predominant *Bacillus* spp. in agricultural soil under different management regimes detected via PCR-DGGE. *Microbial Ecology* 45(3), pp. 302-316.
 103. GARCIA, K.; IBARRA, J.E.; BRAVO, A.; DÍAZ, J.; GUTIÉRREZ, D.; TORRES, P.V.; GOMEZ DE LEON, P. 2015. Variability of *Bacillus thuringiensis* strains by ERIC-PCR and biofilm FORMATION. *CURRENT MICROBIOLOGY*, 2015, 70: 10-18.
 104. GARCIA-ROBLES, I.; SÁNCHEZ, J.; GRUPPE, A.; MARTÍNEZ-RAMÍREZ, A.C.; RAUSELL, C.; REAL, M.D.; BRAVO, A. 2001. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* PS86Q3 strain in hymenopteran forest pests. *Insect Biochem Mol Biol*. 31.9: 849-856.
 105. GASSMANN, A. J.; CARRIÈRE, Y.; TABASHNIK, B. E. 2009. Fitness costs of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual review of entomology*, 54: 147-163.
 106. GAVRILIȚĂ, L.; NASTAS, T.; GORBAN, V.; MANIC, G.; NEȚOIU, C.; CORNEANU, M.; VIȘOIU, D. 2014., et al. Application of procedures for pest density monitoring in the public gardens from the Republic of Moldova and Romania. *Oltenia-studii si comunicari stiintele naturii*, 30.2: 139-144.
 107. GDOURA-BEN AMOR, M.; SIALA, M.; ZAYANI, M.; GROSSET, N.; SMAOUI, S.; MESSADI-AKROUT, F.; ...; GDOURA, R. 2018. Isolation, identification, prevalence, and genetic diversity of *Bacillus cereus* group bacteria from different foodstuffs in Tunisia. *Frontiers in microbiology*, 9: 447.
 108. GEIDER, K.; AULING, G.; DU, Z.; JAKOVLJEVIC, V.; JOCK, S.; VOLKSCH, B. 2006. *Erwinia tasmaniensis* sp. nov., a non-phytopathogenic bacterium from apple and pear trees. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, 56.12: 2937-2943.
 109. GELIS-JEANVOINE, S.; CANETTE, A.; GOHAR, M.; CARADEC, T.; LEMY, C.; GOMINET, M.; JACQUE, P.; LERECLUS, D.; SLAMTI, L. 2017. Genetic and functional analyses of krs, a locus encoding kurstakin, a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis*. *Research in microbiology*, 168.4: 356-368.

110. GEORGE, K.S. 1962. Root nodule damage by larvae of *Sitona lineatus* and its effect on yield of green peas. *Plant Pathology*, 11: 172-176.
111. GERMANI, F.; MOENS, L.; DEWILDE, S. 2013. Haem-based sensors: a still growing old superfamily. *Advances in Microbial Physiology*, 63: 1-47.
112. GLEAVE, A.P.; WILLIAMS, R.; HEDGES, R.J. 1993. Screening by polymerase chain reaction of *Bacillus thuringiensis* serotypes for the presence of cryV-like insecticidal protein genes and characterization of a cryV gene cloned from *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 1683-1687.
113. GOLDBERG, L. J.; MARGALIT, J. 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *Mosquito news*, 37.3: 355-358.
114. GOLS, R.; SCHUTTE, C.; STOUTHAMER, R.; DICKE, M. 2007. PCR-based identification of the pathogenic bacterium, *Acaricomus phytoseiuli*, in the biological control agent *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Phytoseiidae). *Biological Control*, 2007, 42.3: 316-325.
115. GONCHARENKO, M. 1968. Vrediteli plodovyh kul'tur (Zhuki). Spravochnik po zashhite rastenij. Kishinev: Kartja Moldovenjaskje, 425 – 441. [in rusă]
116. GORDON, R. E.; HAYNES, W. C.; PAG, H. N. 1973. The genus *Bacillus*, agricultural research service. *US Department of Agriculture, Washington DC. Agricultural Handbook*,
117. GOTZ, F.; BANNERMAN, T.; SCHLEIFER, K. 2006. The genera *Staphylococcus* and *Macrococcus*. In: *The prokaryotes*, 5.
118. GREENBERG S., SAPPINGTON T., LEGASPI JR. B., LIU T.-X., SETAMOU M. 2001. Feeding and life history of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) on different host plants. *Annals of the Entomological Society of America*, 94.4: 566-575.
119. GRICHANOV, I.YA.; OVSYANNIKOVA, E.I. 2008. *Ocneria dispar* (L.) In: A.N. AFONIN, S.L. GREENE, N.I. DZYUBENKO, A.N. FROLOV (eds.). *Interactive Agricultural Ecological Atlas of Russia and Neighboring Countries. Economic Plants and their Diseases, Pests and Weeds* [Online]. Disponibil : http://agroatlas.ru/en/content/pests/Ocneria_dispar/index.html
120. GROCHULSKI, P.; MASSON, L.; BORISOVA, S.; PUSZTAI-CAREY, M.; SCHWARTZ, J.L.; BROUSSEAU, R.; CYGLER, M. 1995. *Bacillus thuringiensis* CryIA (a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *Journal of Molecular Biology*, 254.3: 447-464.
121. GUINDON, S; GASCUEL, O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic biology*, 52.5: 696-704.
122. GUINEBRETIERE, M.; AUGER, S.; GALLERON, N.; CONTZEN, M.; SARRAU, B.; BUYSER, M.; LAMBERET, G.; FAGERLUND, A.; GRANUM, P.; LERECLUS, D.; VOS, P.; NGUEN-THE, C.; SOROKIN, A. 2013,

- Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* group occasionally associated with food poisoning. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63.1: 31-40.
123. HAJEK, A.E.; TOBIN, Patrick C. 2009. North American eradications of Asian and European gypsy moth. In: *Use of microbes for control and eradication of invasive arthropods*. Dordrecht: Springer Netherlands, p. 71-89.
 124. HANDELSMAN, J.; RAFFEL, S.; MESTER, E.H.; WUNDERLICH, L., GRAU, C.R. 1990. Biological control of damping-off of Alfalfa seedlings with *Bacillus cereus* Uw85. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 713-718.
 125. HANNAY, C. L. 1956. Inclusions in bacteria. In: *Bacterial anatomy*, Symp. Soc. Gen. Microbiol., 6th, 318-340.
 126. 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*, 63: 433-437
 127. HAQUE, A.; RUSSELL, N.J. 2005. Phenotypic and genotypic characterisation of *Bacillus cereus* isolates from Bangladeshi rice. *International Journal of Food Microbiology*, 98.1: 23-34.
 128. HARDY, S.P.; LUND, T.; GRANUM, P. E. 2001. CytK toxin of *Bacillus cereus* forms pores in planar lipid bilayers and is cytotoxic to intestinal epithelia. *FEMS microbiology letters*, 197.1: 47-51.
 129. HARE, J. D.. 1990. Ecology and management of the Colorado potato beetle. *Annual Review of Entomology*, 35.1: 81-100.
 130. HASEGAWA, M.; KISHINO, H.; YANO, T. 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 22: 160-174.
 131. HECKEL D. G. 2020. How do toxins from *Bacillus thuringiensis* kill insects? An evolutionary perspective. *Archives of insect biochemistry and physiology*, 104.2: e21673.
 132. HERNANDEZ-FERNANDEZ J. 2016. *Bacillus thuringiensis*: a natural tool in insect pest control. In: *The handbook of microbial bioresources*. Wallingford UK: Cabi, p. 121-139.
 133. HERNANDEZ-RODRIGUEZ, A.; GONZALEZ-VEGA, M.E.; CABALLERO-NÚÑEZ, A.; MEDINA-CONCEPCIÓN, A.; QUIÑÓNEZ-PANTOJA, M.; HEYDRICH-PEREZ, M.; HERNANDEZ-LAUZARDO, A.N.; HÖFTE, M. 2004. Strain Identification of *Burkholderia cepacia* Palleroni and Holmes, and *Pseudomonas fluorescens* Migula associated to maize crop by polyphasic taxonomy. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22.2: 159-165.
 134. HITCHNER, E.; KUHAR, T.; DICKENS, J.; YOUNGMAN, R.; SCHULTZ, P.; PFEIFFER, D. 2008. Host plant choice experiments of Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) in Virginia. *Journal of economic entomology*, 101.3: 859-865.

