

NEMATOZII ENTOMOPATOGENI – MIJLOC DE COMBATERE BIOLOGICĂ A DĂUNĂTORILOR

Neamțu Anastasia, *Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor a AȘM*

The interest for entomopathogenic nematodes increases every year and they are used worldwide as a biological mean for plant protection against pests. The aim of our research is the assay of the most effective isolates of nematodes on the territory of our country and to determine the most effective and inexpensive way of their rearing in order to implement entomopathogenic nematodes in integrated systems for plant protection.

INTRODUCERE

Dăunătorii plantelor sunt acei reprezentanți ai regnului animal care se hrănesc consumând diverse organe ale acestora sau sug seva lor, provocând daune cantitative și calitative recoltelor. Insectele sunt cea mai răspândită grupă de dăunători ai plantelor, cuprinzând aproape 90% din numărul speciilor dăunătoare. Anual, în rezultatul activității dăunătorilor sunt pierdute aproximativ 20% din recolta globală. Insectele pot vătăma diverse organe ale plantelor, atât supraterestre, cât și subterane. Modul de vătămare este diferit, în funcție de conformația aparatului digestiv al insectelor.

După datele statistice, obținute în cadrul FAO, pierderile anuale de recolte pe plan mondial, cauzate de dăunători, boli și buruieni, se evaluează la 35-40% din producția agricolă potențială, sau 54-60% din producția reală.

Estimarea valorică a pierderilor anuale pe glob este de peste 80-100 miliarde dolari din producția agricolă potențială. Din aceste pierderi, cca 29-32 miliarde de dolari, sau 12-15% revin activității dăunătorilor [1].

Utilizarea extensivă a pesticidelor în tehnologia producției produselor agricole, în special a insecticidelor, a contribuit la apariția unor efecte adverse ca: rezistența lor la acțiunea insecticidelor, eliminarea faunei utile din agrobiocenoză, acumularea reziduurilor în produsele alimentare și în sol, fapt care a dus la necesitatea elaborării metodelor alternative de combatere a dăunătorilor.

În legătură cu aceasta a crescut în mod considerabil și interesul pentru nematozii entomofili, din familiile Steinernematidae și Heterorhabditidae.

Nematozii entomopatogeni sunt viermi cilindrici, paraziți obligați care atacă insectele. Dimensiunile lor variază între 1-2mm la genurile *Steinernema spp.* și *Heterorhabditis spp.* și până la 15 cm la reprezentanții familiei Mermittidae.

Sunt specii care conviețuiesc simbiotic cu bacteriile genului *Xenorhabdus spp.* în cazul genului *Steinernema spp.* și *Photorhabdus spp.* pentru *Heterorhabditis spp.* respectiv (fig. 1).