135. HOFTE, H.; WHITELEY, H. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews*, 1989, 53.2: 242-255.
136. HOLT, J. G.; KRIEG, N. R. 1984. Gram Negative Aerobic Rods and Cocci. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Williams and Wilkins and Publishers, Baltimore, USA*, 408-423.
137. HSIAO, T. H. 188. Host specificity, seasonality and bionomics of *Leptinotarsa* beetles. In: *Biology of chrysomelidae*. Dordrecht: Springer Netherlands, 1988. p. 581-599.
138. HSIAO, T.H.; KIM, K. C.; MCPHERON, B. A. 1993. Geographic and genetic variation among alfalfa weevil strains. *Evolution of insect pests: patterns of variation*, 1993, 311-27.
139. HUSSEY, M.A.; ZAYAITZ, A. 2007. Endospore stain protocol. *Am Soc Microbiol*, 8: 1-11.
140. IBRAHIM, M.A.; GRIKO, N.; JUNKER, M.; BULLA, L.A. 2010. *Bacillus thuringiensis*. *Bacillus thuringiensis: a genomics and proteomics perspective*. *Bioengineered bugs*, 2010, 1.1: 31-50.
141. ICHIMATSU, T.; MIZUKI, E.; NISHIMURA, K.; AKAO, T.; SAITOH, H.; HIGUCHI, K.; OHBA, M. 2000. Occurrence of *Bacillus thuringiensis* in fresh waters of Japan. *Current Microbiology*, 2000, 40: 217-220.
142. JACKSON, D.J. 1920. Bionomics of weevils of the genus *Sitones* injurious to leguminous crops in Britain. *Annals of Applied Biology*, 7: 269-298.
143. JAIN, D.; SUNDA, S. D.; SANADHYA, S.; NATH, D. J.;KHANDELWAL, S. K. 2017. Molecular characterization and PCR-based screening of cry genes from *Bacillus thuringiensis* strains. *3 Biotech*, 7: 1-8. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0583-7>
144. JAKHAR, A.; KASHYAP, L.; GOSWAMI, T. N.; PATEL, V. K.; SHARMA, R. K. 2017. *Bacillus thuringiensis* and insect pest management. In: *Biopesticides and Bioagents*. Apple Academic Press, 2017. p. 331-369.
145. JAKOBSON, G.G. 1931. Opredelitel' zhukov. Izdanie 2-e. Dopolnennoe Ogloblinym D. A. Gosudarstvennoe izdatel'stvo sel'skohozyajstvennoj i kolhozno-kooperativnoj literatury. Moskva – 1931 – Leningrad. [în rusă]
146. JENSEN, R.; GROHMANN, E.; SCHWAB, H.; DIAZ-OREJAS, R.; GERDES, K. 1995. Comparison of ccd of F, parDE of RP4, and parD of R1 using a novel conditional replication control system of plasmid R1. *Molecular microbiology*, 17.2: 211-220.
147. JENSON, I. 2014. *Bacillus*. In: *Encyclopedia of food microbiology* (2nd edition), 111-117.
148. JOUNG, K.-B.; COTE, J.-C. 2001. A phylogenetic analysis of *Bacillus thuringiensis* serovars by RFLP-based ribotyping. *Journal of Applied Microbiology*, 91.2: 279-289.
149. JUAREZ-PEREZ, V.-M.; FERRANDIS, M.; FRUTOS, R. 1997. PCR-based approach for detection of novel *Bacillus thuringiensis* cry genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 63.8: 2997-3002.

150. JURAT-FUENTES, J. L., JACKSON, T. A. 2012. Bacterial entomopathogens. In: *Insect Pathology*, 2nd edition, VEGA, F.E., KAYA, H.K. (Eds.), San Diego, USA: Academic Press, 265-349.
151. JURAT-FUENTES, J.L.; ADANG, M. J. 2004. Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *European Journal of Biochemistry*, 271.15: 3127-3135.
152. KATARA, J.; DESHMUKH, R.; SINGH, N.K.; KAUR, S. 2013. Diversity analysis of *Bacillus thuringiensis* isolates recovered from diverse habitats in India using random amplified polymorphic DNA (RAPD) MARKERS. *JOURNAL OF BIOLOGICAL SCIENCES*, 13.6: 514-520.
153. KATI, H.; SEZEN, K.; NALCACIOGLU, R.; DEMIRBAG, Z. 2007. A highly pathogenic strain of *Bacillus thuringiensis* serovar kurstaki in lepidopteran pests. *J. Microbiol.* 45.6: 553-557.
154. KAUR, P.; JOSHI, N.; BRAR, K. 2006. Morphological and biochemical characterization of *Bacillus thuringiensis* Berliner isolates and their evaluation against *Plutella xylostella* Linnaeus. *Journal of Biological Control*, 20.2: 191-195.
155. KEAN, J.M.; SUCKLING, D.M.; SULLIVAN, N.J.; TOBIN, P.C.; STRINGER, L.D.; SMITH, G.R.; KIMBER, B.; LEE, D.C.; FLORES VARGAS, R.; FLETCHER, J.; MACBETH, F.; MCCULLOUGH, D.G.; HERMS, D.A.; et al. 2023. Global eradication and response database. <http://b3.net.nz/gerda> (acesat 19.12.2022).
156. KEENA, M.A.; COTE, M.J.; GRINBERG, P.S.; WALLNER, W.E. 2008. World distribution of female flight and genetic variation in *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae). *Environmental entomology*, 37.3: 636-649.
157. KLEIN, M. G. 1992. Use of *Bacillus popilliae* in Japanese beetle control. *The Use of Pathogens in Scarab Pest Management*, 179-189.
158. KNIGHT, P.J.K.; CRICKMORE, N.; ELLAR, D.J. 1994. The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA (c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Molecular Microbiology*, 11.3: 429-436.
159. 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.). *Journal of entomological and Acarological Research*, 45.3: e19-e19.
160. KONI, P.A.; ELLAR, D.J. 1994. Biochemical characterization of *Bacillus thuringiensis* cytolytic δ -endotoxins. *Microbiology*, 140.8: 1869-1880.
161. KORCHAGHIN, V.N. 1971. Vrediteli i bolezni plodovyh i jagodnyh kul'tur. Al'bom. M., «Kolos», 1971. 160 str s ill.
162. KRIEG, A.; DE BARJAC, H.; BONNEFOI, A. 1968. A new serotype of *Bacillus thuringiensis* isolated in Germany: *Bacillus thuringiensis* var. *darmstadiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 10.2: 428-430.

163. KRIEG, V.A.; HUGER, A.M.; LANGENBRUCH, G.A.; SCHNETTER, W. 1983. *Bacillus thuringiensis* var. tenebrionis: ein neuer, gegenüber Larven von Coleopteren wirksamer Pathotyp. *Zeitschrift für angewandte Entomologie*, 96.1-5: 500-508.
164. KRYCH, V. K.; JOHNSON, J.L.; YOSTEN, A. A. 1980. Deoxyribonucleic acid homologies among strains of *Bacillus sphaericus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 30.2: 476-484.
165. KUMAR, J.; RAMLAL, A.; MALLICK, D.; MISHRA, V. 2021. An overview of some biopesticides and their importance in plant protection for commercial acceptance. *Plants*, 10.6: 1185.
166. KUMAR, K.; YASHASWINI, K. S.; EARANNA, N. 2013. Molecular characterization of Lepidopteran specific *Bacillus thuringiensis* strains isolated from Hilly Zone Soils of Karnataka, India. *African Journal of Biotechnology*, 12.20.
167. KURSTAK, E. Donnees sur l'epizootie bacterienne naturelle provoguee par un Bacillus du type Bacillus thuringiensis sur Ephestia kuhniella Zeller. *Entomophaga Mem. Hors Ser*, 1962, 2: 245-247.
168. LACEY L., KAYA H. *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*. 2007. ISBN 978-1-4020-5933-9.
169. LACHHAB, K.; TYAGI, R. D.; VALÉRO, J. R. 2001. Production of *Bacillus thuringiensis* biopesticides using wastewater sludge as a raw material: effect of inoculum and sludge solids concentration. *Process Biochemistry*, 37.2: 197-208.
170. LANDOLT, P.J.; TUMLINSON, J. H.; ALBORN, D. H. 1999. Attraction of Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) to damaged and chemically induced potato plants. *Environmental Entomology*, 28.6: 973-978.
171. LASHOMB, J.H.; NG, Y.S.; GHIDIU, G.; GREEN, E. 1984. Description of spring emergence by the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae), in New Jersey. *Environmental entomology*, 13.3: 907-910.
172. LECHNER, S.; MAYR, R.; FRANCIS, K.; PRUB, B.; KAPLAN, T.; WIEBNER-GUNKEL, E.; STEWART, G.; SCHERER, S. 1998. *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48.4: 1373-1382.
173. LEE, YONG K., KWON H., KANG E., LEE M., KIM E., CHU D., PARK S., NGO D., LEE H. 2004. Characteristics of six new *Bacillus thuringiensis* serovarieties: *B. thuringiensis* serovar. *coreanensis*, *leesis*, *konkukian*, *seoulensis*, *sooncheon*, and *yosoo*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14.3: 509-514.
174. LI, G.; LIU, B.; SHANG, Y.; YU, Z.; ZHANG, R. 2012. Novel activity evaluation and subsequent partial purification of antimicrobial peptides produced by *Bacillus subtilis* LFB112. *Annals of microbiology*, 2012, 62.2: 667-674.

175. LI, J.; CARROLL, J.; ELLAR, D.J. 1991. Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature*, 1353.6347: 815-821.
176. LIMA, A.S.G.; GUIDELLI, A.M.; ABREU, I.L.; LEMOS, M.V.F. 2002. Identification of new isolates of *Bacillus thuringiensis* using rep-PCR products and δ -endotoxin electron microscopy. *Genetics and Mol Biol*, 25: 225-229
177. LOGAN, N.A.; BERKELEY, R.C.W. 1984. Identification of *Bacillus* Strains Using the API System. *Journal of General Microbiology*, 130: 1871-1882.
178. LUNDIN, O.; RUNDLOF, M.; SMITH, H.G.; BOMMARCO, R. 2012. Towards integrated pest management in red clover seed production. *Journal of economic entomology*, 105.5: 1620-1628.
179. MACHADO, A. P.; VIVI, V. K.; TAVARES, J. R.; FREDERICO, GUEIROS FILHO, F. J.; FISCHMAN, O. 2010. Antibiosis and dark-pigments secretion by the phytopathogenic and environmental fungal species after interaction in vitro with a *Bacillus subtilis* isolate. *Brazilian archives of biology and technology*, 53: 997-1004.
180. MADUELL, P.; ARMENGOL, G.; LLAGOSTERA, M.; ORDUZ, S.; LINDOW, S. 2008. *B. thuringiensis* is a poor colonist of leaf surfaces. *Microbial Ecology*, 55: 212-219.
181. MAHESWARAN, S.; SREERAMANAN, S.; JOSEPHINE, C.M.R.; MARIMUTHU, K.; XAVIER, R. 2010. Occurrence of *Bacillus thuringiensis* in faeces of herbivorous farm animals. *African Journal of Biotechnology*, 2010, 9.47: 8013-8019.
182. MALEVANCIUC, N.; MUNTEANU-MOLOTIEVSKIY, N. 2010. Fauna and ecology of the weevils (Coleoptera: Curculionidae) associated with leguminous plants in the Republic of Moldova. *Oltenia-studii si comunicari stiintele naturii*, 26.2: 151-154.
183. MALOVICHKO, Y.V.; NIZHNIKOV, A.A.; ANTONETS, K. S. 2019. Repertoire of the *Bacillus thuringiensis* virulence factors unrelated to major classes of protein toxins and its role in specificity of host-pathogen interactions. *Toxins*, 11.6: 347.
184. MANASHEROB, R.; BEN-DOV, E.; ZARITSKY, A.; BARAK, Z. 1998. Germination, growth, and sporulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in excreted food vacuoles of the protozoan *Tetrahymena pyriformis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64.5: 1750-1758.
185. MANDIC-MULEC I., STEFANIC P., VAN ELSAS J.D. 2015. Ecology of *Bacillaceae*. *Microbiol. Spectr.* 3:TBS-0017-2013. Doi: 10.1128/microbiolspec.TBS-0017-2013.
186. MANTZOUKAS, S.; ELIOPOULOS, P.A. 2020. Endophytic entomopathogenic fungi: A valuable biological control tool against plant pests. *Applied Sciences*, 10.1: 360.
187. MARCO, G.; PORCAR, M. 2012. Ecological mysteries: Is *Bacillus thuringiensis* a real insect pathogen? *Bt Research*, 3.1.

188. MARGULIS, L.; JORGENSEN, J. Z.; DOLAN, S.; KOLCHINSKY, R.; RAINEY, F. A.; LO, S. C. 1998. The *Arthromitus* stage of *Bacillus cereus*: intestinal symbionts of animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95.3: 1236-1241.
189. MARTIN, P.A.W.; TRAVERS, R.S. 1989. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 55.10: 2437-2442.
190. MASSON, L.; ERLANDSON, M.; PUZSTAI-CAREY, M.; BROUSSEAU, R.; JUÁREZ-PÉREZ, V.; FRUTOS, R. 1998. A holistic approach for determining the entomopathogenic potential of *Bacillus thuringiensis* strains. *Applied and environmental microbiology*, 64.12: 4782-4788.
191. MASSON, L.; LU, Y.J.; MAZZA, A.; BROUSSEAU, R.; ADANG, M.J. 1995. The CryIA (c) Receptor purified from *Manduca sexta* displays multiple specificities (*). *Journal of Biological Chemistry*, 270.35: 20309-20315.
192. MATSUO, Y.; A. KATSUTA, S.; MATSUDA, Y.; SHIZURI, A.; YOKOTA, H.; KASA, I. 2006. *Mechercharimyces mesophilus* gen. nov., sp. nov. and *Mechercharimyces asporophorigenens* sp. nov., antitumour substance-producing marine bacteria, and description of Thermoactinomycetaceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56.12: 2837-2842.
193. MCCULLOUGH, C.; DOUGHTY, H.; BOYLE, S.; KUHAR, T. 2021. Efficacy of Two Experimental *Bt tenebrionis* formulations for the control of Colorado potato beetle on potatoes at two locations in Virginia. *Arthropod Management Tests*, 46.1: tsab023.
194. MCNALL, R. J.; ADANG, M. J. 2003. Identification of novel *Bacillus thuringiensis* CryIAc binding proteins in *Manduca sexta* midgut through proteomic analysis. *Insect biochemistry and molecular biology*, 33.10: 999-1010.
195. MEDRANO, E.G.; BELL, A.A. 2007. Role of *Pantoea agglomerans* in opportunistic bacterial seed and boll rot of cotton (*Gossypium hirsutum*) grown in the field. *Journal of Applied Microbiology*, 102: 134-143.
196. MELO, A.L.D.A.; SOCCOL, V.T.; SOCCOL, C.R. 2016. *Bacillus thuringiensis*: mechanism of action, resistance, and new applications: a review. *Critical reviews in biotechnology*, 36.2: 317-326.
197. MERGAERT, J.; VERDONCK, L.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. 1984. Numerical taxonomy of *Erwinia* species using API systems. *Microbiology*, 1984, 130.8: 1893-1910.
198. MESSAOUDI, A.; GTARI, M.; BOUDABOUS, A.; WAGENLEHNER, F. 2009. Identification and susceptibility of *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. isolated from meat products. *African Journal of Microbiology Research*, 3.7: 362-369.
199. MIKE'S INSECT KEYS [online]. Last edited: 02.02.2021 [citat 24.05.2022]. Disponibil: <https://sites.google.com/view/mikes-insect-keys/mikes-insect-keys>

200. MILLER, E.; ZUBOVSKI, N.; RUSCINSCHI, A. 1929. Materiale pentru fauna entomologică din Basarabia. Macrolepidoptera. Suplimentul III. Buletinul Muzeului National de Istorie Naturală din Chișinău. *Bulletin du Musée National de Sciences Naturelles de Kichineff.*(Red. Florov N.). Chișinău: Tip. Eparhială „Cartea Românească”, 2-3. 153 p.
201. MILLER, George Tyler. *Sustaining the Earth: an integrated approach.* Thomson/Brooks/Cole. ISBN 978-0-534-40088-0, 2003.
202. MILNER, R. J. 1994. History of *Bacillus thuringiensis*. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 49.1: 9-13.
203. MITCHELL, B. K.; LOW, R. 1994. The structure of feeding behavior in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Insect Behavior*, 1994, 7: 707-729.
204. MOHAMMADOU, B.A.; BLAY, G.L.; MBOFUNG, C.M.; BARBIER, G. 2014. Antimicrobial activities, toxinogenic potential and sensitivity to antibiotics of *Bacillus* strains isolated from Mbuja, an *Hibiscus sabdariffa* fermented seeds from Cameroon. *African Journal of Biotechnology*, 13.35.
205. MOLDOVAN, A. 2017. Perspective de dezvoltare a agenților bacterieni de control biologic al insectelor dăunătoare în Republica Moldova. In: *Actual problems of zoology and parasitology: achievements and prospects.* p. 310-311.
206. MOLDOVAN, A. 2019. Controlul biologic al Coleopterenilor Curculionide (Coleoptera, Curculionidae): probleme, realizări și perspective. *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții*, 337.1: 131-142.
207. MOLDOVAN, A.; MOLOTIEVSKIY MUNTEANU, N.; TODERAȘ, I. 2018. Studii preliminare privind agenții de control biologic al dăunătorilor tomatelor în Republica Moldova. In: *Functional Ecology of Animals.* 2018. p. 287-289.
208. MOLDOVAN, A.; MUNTEANU-MOLOTIEVSKIY, N.; TODERAȘ, I. 2022. Fungii entomopatogene. Chișinău: S. n., 2022 (F.E.-P. "Tipografia Centrală"), 151 p.
209. MOLDOVAN, A.; TODERAS, 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.* 2017. p. 303-309.
210. MONNERAT, R. G.; BATISTA, A. C.; DE MEDEIROS, P. T.; MARTINS, E. S.; MELATTI, V. M.; PRAÇA, L. B.; DUMAS, V.F.; MORINAGA. C.; DEMO, C.; MENEZES GOMES, A.C.; FALCAO, R.; SIQUEIRA, C.B.; SILVA-WERNECK, J.O.; BERRY, C. 2007. Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatalis*. *Biological Control*, 2007, 41.3: 291-295.
211. MORSE, R. J[¶]; YAMAMOTO, T.; STROUD, R. M. 2001. Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. *Structure*, 9.5: 409-417.