Photorhabdus-Heterorhabditis

Xenorhabdus-Steinernema

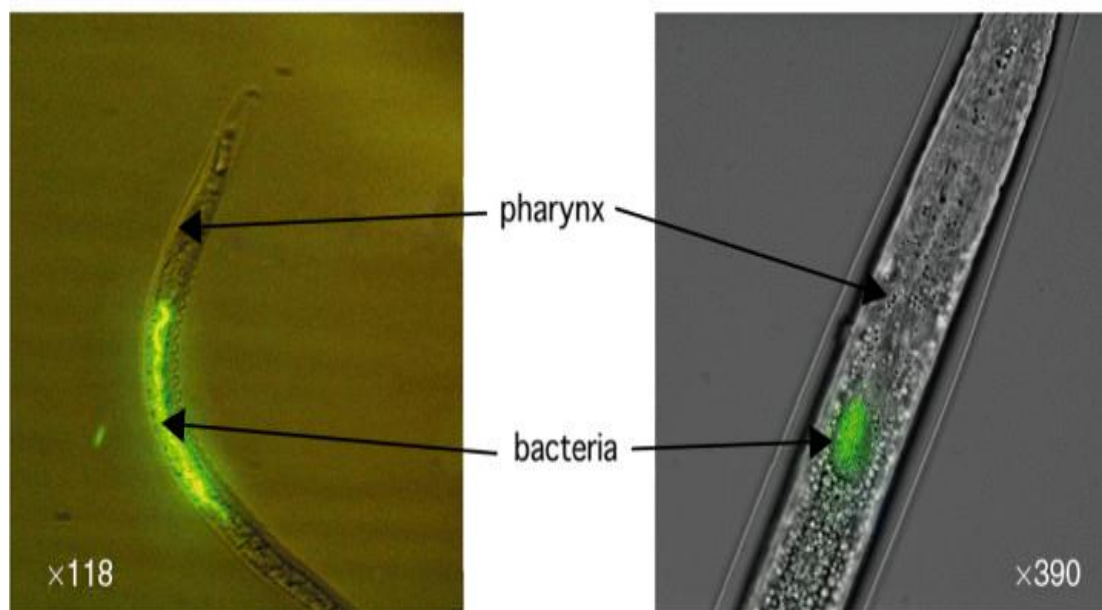


Fig. 1. Particularitățile structurale ale nematozilor entomopatogeni, care determină relațiile lor cu bacteriile simbiote amplasate în intestinul acestora. (Heidi Goodrich-Blair, 2007 [2]).

Avantajele utilizării nematozilor entomopatogeni ca mijloc de protecție a plantelor constau în faptul că nematozii entomopraziți sunt unici entomopatogeni cu o gamă foarte largă de gazde, care include majoritatea ordinelor și familiilor de insecte; producerea în masă a nematozilor se poate realiza pe medii solide artificiale sau pe medii lichide; astfel încât nematozii sunt organisme biologice adaptabile, populațiile naturale de insecte nu reușesc să obțină imunitate împotriva lor; ei nu manifestă efecte adverse la plante și sunt inofensivi pentru mamifere și om, lucrul cu nematozii nu necesită echipament special; compatibilitatea chimică relativă (mancozeb, piretroizi) a steinernematidelor oferă posibilitatea aplicării combinate a nematozilor și pesticidelor în procesul combaterii dăunătorilor; prin urmare, acești nematozi sunt agenți de perspectivă din punct de vedere biologic, ecologic și comercial.

În conformitate cu rezultatele testelor de stat (anii 1993-2003) fost stabilită o eficacitate biologică împotriva următoarelor tipuri de dăunători agricoli (L.G. Danilov) [3]: tripsi - 86-98%; greieri a 4 zi - 77,9% în ziua 30-100%; muștele miniere - 80-90%; gărgărițe - 64-100%); pe ciuperci împotriva țânțarilor la ciuperci - 60-90%, sârmari la cartofi și porumb - 97,9%, muștele la varza - 60-90%, viermele merelor și a prunelor - 80-100%, larvele gândacului din Colorado la cartofi - 80%, musca cireșelor - 85%, musca la cătină 93-100%, coropișnița - 80%, larvele cărăbușilor (melolonta) - 70-90%, ploșnița cerealelor - 60%, lăcuste - 75%.

Vyas R. V. ș.a. [4] au înregistrat mortalitatea a 75% de larve de *Helicoverpa armigera*, la aplicarea a 2000 ij/vas vegetativ de *Steinernema glasseri*, la a 6-ea zi de la aplicare.

Jothi B. D. și Metha U. K. [5] au obținut 100% mortalitate a LIII-LV de *Helicoverpa armigera* la aplicarea a 40 ij/larvă a *S. glasseri*.

Nguyen K. B. și Hunt D. J. [6] mortalitatea a 100% a LIV de *Helicoverpa armigera* a survenit la doza de 75 ij/larvă a *Heterorhabditis indica* la 72h de la expunere.

Hussain M. A. și Ahmad W. [7] mortalitatea larvelor de *Helicoverpa armigera* de diferite vârste a variat LIII- LIV - 74-75% respectiv, LV- 66% și LIII- 43%, după aplicarea 25-150 ij/larvă a *Steinernema masoodi*.