212. MUKHIJA, B.; KHAANA, V. 2018. Isolation, characterization and crystal morphology study of *Bacillus thuringiensis* isolates from soils of Punjab. *J Pure Appl Microbiol*, 12.1: 189-193.
213. MUNTEANU, N. 2006. Particularitățile spectrului trofic al rinchitidelor și atelabidelor (Coleoptera: Rhynchitidae, Atelabidae) din Republica Moldova. *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții*. 298.3: 154-160.
214. MUNTEANU, N. V.; DANISMAZOGLU, M.; MOLDOVAN, A. I.; TODERAS, I. K.; NALCACIOGLU, R.; DEMIRBAG, Z. 2014. The first study on bacterial flora of pest beetles *Sciaphobus squalidus*, *Tatianaerhynchites aequatus* and *Byctiscus betulae* in the Republic of Moldova. *Biologia*, 69: 681-690.
215. MUNTEANU-MOLOTIEVSKIY, N.; TODERASH, I.; IURCU-STRĂISTARU, E.; MOLDOVAN, A. 2019. A review of the major pest insects of tomato crops in the Republic of Moldova. *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții*, 337.1: 7-18.
216. NAKAMURA, L. K. 1998. *Bacillus pseudomycooides* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48.3: 1031-1035.
217. NARYANAN, M.S. 2006. Competitive ability and host exploitation in *Bacillus thuringiensis*. MSc Thesis. University of Oxford; Oxford, UK.
218. NAULT, B.A.; KENNEDY, G. G. 1999. Influence of foliar-applied *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* and an early potato harvest on abundance and overwinter survival of Colorado potato beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) in North Carolina. *Journal of economic entomology*, 92.5: 1165-1171.
219. NAZARENKO, V.I. 2013. K izucheniyu zhukov nadsemeystva Curculionoi-dea (Coleoptera) Natsional'nogo prirodnogo parka „Desnyansko-Starogutskiy”. In: *Ukrains'kiy entomologichniy zhurnal*. 2013, 1.6: 12-32. [în rusă]
220. NICHOLSON, W. L. 2002. Roles of *Bacillus* endospores in the environment. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 59: 410-416.
221. NICOLOPOULOU-STAMATI, P.; MAIPAS, S.; KOTAMPASI, C.; STAMATIS, P.; HENS, L. 2016. Chemical pesticides and human health: the urgent need for a new concept in agriculture. *Frontiers in public health*, 4: 148.
222. NISHIMOTO, R. 2019. Global trends in the crop protection industry. *Journal of pesticide science*, 44.3: 141-147.
223. NUGROHO, S.; SEMBIRING, E.R.; RACHMAT, A.; KOESHARYOTO, W. 2021. Cloning and expression of *Bacillus thuringiensis* cry1B in *Escherichia coli* strain NiCo21. In: *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. IOP Publishing, p. 012051.
224. OBENCHAIN, F. D.; ELLIS, B. J. 1990. Safety considerations in the use of *Bacillus popilliae*, the milky disease pathogen of Scarabaeidae. In: *Safety of microbial insecticides*. LAIRD, M.; LACEY, E.; DAVIDSON, E. Eds. USA: CRC Press, 189-201.
225. OLSON, S. 2015. An analysis of the biopesticide market now and where it is going. *Outlooks on pest management*, 26.5: 203-206.

226. *Opredelitel' nasekomykh evropejskoj chasti SSSR v pjati tomah* (pod obsl'hej redakciej chlena-korrespondenta AN SSSR G.JA.BEJ-BIENKO). Tom 2. Zhestkokrylye i veerokrylye. Redaktery toma: E.L. GUR'EVA I O.L. KRYZHANOVSKIJ. ("Opredeliteli po faune SSSR, izdavaemye Zoologicheskim institutom AN SSSR", vyp. 89) Izd-vo "Nauka". Moskva – Leningrad. 1965. 668 str. (172 ris.). [în rusă]
227. OSMAN, G.; ALREADY, R.; ASSAEEDI, A.; ORGANJI, S.; EL-GHAREEB, D.; ABULREESH, H.; ALTHUBIANI, A. 2015. Bioinsecticide *Bacillus thuringiensis* a comprehensive review. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 25.1: 271-288.
228. PACHECO, S.; GOMEZ, I.; CHINAS, M.; SANCHEZ, J.; SOBERON, M.; BRAVO, A. 2021. Whole genome sequencing analysis of *Bacillus thuringiensis* GR007 reveals multiple pesticidal protein genes. *Frontiers in microbiology*, 12: 758314.
229. PALMA, L.; MUNOZ, D.; BERRY, C.; MURILLO, J.; CABALLERO, P. 2014. *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. *Toxins*, 2014, 6.12: 3296-3325.
230. PARDO-LOPEZ, L.; SOBERON, M.; BRAVO, A. 2013. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *FEMS Microbiology Reviews*, 37.1: 3-22.
231. PARK, H. W.; FEDERICI, B. A. Genetic engineering of bacteria to improve efficacy using the insecticidal proteins of *Bacillus* species. In: *Insect pathogens: molecular approaches and techniques*. Wallingford UK: CABI, 2009. 275-305.
232. PARK, H.; BIDESHI, D.K.; FEDERICI, B. A. 2010. Properties and applied use of the mosquitocidal bacterium, *Bacillus sphaericus*. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 13.3: 159-168.
233. PARK, S.; KIM, C.; LEE, D.; SONG, D.; CHEON, K.; LEE, H.; KIM, S.; KIM, J.; LEE, S. 2017. Construction of *Bacillus thuringiensis* simulant strains suitable for environmental release. *Applied and Environmental Microbiology*, 83.9: e00126-17.
234. PARKER, M.W.; FEIL, S. C. 2005. Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Progress in biophysics and molecular biology*, 88.1: 91-142.
235. PAUL, S.I.; RAHMAN, M.M.; SALAM, M.A.; KHAN, M.A.; ISLAM, M.T. 2021. Identification of marine sponge-associated bacteria of the Saint Martin's island of the Bay of Bengal emphasizing on the prevention of motile *Aeromonas* septicemia in *Labeo rohita*. *Aquaculture*, 545: 737156.
236. PERRY, A.; YAMAMOTO, I.; ISHAAYA, I.; PERRY, R. 1998. *Insecticides in agriculture and environment: Retrospects and Prospects*. © Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
237. PETRUKHA, O.I. 1969. Kluben'kovye dolgonosiki roda *Sitona* Germ. fauny SSSR, vredyashchie bobovym kul'turam. Leningrad: Nauka, 255 s. [în rusă].

238. PLATA-RUEDA, A.; QUINTERO, H.A.; SERRAO, J.E.; MARTINEZ, L.C. 2020. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains on the nettle caterpillar, *Euprosterina elaeasa* (Lepidoptera: Limacodidae). *Insects*, 11.5: 310.
239. POIRAS, A.A. 1998. *Catalogue of the weevils (Coleoptera, Curculionoidea) and their host plants in the Republic of Moldova*. Sofia-Moscow, Pensoft Publishers: 156 p.
240. POIRAS, A.A. 2006. Coleopterele suprafamiliei Curculionoidea (Insecta, Coleoptera) din Republica Moldova, biodiversitatea și importanța lor. Chișinău, (Rezumatul tezei de doctor), 52 p.
241. POPOV, T. 2020. Izolarea și caracterizarea noilor tulpini de *Bacillus thuringiensis* pe teritoriul Republicii Moldova. In: *Sesiune națională cu participare internațională de comunicări științifice studențești*. 18-21.
242. PORCAR, M.; IRIARTE, J.; DUMANOIR, V.; FERRANDIS, M.; LECADET, M.; FERRÉ, J.; CABALLERO, P. 1999. Identification and characterization of the new *Bacillus thuringiensis* serovars *pirenaica* (serotype H57) and *iberica* (serotype H59). *Journal of applied microbiology*, 87.5: 640-648.
243. PORCAR, M.; JUAREZ-PEREZ, V. 2003. PCR-based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes. *FEMS microbiology reviews*, 26.5: 419-432.
244. POSFAY-BARBE, K.M.; SCHRENZEL, J.; FREY, J.; STUDER, R.; KROFF, C.; BELLI, D.C.; PARVEX, P.; RIMENSBERGER, P.C.; SCHAPPI, M.G. 2008. Food poisoning as a cause of acute liver failure. *The Pediatric infectious disease journal*, 27.9: 846-847.
245. RABINOVITCH, L.; VIVONI, A. M.; MACHADO, V.; KNAAK, N.; BERLITZ, D. L.; POLANCZYK, R. A.; FIUZA, L. M. 2017. *Bacillus thuringiensis* characterization: morphology, physiology, biochemistry, pathotype, cellular, and molecular aspects. *Bacillus thuringiensis and Lysinibacillus sphaericus: Characterization and use in the field of biocontrol*, FIUZA, L. M.; POLANCZYK, R. A.; CRICKMORE, N. (ed.). Springer International Publishing, 1-18.
246. RATH, S.; SAHU, M.C.; DUEY, D.; DEBATA, N.K.; PADHY, R.N. 2011. Which value should be used as the lethal concentration 50 (LC 50) with bacteria? *Interdisciplinary sciences: Computational life sciences*, 3: 138-143.
247. RAYMOND, B. 2017. The biology, ecology and taxonomy of *Bacillus thuringiensis* and related bacteria. *Bacillus thuringiensis and Lysinibacillus sphaericus: Characterization and use in the field of biocontrol*, FIUZA, L. M.; POLANCZYK, R. A.; CRICKMORE, N. (ed.). Springer International Publishing, 19-39.
248. RAYMOND, B.; WYRES, K. L.; SHEPPARD, S. K.; ELLIS, R. J.; BON-SALL, M. B. 2010. Environmental factors determining the epidemiology and population genetic structure of the *Bacillus cereus* group in the field. *PLoS Pathogens*, 2010, 6.5: e1000905.

249. REDMOND, C.T.; POTTER, D.A. 1995. Lack of efficacy of *in vivo*- and putatively *in vitro*-produced *Bacillus popilliae* against field populations of Japanese beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) grubs in Kentucky. *J. Econ. Entomol.* 88 : 846-854.
250. REED, W. *Heliothis armigera* (Hb.) (Noctuidae) in Western Tanganyika. 1965. II.-Ecology and natural and chemical control. *Bulletin of Entomological Research*, 56.1: 127-140.
251. REGISTRUL DE STAT al produselor de uz fitosanitar și fertilizantilor 2023. Centrul de Stat pentru atestarea și omologarea produselor de uz fitosanitar și a fertilizantilor. Accesat [01.12.2023]. Disponibil: <http://www.pesticide.md/registrul-de-stat/>
252. REINER, K. 2010. Catalase test protocol. *American Society for Microbiology*, 1-6.
253. REYAZ, A. L.; GUNAPRIYA, L.; INDRA ARULSEVI, P. Molecular characterization of indigenous *Bacillus thuringiensis* strains isolated from Kashmir valley. *3 Biotech*, 2017, 7: 1-11.
254. REYES-RAMIREZ, A.; IBARRA, J. E. 2005. Fingerprinting of *Bacillus thuringiensis* type strains and isolates by using *Bacillus cereus* group-specific repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71.3: 1346-1355.
255. REZZONICO, F.; SMITS, T.H.; MONTESINOS, E.; FREY, J.E.; DUFFY, B. 2009. Genotypic comparison of *Pantoea agglomerans* plant and clinical strains. *BMC microbiology*, 9.1: 1-18.
256. ROY, H.E.; COTTRELL, T. E. 2008. Forgotten natural enemies: Interactions between coccinellids and insect-parasitic fungi. *European Journal of Entomology*, 105.3.
257. RYAN, K.J.; RAY, C.G. eds. 2004. *Sherris Medical Microbiology* (4th ed.). McGraw Hill. 997p.
258. SALEKJALALI, M.; BARZEGARI, A.; JAFARI, B. 2012. Isolation, PCR detection and diversity of native *Bacillus thuringiensis* strains collection isolated from diverse Arasbaran Natural ecosystems. *World Appl. Sci. J*, 18: 1133-1138.
259. SAMBROOK J., FRITSCH E.F., MANIATIS T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1800 p.
260. SANAHUJA, G.; BANAKAR, R.; TWYMAN, R.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P. 2011. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant biotechnology journal*, 9.3: 283-300.
261. SANSINENEA, E. 2012. Discovery and description of *Bacillus thuringiensis*. In: *Bacillus thuringiensis biotechnology*, 3-18.
262. SARRAFZADEH M. Nutritional Requirements of *Bacillus thuringiensis* during different phases of growth, sporulation and germination evaluated by Plackett-Burman method. 2012. *Iran. J. Chem. Chem. Eng.*, 31.4: 131-136.

263. SAUKA, D. H.; BASILE, J.I.; BENINTENDE, G. 2012. Evidence of *Bacillus thuringiensis* intra-serovar diversity revealed by *Bacillus cereus* group-specific repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR genomic fingerprinting. *Microbial Physiology*, 21.3-4: 184-190.
264. SAVKOVSKI, P.P. 1951. *Biologija kazarki v USSR i mery bor'by s nej.* / Sbornik rabot po zashhite rastenij Ukrainского NII Plodovodstva. Vyp. 32. Kiev-Har'kov: Gos. izd. sel'hoz. liter. USSR, S. 51-83. [în rusă]
265. SAVKOVSKI, P.P. 1976. *Atlas vreditelej plodovyh i jagodnyh kul'tur.* Kiev: Urozhaj, 207 s. [în rusă]
266. SAVKOVSKI, P.P. 1990. *Atlas vreditelej plodovyh i jagodnyh kul'tur,* Kiev: Urozhaj, 90 s. [în rusă]
267. SCHAEFFER, A. B.; FULTON, MD. 1933. A simplified method of staining endospores. *Science*, 1933, 77.1990: 194.
268. SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D.R.; DEAN, D.H. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62.3: 775-806.
269. SCHROD, J.; BASEDOW, T.; LANGENBRUCH, G.A. 1996. Studies on bionomics and biological control of the Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say, Col., Chrysomelidae) at two sites in southern Hesse (FRG). *Journal of Applied Entomology*, 1996, 120.10: 619-626.
270. SCHUNEMANN, R.; KNAAK, N.; FIUZA, L.M. 2014. Mode of action and specificity of *Bacillus thuringiensis* toxins in the control of caterpillars and stink bugs in soybean culture. *International Scholarly Research Notices*, 2014:1-12
271. SENA DE SILVA, I.H.; GOMEZ, I.; PACHECO, S.; SANCHEZ, J.; ZHANG, J.; CASTELLANE, T.C.L.; DESIDERIO, J.A.; SOBERON, M.; BRAVO, A.; POLANCZYK, R.A. 2020. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab Domain III β -16 is involved in binding to prohibitin, which correlates with toxicity against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Applied and Environmental Microbiology*, 2021, 87.2: e01930-20.
272. SEZEN, K.; DEMIR, I.; DEMIRBAG, Z. 2004. Study of the bacterial flora as a biological control agent of *Agelastica alni* L. (Coleoptera: Chrysomelidae). *Biologia*, 59 (3): 327-331.
273. SEZEN, K.; DEMIRBAG, Z. 1999. Isolation and insecticidal activity of some bacteria from the hazelnut beetle (*Balaninus nucum* L.). *Applied Entomology and zoology*, 34.1: 85-89.
274. SHABBIR, M.Z.; ZHANG, T.; PRABU, S.; WANG, Y.; WANG, Z.; BRAVO, A.; SOBERON, M.; HE, K. 2020. Identification of Cry1Ah-binding proteins through pull down and gene expression analysis in Cry1Ah-resistant and susceptible strains of *Ostrinia furnacalis*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 163: 200-208.

275. SHARMA, A.; KUMAR, V.; SHAHZAD, B.; TANVEER, M.; SIDHU, G. P. S.; HANDA, N.; ... THUKRAL, A. K. 2019. Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. *SN Applied Sciences*, 1: 1-16.
276. SHARMA, J.; IYER, P. 2018. isolation and identification of *Bacillus thuringiensis* and corroborate its insecticidal property. *Journal of Agricultural Science and Food Research*. Vol. 9: 1- 3.
277. SHARMA, R.; MANDA, R.; GUPTA, S.; KUMAR, S.; KUMAR, V. 2013. Isolation and characterization of osmotolerant bacteria from Thar Desert of Western Rajasthan (India). *Revista de biologia tropical*, 2013, 61.4: 1551-1562.
278. SHAROV, A. A.; LIEBHOLD, A. M.; RAVLIN, F. W. 1995. Prediction of gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) mating success from pheromone trap counts. *Environmental Entomology*, 1995, 24.5: 1239-1244.
279. SIGMON, J. 2008. The starch hydrolysis test. *American Society for Microbiology*.
280. SILO-SUH, L.A.; STABB, E.V.; RAFFEL, S.J.; HANDELSMAN, J. 1998. Target range of zwittermicin A, an aminopolyol antibiotic from *Bacillus cereus*. *Current microbiology*, 37: 6-11.
281. SIMAIR, A.; QURESHI, A.; KHUSHK, I.; ALI, C.; LASHARI, S.; BHUTTO, M.; MANGRIO, G.; LU, C. 2017. Production and partial characterization of α -amylase enzyme from *Bacillus sp.* BCC 01-50 and potential applications. *BioMed Research International*, 2017: 1-9.
282. SMRECZYNSKI, S. 1966. Weevils – Curculionidae. Subfamilies Otiorrhynchinae, Brachyderinae. Keys for identification of Polish insects. PWN, Warszawa, 130 pp. [in Polish]
283. SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. Eds.. 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams and Williams, Baltimore, 1986, 1208-1234.
284. SVIKLE, M. Y. 1976. Control of the Colorado beetle. *Zashchita Rastenii*, 6: 10-11.
285. SWANSON, E. C.; COLLINS, M. T. 1980. Use of the API 20E system to identify veterinary Enterobacteriaceae. *Journal of Clinical Microbiology*, 12.1: 10-14.
286. SWIECICKA, I.; BIDESHI, D. K.; FEDERICI, B. A. 2008. Novel isolate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* that produces a quasicuboidal crystal of Cry1Ab21 toxic to larvae of *Trichoplusia NI*. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 74.4: 923-930.
287. TAILLIEZ, P.; PAGES, P.; GINIBRE, N.; BOEMARE, N. (200. New insight into diversity in the genus *Xenorhabdus*, including the description of ten novel species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, 56.12: 2805-2818.
288. TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. 2007. MEGA4: molecular

- evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular biology and evolution*, 24.8: 1596-1599.
289. TANADA, Y.; H. KAYA. 1992. *Insect Pathology*. Academic press Inc., Harcourt Brace Jovanovich Publishers, San Diego. 666 p.
290. TAUBER, M.J.; TAUBER, C.A.; OBRYCKI, J.J.; GOLLANDS, B.; WRIGHT, R.J. 1988. Voltinism and the induction of aestival diapause in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 1988, 81.5: 748-754.
291. TAY, W.T.; MAHON, R.J.; HECKEL, D.G.; WALSH, T.K.; DOWNES, S.; JAMES, W.J.; LEE, S.-F.; REINEKE, A.; WILLIAMS, A.K.; GORDON, K.H.J. 2015. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry2Ab is conferred by mutations in an ABC transporter subfamily A protein. *PLoS genetics*, 11.11: e1005534.
292. TE GIFFEL, M.C.; BEUMER, R.R.; GRANUM, P.E.; ROMBOUTS, F.M. 1997. Isolation and characterisation of *Bacillus cereus* from pasteurised milk in household refrigerators in the Netherlands. *International journal of food microbiology*, 34.3: 307-318.
293. TEMPELAARS, M. H.; RODRIGUES, S.; ABEE, T. 2011. Comparative analysis of antimicrobial activities of valinomycin and cereulide, the *Bacillus cereus* emetic toxin. *Applied and environmental microbiology*, 77.8: 2755-2762.
294. TER-MINASYAN M.E., 1974. Sem. Bruchidae. *Nasekomye i kleshhi*, t. 2, s. 197-208.
295. TER-MINASYAN, M.E. 1950. *Fauna SSSR. Nasekomye zhestkokrylye. Dolgonosiki-trubkoverty ...* [L. : Izdatel'stvo Akademii nauk SSSR, 1950. 238 s. [în rusă]
296. THIERY, I.; FRACHON, E. 1997. Identification, isolation, culture and preservation of entomopathogenic bacteria, pp. 55-73. In: *Manual of Techniques in Insect Pathology*, LACEY, A.L. (ed.), Academic Press, London, 409 p.
297. THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. 1994. CLUSTALW: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
298. THWAITE, J.E.; ATKINS, H.S. 2012. *Bacillus*. In: *Medical Microbiology* (18th edition). D. GREENWOOD, R. C. B. SLACK, M. R. BARER, W. L. IRVING Eds. Churchill Livingstone.
299. TIAN, J. C.; ROMEIS, J.; LIU, K.; ZHANG, F. C.; ZHENG, X. S.; XU, H. X *et al.* 2017. Assessing the effects of Cry1C rice and Cry2A rice to *Pseudogonatopus flavifemur*, a parasitoid of rice planthoppers. *Scientific reports*, 7.1: 7838.
300. TILLE, P. M.; FORBES, B. A. 2014. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology* (13th edition.). St. Louis, Missouri: Elsevier.

301. TIMUȘ, A. 2021. *Bunele practici de protecție integrată a culturilor agricole în contextul schimbărilor climatice: Ghid practic pentru producătorii agricoli*. Chișinău: S. n., Tipogr. "Bons Offices". 150 p.
302. TINGLE, F. C.; MITCHELL, E. R. 1977. Seasonal populations of armyworms and loopers at Hastings, Florida. *Florida Entomologist*, 115-122.
303. TKACH, M.T. 1977. *Sovki i mery bor'by s nimi*. Kishinev, Kartja Moldovenjaskje, 108 s. [în rusă]
304. TOBIN, P.C.; ONUFRIEVA, K.S.; THORPE, K.W. 2013. The relationship between male moth density and female mating success in invading populations of *Lymantria dispar*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 146.1: 103-111.
305. TOJO, A.; AIZAWA, K. 1983. Dissolution and degradation of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin by gut juice protease of the silkworm *Bombyx mori*. *Applied and Environmental Microbiology*, 45.2: 576-580.
306. TRAVERS, R.S.; MARTIN, P.A.W.; REICHELDERFER, C.F. 1987. Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* spp. *Applied and environmental microbiology*, 53.6: 1263-1266.
307. TUIPULOTU, D. E.; MATHUR, A.; NGO, C.; MAN, S. M. 2021. *Bacillus cereus*: epidemiology, virulence factors, and host-pathogen interactions. *Trends in Microbiology*, 29.5: 458-471.
308. TURNBULL, P.C.B. 1996. Chapter 15. *Bacillus*. In: *Medical Microbiology*, 4th ed. BARON, S., ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston.
309. TVRZOVA, L.; SCHUMANN, P.; SPROER, C.; SEDLACEK, I.; PACOVA, Z.; SEDO O.; ZDRAHAL, Z.; STEFFEN, M.; LANG, E. 2006. *Pseudomonas moraviensis* sp. nov. and *Pseudomonas vranovensis* sp. nov., soil bacteria isolated on nitroaromatic compounds, and emended description of *Pseudomonas asplenii*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56: 2657-2663.
310. ȚUGULEA, C.; DERJANSCHI, V. 2015. Istoricul studiului noctuidelor (Lepidoptera, Noctuidae) în Republica Moldova. *Buletin Științific. Revista de Etnografie, Științele Naturii și Muzeologie (Serie Nouă)*, 35.22: 59-80.
311. VACHON, V.; LAPRADE, R.; SCHWARTZ, J. 2012. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: a critical review. *Journal of invertebrate pathology*, 111.1: 1-12.
312. VADLAMUDI, R.K.; WEBER, E.; JI, I.; JI, T.H.; BULLA, L.A. 1995. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* (*). *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270.10: 5490-5494.
313. VALAITIS, A.P.; JENKINS, J.L.; LEE, M.K.; DEAN, D.H.; GARNER, K.J. 2001. Isolation and partial characterization of gypsy moth BTR-270, an anionic brush border membrane glycoconjugate that binds *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins with high affinity. *Archives of Insect Biochemistry and Physio-*

- logy: *Published in Collaboration with the Entomological Society of America*, 46.4: 186-200.
314. VALICENTE, F.; BEZERRA DA SILVA, R. 2017. Characterization of *Bacillus thuringiensis* using plasmid patterns, AFLP and Rep-PCR. In: *Bacillus thuringiensis and Lysinibacillus sphaericus: Characterization and use in the field of biocontrol*, FIUZA, L. M.; POLANCZYK, R. A.; CRICKMORE, N. (ed.). Springer International Publishing, 79 – 87.
315. VALTIERRA-DE-LUIS, D.; VILLANUEVA, M.; BERRY, C.; CABALLERO, P. 2020. Potential for *Bacillus thuringiensis* and other bacterial toxins as biological control agents to combat dipteran pests of medical and agronomic importance. *Toxins*, 12.12: 773.
316. Van FRANKENHUYZEN, K. 2000. Application of *Bacillus thuringiensis* in forestry. In: *Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application*. CHARLES, J.-F.; DELECLUSE, A.; NIELSEN-LEROUX, C. (Eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 371-382.
317. VASILIEV, V.P. 1955. *Vrediteli sadovyh nasazhdenij*. Kiev: AN Ukrainskoj SSR, 265 s. [în rusă]
318. VASILIEV, V.P. 1988. *Vrediteli sel'skohozejstvennyh kul'tur i lesnyh nasazhdenij: V 3-h t. — T. 2. Vrednye chlenistonogie, pozvonochnye. 2-e izd., ispr. I dop. / Pod obshh. Red. V. P. Vasil'eva; Red-ry toma V.G. Dolin, V.N. Stovbchatyj. Kiev: Urozhaj, 576 s. [în rusă]*
319. VASILIEV, V.P. 1989. *Vrediteli sel'skohozejstvennyh kul'tur i lesnyh nasazhdenij: T. 3. Metody i sredstva bor'by s vrediteljami, sistemy meroprijatij po zashhite rastenij*. Red. Toma V.P. Vasil'ev, V.P. Omeljuta. Kiev: Urozhaj, 408 s. [în rusă]
320. VASILIEV, V.P.; LIVSHIC, I.Z. 1984. *Vrediteli plodovyh kul'tur*. M.: Kolos, 399 s. [în rusă]
321. VENTOSA, A.; NIETO, J. J.; OREN, A. 1998. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62.2: 504-544.
322. 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. *Journal of Applied Entomology*, 113.1-5: 183-193.
323. VERSALOVIC, J., SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F.J.; LUPSKI, J.R. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol. Cell Biol.*, 5: 25-40.
324. VESSEY, J. K.; BUSS, T. J. 2002. *Bacillus cereus* UW85 inoculation effects on growth, nodulation, and N accumulation in grain legumes: controlled-environment studies. *Canadian Journal of Plant Science*, 82.2: 282-290.
325. VIDAL-QUIST, J.C.; CASTANERA, P.; GONZALEZ-CABRERA, J. 2009. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from citrus orchards in