Vinay K. ș.a. [8] au determinat susceptibilitatea larvelor de lepidoptere la atacul *Steinernema thermophilum*, bazat pe determinarea LC50 după 36 h de la aplicare *Galleria mellonella* (LC50 = 16.28 IJ/larva), *Spodoptera litura* (LC50 = 85 IJ/larva), *Helicoverpa armigera* (LC50 = 54.68 IJ/larva). Pe lângă virulența față de stadiul larvar, pentru prima dată a fost determinată și acțiunea ovicidă care a prezentat 84% la doza de 200 IJ/50 și 100 ouă de *H. armigera* și *S. litura* respectiv (fig. 2).

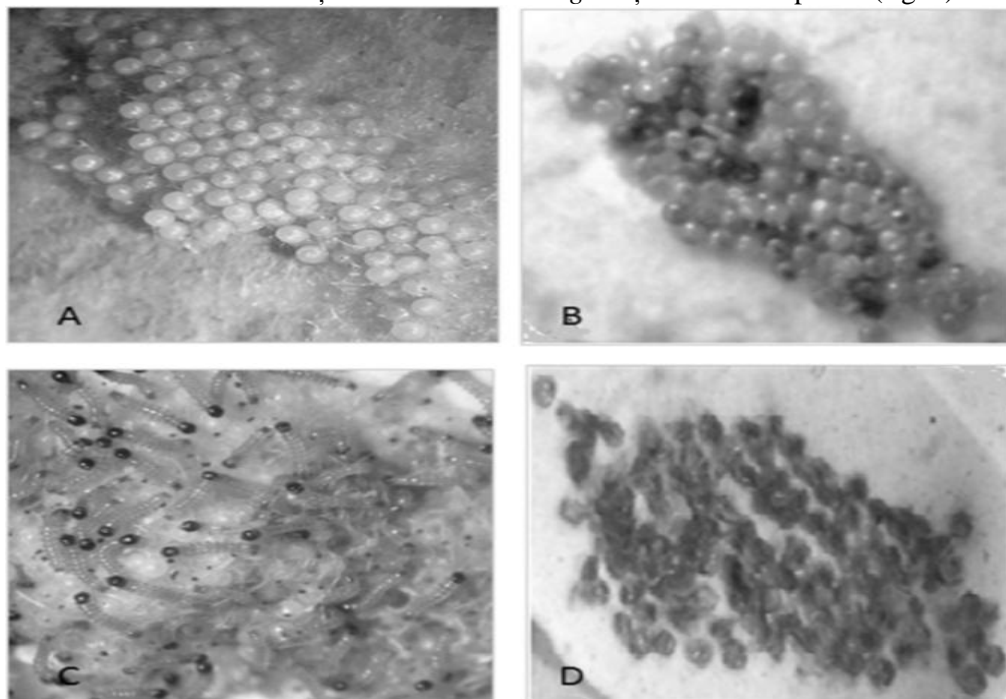


Fig. 2. Acțiunea ovicidă a speciei *Steinernema thermophilum* împotriva ouălor de *Spodoptera litura* A. Control după 24 ore. B. Tratament după 24 ore. C. Control după 96 ore. D. Tratament după 96 ore (Vinay K. ș.a., 2014).

În Republica Moldova nematozii entomopatogeni se întâlnesc în condiții naturale și pot fi utilizați în combaterea dăunătorilor. Aceste specii de nematozi sunt capabile de a infesta numeroase specii de dăunători din diverse ordine. Ei sunt activi la temperaturi cuprinse între +10+30°C, atacând toate stadiile de dezvoltare, cu excepția stadiului de ou. Cu toate că, această categorie de nematozi ar putea deveni un mijloc de combatere a insectelor dăunătoare culturilor agricole, silvice și ornamentale a Moldovei, componența specifică a lor și a gazdelor lor nu este studiată în profunzime [9]. Producerea în masă și utilizarea pe scară largă a nematozilor entomopatogeni în combaterea dăunătorilor culturilor agricole ia anvergură și este în permanentă creștere. Ea are loc prin metoda *in vitro*, însă această metodă are unele dezavantaje și unul dintre ele ar fi diminuarea activității biologice a nematozilor în rezultatul reproducerii continue prin această metodă. Studiul efectuat de către Turișin V. [10], arată că cultivarea complexului nematod-bacterie pe parcursul a 20 de pasaje a afectat nesemnificativ activitatea de invazie a nematozilor. La cultivarea nematozilor *in vitro*, după 1-20 de pasaje, rata nematozilor activi, capabili de a infesta gazda, a constituit 45-55%, iar în rezultatul a 40 de pasaje această rată nu a depășit 28%.