- Spain and evaluation of their insecticidal activity against *Ceratitis capitata*. *J Microbiol. Biotechnol.*, 19.8: 749-759.
326. VIDAL-QUIST, J.C.; ROGERS, H.J.; MAHENTHIRALINGAM, E.; BERRY, C. 2013. *Bacillus thuringiensis* colonises plant roots in a phylogeny-dependent manner. *FEMS Microbiology Ecology*, 86.3: 474-489.
327. VILAIN, S.; LUO, Y.; HILDRETH, M.B.; BROZEL, V.S. 2006. Analysis of the life cycle of the soil saprophyte *Bacillus cereus* in liquid soil extract and in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 72.7: 4970-4977.
328. VOLOȘCIUC, Leonid. Realizări în protecția microbiologică a plantelor. *Revista de Știință, Inovare, Cultură și Artă „Akademos”*, 2015, 38.3: 57-64.
329. VON WELLENSTEIN, G.; SCHWENKE, W.; 1978. *Lymantria* Hbn. In: *Die forstschsdlinge Europas. Schmetterlinge. 3. Band.* SCHWENKE W, ed. Hamburg und Berlin, Germany: Paul Parey, 334-368.
330. VOROTYNCEVA, A.F. 1971. *Biologicheskie osobennosti koloradskogo zhuka (Leptinotarsa decemlineata Say) ego znachenie kak vreditelja kartofelja, baklazhanov, pomidorov v central'noj zone Moldavii i mery bor'by s nim.* Avtoref. Diss. Kand. Sel'skohoz. Nauk. Kishinev. 18 s.
331. VOSS, R. H.; FERRO, D. N. 1990 b. Phenology of flight and walking by Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) adults in western Massachusetts. *Environmental Entomology*, 19.1: 117-122.
332. VOSS, R. H.; FERRO, D. N. 1990a. Ecology of migrating Colorado potato beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) in western Massachusetts. *Environmental Entomology*, 19.1: 123-129.
333. WANG, N. C.; LI, Z. H. 1984. Studies on the biology of cotton bollworm (*Heliothis armigera* Hübner) and tobacco budworm (*Heliothis assulta* Queene). *Journal of the Shandong Agricultural University*, 1.1: 13-25.
334. WANG, T. Y.; WANG, L.; ZHANG, J. H.; DONG, W. H. 2011. A simplified universal genomic DNA extraction protocol suitable for PCR. *Genet. Mol. Res.*, 10.1: 519-525.
335. WEI, J.Z.; HALE, K.; CARTA, L.; PLATZER, E.G., et al.. 2003. *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003, 100.5: 2760-2765.
336. WEST, A.W.; BURGESS, H.D.; DIXON, T.J.; WYBORN, C.H. 1985b. Effect of incubation in non-sterilised and autoclaved arable soil on survival of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* spore inocula. *New Zealand journal of agricultural research*, 28.4: 559-566.
337. WEST, A.W.; BURGESS, H.D.; DIXON, T.J. 1985a. Survival of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* spore inocula in soil: effects of pH, moisture, nutrient availability and indigenous microorganisms. *Soil Biology and Biochemistry*, 17.5: 657-665.
338. WHO. Microbial pest control agent : *Bacillus thuringiensis*. 1999. [Accesat la 03.02.2020] Disponibil: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42242> ISBN 9241572175.

339. WILLIAM, G.W.; SUSAN, M.B.; DALE, A.P.; DAVID, J.L. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*, 173.2: 697-703.
340. WILLIAMS, L., SCHOTZKO, D. J.; O'KEEFFE, L. E. 1995. Pea leaf weevil herbivory on pea seedlings: effects on growth response and yield. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 76.3: 255-269.
341. WILSON, J.W. 1934. *The asparagus caterpillar: its life history and control*. University of Florida Agricultural Experiment Station, Bulletin 271: 1-26.
342. XU, C.; WANG, B. C.; YU, Z.; SUN, M. 2014. Structural insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and parasporin toxins. *Toxins*, 2014, 6.9: 2732-2770.
343. XU, K.; YUAN, Z.; RAYNER, S.; HU, X. 2015. Genome comparison provides molecular insights into the phylogeny of the reassigned new genus *Lysinibacillus*. *BMC Genomics*, 16.1: 1-12.
344. YAKUPOGLU, M.; NALCACIOGLU, R.; DEMIRBAG, Z.; DEMIR I. 2009. Determination of the bacterial flora of *Agriotes lineatus* (Coleoptera: Elateridae) and the insecticidal effects of the identified isolates on this pest. *Türkiye III. Bitki Koruma Kongresi*, Temmuz, 15-18.
345. YAMAN, M.; DEMIRBAG, Z.; BELDUZ, A. L. I. 1999. Investigations on the bacterial flora as a potential biocontrol agent of chestnut weevil, *Curculio elephas* (Coleoptera: Curculionidae) in Turkey. *Biologia*, 54.6.
346. YARZA, P.; YILMAZ, P.; PRUESSE, E.; GLOCKNER, F.O.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.-H.; *et al.* 2014. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology*, 2014, 12.9: 635-645.
347. YOSSA, N.; BELL, R.; TALLENT, S.; BROWN, E.; BINET, R.; HAMMACK, T. 2022. Genomic characterization of *Bacillus cereus sensu stricto* 3A ES isolated from eye shadow cosmetic products. *BMC microbiology*, 22.1: 1-10.
348. ZAHIRI, B.; FATHIPOUR, Y.; KHANJANI, M.; MOHARRAMIPOUR, S.; ZALUCKI, M. P. 2014. Alternatives to key factor analyses for assessing the population dynamics of *Hypera postica* (Coleoptera: Curculionidae). *Population Ecology*, 2014, 56: 185-194.
349. ZAVTONI, P.; VOLOȘCIUC, L.; PÂNZARU, B. 2019. Produse baculovirale în combaterea dăunătorilor în legumicultură. In: *Biotehnologii avansate-realizări și perspective*. p. 137-137.
350. ZEIGLER, D.; PERKINS, J. 2009. The Genus *Bacillus*. In: *Practical Handbook of Microbiology. 2nd edition*. Boca Raton: CRC Press, 309-338.
351. ZHANG, M.-Y.; LOVGREN, A.; LANDEN, R. 1995. Adhesion and cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* to cultured *Spodoptera* and *Drosophila* cells. *Journal of Invertebrate Pathology*, 66.1: 46-51.
352. ZHANG, X.; CANDAS, M.; GRIKO, N.; TAUSSIG, R.; BULLA, L. 2006. A

- mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103.26: 9897-9902.
353. ZHENG, X.; CONG, X.; WANG, X.; LEI, C. 2011. A review of geographic distribution, overwintering and migration in *Spodoptera exigua* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of the Entomological Research Society*, 13.3: 39-48.
354. ZHENG, Z.; ZHANG, Y.; LIU, Z.; DONG, Z.; XIE, C.; BRAVO, A., *et al.*, 2020. The CRISPR-Cas systems were selectively inactivated during evolution of *Bacillus cereus* group for adaptation to diverse environments. *The ISME Journal*, 14.6: 1479-1493.
355. ZURBOVA *et al.* Patent SU 769787. ZURABOVA, J.E.R.; RASSOMAGINA, N.A.; HAIDAPOVA, D.D.; JUDINA, T.G.; TIMON'KIN, J.U.N.; DAVYDOV, V.N.; KRUGLJAKOVA, T.P.; DERGALJUK, M.K. Shtamm-producent-jen-dotoksina. [în rusă]
356. ACULOVA *et al.*, Patent RU2179392. AKULOVA, N.I.; LOMOVSKAJA, T.F.; MOLOKVASOVA, T.S.; PAHTUEV, A.I.; CHEGODAEV, F.N. Strain of bacterium *Bacillus thuringiensis* varietas *kurstaki* vkm v-2248d used for entomopathogenic preparation preparing.

SURSE IMAGINI:

Fig. 1.1. a. *Bacillus cereus*. Sursa: A doubt, CC BY-SA 4.0, Wikimedia Commons. https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/95/Bacillus_cereus_Standard_I_col_100.jpg

Fig. 1.1. b. *Bacillus mycoides*. Sursa: Ninjatacoshell – lucrare proprie, CC BY-SA 3.0, Wikimedia Commons. <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=14829977>

Fig. 1.5. Dr. Juan Luis Jurat-Fuentes, 2021. <http://web.utk.edu/~jurat/Btresearchtable.html>

Fig. 1.6. Bravo *et al.*, 2008. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1857359/figure/F2/>

Fig. 1.7. Bravo *et al.*, 2008. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1857359/figure/F3>

Fig. 2.1. a. John Hallmén, CC BY 3.0, Wikimedia Commons. https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/9b/Byctiscus_betulae_m.jpg

Fig. 2.1. b. Siga, CC BY-SA 3.0, Wikimedia Commons. https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/61/Byctiscus_betulae_side.jpg

Fig. 2.3. a. John Hallmén, CC BY 3.0, Wikimedia Commons. https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/d2/Neocoenorrhinus_pauxillus.jpg

Fig. 2.3. b. CC BY-NC-SA 2.0 Disponibil: <https://www.flickr.com/photos/84259756@N05/36536708061>

Fig. 2.5. a. Siga, CC BY-SA 4.0, Wikimedia Commons. https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/51/Tatianaerhynchites_aequatus_up.jpg

Fig. 2.5. b. Siga, CC BY-SA 4.0, Wikimedia Commons. https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/6e/Tatianaerhynchites_aequatus_under_2.jpg

Fig. 2.7. a. Boris Loboda, https://ukrb.in.com/show_image.php?imageid=31510

Fig. 2.9. a. Udo Schmidt, CC BY-SA 2.0, Wikimedia Commons. [https://en.wikipedia.org/wiki/Phyllobius_oblongus#/media/File:Phyllobius_oblongus_\(Linnaeus_1758\)__\(3518257119\).jpg](https://en.wikipedia.org/wiki/Phyllobius_oblongus#/media/File:Phyllobius_oblongus_(Linnaeus_1758)__(3518257119).jpg)

Fig. 2.11. a. Udo Schmidt, CC BY-SA 2.0, Wikimedia Commons. [https://en.wikipedia.org/wiki/Sitona_lineatus#/media/File:Sitona_lineatus_\(Linnaeus_1758\)__\(10730525876\).png](https://en.wikipedia.org/wiki/Sitona_lineatus#/media/File:Sitona_lineatus_(Linnaeus_1758)__(10730525876).png)

Fig. 2.11. b. CC BY-SA 2.0, Wikimedia Commons. https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/8c/Sitona_lineatus_%2831650856901%29.jpg

Fig. 2.13. a. Stanislav Snäll, CC BY 3.0, Wikimedia Commons. https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/8e/Hypera_postica.jpg

Fig. 2.15. a. Udo Schmidt, CC BY-SA 2.0, Wikimedia Commons. <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=39208816>

Fig. 2.15. b. Aleksandrs Balodis, CC BY-SA 4.0, Wikimedia Commons. https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/b1/Protapion_apricans_01.JPG

Fig. 2.17. Udo Schmidt, CC BY-SA 2.0, Wikimedia Commons. https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/f0/Leptinotarsa_decemlineata_%28Say%2C_1824%29_%2814198132866%29.png

Fig. 2.19. a. Birgit E. Rhode, CC BY 4.0, Wikimedia Commons. https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/93/Helicoverpa_armigera_male.jpg

Fig. 2.19. b. Birgit E. Rhode, CC BY 4.0, Wikimedia Commons. https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/bc/Helicoverpa_armigera_female.jpg

Fig. 2.21, Dumi , CC BY-SA 3.0, Wikimedia Commons. <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=13297741>

Fig. 2.23. Daderot, CC0, via Wikimedia Commons. https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/fc/Lymantria_dispar_-_National_Museum_of_Nature_and_Science%2C_Tokyo_-_DSC07457.JPG

Anexa 1

**Clasificarea subspeciilor *B. thuringiensis* bazată pe analiza serologică
a flagelului (adaptat după Jakhar *et al.*, 2017)**

Antigenele flagelare	Subspecia <i>Bt</i>	Antigenele flagelare	Subspecia <i>Bt</i>
1	<i>thuringiensis</i>	30	<i>medellin</i>
2	<i>finitimus</i>	31	<i>toguchini</i>
3a, 3c	<i>alesti</i>	32	<i>cameroun</i>
3a, 3b, 3c	<i>kurstaki</i>	33	<i>leesis</i>
3a, 3d	<i>sumiyoshiensis</i>	34	<i>konkukian</i>
3a, 3d, 3e	<i>fukuokaensis</i>	35	<i>seoulensis</i>
4a, 4b	<i>sotto</i>	36	<i>malaysiensis</i>
4a, 4c	<i>kenyae</i>	37	<i>anadalousiensis</i>
5a, 5c	<i>galleriae</i>	38	<i>oswaldocruzi</i>
5a, 5c	<i>canadensis</i>	39	<i>brasiliensis</i>
6	<i>entomocidus</i>	40	<i>huazhongensis</i>
7	<i>aizawai</i>	41	<i>sooncheon</i>
8a, 8b	<i>morrisoni</i>	42	<i>jinghongiensis</i>
8a, 8c	<i>ostrinia</i>	43	<i>guiyanguesbus</i>
8b, 8d	<i>nigeriensis</i>	44	<i>higo</i>
9	<i>tolworthi</i>	45	<i>roskildiensis</i>
10a, 10b	<i>darmstadiensis</i>	46	<i>chanpaisis</i>
10a, 10c	<i>londrina</i>	47	<i>wratislaviensis</i>
11a, 11b	<i>toumanoffi</i>	48	<i>balearica</i>
11a, 11c	<i>kyushuensis</i>	49	<i>muju</i>
12	<i>thompsoni</i>	50	<i>navarrens</i>
13	<i>pakistani</i>	51	<i>xiaguangiensis</i>
14	<i>israelensis</i>	52	<i>kim</i>
15	<i>dakota</i>	53	<i>asturiensis</i>
16	<i>indiana</i>	54	<i>poloniensis</i>

Antigenele flagelare	Subspecia <i>Bt</i>	Antigenele flagelare	Subspecia <i>Bt</i>
17	<i>tohokuensis</i>	55	<i>palmanyolensis</i>
18a, 18b	<i>kumamotoensis</i>	56	<i>rongseni</i>
18a, 18c	<i>yosoo</i>	57	<i>pirenaica</i>
19	<i>tochigiensis</i>	58	<i>argentinensis</i>
20a, 20b	<i>yunnanensis</i>	59	<i>iberica</i>
20a, 20c	<i>pondicheriensis</i>	60	<i>pingluensis</i>
21	<i>colmeri</i>	61	<i>sylvestriensis</i>
22	<i>shandongensis</i>	62	<i>zhaodongensis</i>
23	<i>japonensis</i>	63	<i>bolivia</i>
24a, 24b	<i>neoleonensis</i>	64	<i>azorensis</i>
24a, 24c	<i>novosibirsk</i>	65	<i>pulsiensis</i>
25	<i>coreanensis</i>	66	<i>gracioensis</i>
26	<i>silo</i>	67	<i>vazensis</i>
27	<i>mexicanensis</i>	68	<i>thailandensis</i>
28a, 28b	<i>monterrey</i>	69	<i>pahangi</i>
28a, 28c	<i>jegathesan</i>	70	<i>sinensis</i>
29	<i>amagiensis</i>	71	<i>jordanica</i>

Anexa 2

Spectrul de gazde al bacteriei *Bacillus thuringiensis* în funcție de genele cry

Gazde		Familia de gene	Gena	
Ordin	Familii			
Lepidoptera	Bombycidae	Cry1	Cry1A-I	
	Erebidae	Cry1	Cry1A-I	
	Gelechiidae	Cry3	Cry32A	
	Noctuidae		Cry1	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac
			Cry2	Cry2Aa, Cry2Ab
	Lasiocampidae	Cry1	Cry1A-I	
	Plutellidae		Cry2	Cry2Aa
			Cry7	Cry7B
	Pyralidae	Cry8	Cry8D	
	Tortricidae		Cry1	Cry1Ac, Cry1Ca, Cry1Ba
			Cry2	Cry2Aa
			Cry9	Cry9Aa, Cry9Ca, Cry9A-C, Cry9E
			Cry15	Cry15A
	Coleoptera	Brentidae	Cry7	Cry7Aa
Cry22			Cry22Ab	
Cerambycidae			Cry1	Cry1Aa, Cry1Ba,
			Cry3	Cry3Aa, Cry3Bb
Chrysomelidae			Cry1	Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ba,
			Cry2	Cry2Aa
			Cry3	Cry3Aa, Cry3Bb, Cry3Ca
			Cry6	Cry6Aa
			Cry7	Cry7Aa, Cry7Ab
			Cry8	Cry8Aa, Cry8Ba, Cry8Ca
			Cry9	Cry9Bb
			Cry15	Cry15Aa
			Cry22	Cry22Ab, Cry22Ba
	Cry34		Cry34Aa, Cry34Ab, Cry34B	

Gazde		Familia de gene	Gena	
Ordin	Familii			
	Coccinellidae	Cry35	Cry35Aa, Cry35Ba/34Ba	
		Cry1	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Aj	
	Curculionidae	Cry2	Cry2Aa, Cry2Ab,	
		Cry6	Cry6Aa, Cry6Ba	
		Cry7	Cry7Aa	
	Nitidulidae	Cry10	Cry10Aa	
		Cry2	Cry2Ab	
	Scarabaeidae	Cry1	Cry1Ab, Cry1Ac,	
		Cry3	Cry3Aa	
		Cry8	Cry8Aa, Cry8Ab, Cry8Ba, Cry-8Ca, Cry8Da,	
		Cry18	Cry18Aa	
	Tenebrionidae	Cry1	Cry1Aa, Cry1Ac, Cry1Ba, Cry1Ca, Cry1Da, Cry1Ea, Cry1Fb,	
		Cry3	Cry3Aa, Cry3Bb, Cry3Ca	
		Cry8	Cry8Aa, Cry8Ab, Cry8Ca,	
		Cry9	Cry9Da	
		Cry14	Cry14Aa	
		Cry22	Cry22Aa	
		Cry34	Cry34Ab/35Ab	
	Diptera	Culicidae	Cry2	Cry2Aa, Cry2Ab, Cry2Ac, Cry2Ag, Cry2Am
			Cry4	Cry4Aa, Cry4Ba, Cry4Cb
Cry10			Cry10Aa	
Cry11			Cry11Aa, Cry11Ba, Cry11Bb	
Cry16			Cry16A	
Cry19			Cry19A, Cry19B	
Cry20			Cry20A	
Cry24			Cry24Ca	
		Cry27	Cry27Aa	

Gazde		Familia de gene	Gena
Ordin	Familii		
		Cry39	Cry39Aa
		Cry44	Cry44Aa
	Chironomidae	Cry4	Cry4Ba,
		Cry11	Cry11Aa,
	Simuliidae	Cry4	Cry4Aa, Cry4Ba
		Cry11	Cry11Aa,
	Tephritidae	Cry2	Cry2Ab
	Tipulidae	Cry4	Cry4Ba,
		Cry11	Cry11Aa,
	Hemiptera	Cicadellidae	Cry2
Cry3			Cry3A
Miridae		Cry2	Cry2A
		Cry5	Cry5A
Pseudococcidae	Cry11	Cry11A	
Hymenoptera	Apidae	Cry3	Cry3A
	Formicidae	Cry22	Cry22A
	Pamphiliidae	Cry5	Cry5Ac

Surse: Turnbull, 1996; Garcia-Robles *et al.*, 2001, Wei *et al.*, 2003, Palma *et al.*, 2014, Tian *et al.*, 2017, Crickmore *et al.*, 2018; Valtierra de Luis *et al.*, 2020; Plata-Rueda *et al.*, 2020.

Com. 10441
Întreprinderea de Stat Firma Editorială Poligrafică
„Tipografia Centrală”
MD-2068, Chișinău, str. Florilor, 1