În acest context, noi ne-am propus determinarea posibilității ieftinirii producerii gazdei de laborator a nematozilor entomopatogeni (molia mare a cerii) și identificarea gazdelor alternative, pentru care există linii de producere în masă, în scopul înmulțirii nematozilor entomopatogeni.

MATERIALE ȘI METODE

Utilizarea nematozilor entomopatogeni în combaterea dăunătorilor culturilor agricole presupune înmulțirea în masă a lor. În condiții de laborator ei pot fi înmulțiți *in vivo* și *in vitro*. La înmulțirea *in vitro* este necesară utilizarea utilajului microbiologic special pentru înmulțirea bacteriei simbiote și instalații pentru înmulțirea nematozilor. La înmulțirea nematozilor *in vivo* este necesară înmulțirea insectelor gazde.

În practica de laborator, de regulă, în acest scop este utilizată molia mare a cerii (*Galleria mellonella*). Ea poate fi ușor înmulțită, nu are diapauză obligată, iar dezvoltarea ei constituie un ciclu continuu și reprezintă o gazdă excelentă pentru reproducerea nematozilor fiind foarte susceptibilă atacului lor. Însă, costul larvelor obținute în condiții de laborator este destul de mare, grație componentelor ale mediului costisitoare (miere, ceară, glicerină) și lipsei de utilaj pentru producerea în masă a gazdei date.

În legătură cu aceasta, prezintă interes ieftinirea mediului nutritiv pentru înmulțirea galeriei și determinarea posibilității utilizării altor gazde ce sunt lipsite de aceste lacune. În legătură cu cele expuse mai sus a fost realizate următoarele experiențe:

1. Înmulțirea gazdei de laborator – molia mare a cerii, în vederea ieftinirii mediului nutritiv pentru creșterea ei. În acest scop am recurs la înlocuirea mierii cu sirop de sorg.

Mediul a fost constituit din următoarele componente: Tărâțe – 150g; Făină de porumb – 150g; Ceară utilizată – 380g; Glicerină – 200g; Miere – 120g; Sirop de sorg – 120 și 240g.

2. A fost realizată experiența cu privire la nivelul de infestare a moliei mari a cerii, obținută pe baza mediului nutritiv modificat, cu nematozi entomopatogeni. Procesul de infestare s-a efectuat în condiții de laborator, utilizându-se larve de ultima vârstă de *Galleria mellonella*, conform metodei lui Poinar G. [11]. Pentru infestare a fost utilizată specia de nematozi – *Steinernema feltiae*. Au fost testate trei doze de infestare de 10, 20 și 30 nematozi per larvă. Suspensia de nematozi a fost răspândită pe suprafața plăcii Petri ce conținea hârtia de filtru umețată cu apă distilată. Plăcile Petri ulterior au fost amplasate la temperatură de 25°C. Pentru fiecare variantă au fost luate câte trei repetiții. La a 7-ea zi de la infestare larvele cu simptome evidente de atac au fost transferate pe cursele White.

3. A fost determinată posibilitatea înmulțirii nematozilor entomoparaziți pe larve de molia cerealelor, gazdă care ar permite producerea în masă a nematozilor, *in vivo*. Infestarea larvelor de molia cerealelor a fost efectuată în condiții de laborator utilizând metoda propusă de Poinar G. [11].

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Nivelul maxim de productivitate a nematozilor entomopatogeni poate ajunge la 200 000 de juvenile de infecție la o larvă de ultima vârstă a moliei cerii, fapt valabil pentru specia *Steinernema feltiae* [12] și 350 000 la specia *Heterorhabditis bacteriophora* [13].

În cazul nostru, masa de nematozi a fost produsă pe baza gazdei de laborator obținută prin metoda modificată de înmulțire și creștere a acesteia. În vederea ieftinirii procesului de producere a moliei cerii s-a recurs la excluderea din componența mediului nutritiv a unor elemente costisitoare ca laptele praf, iar ceara a fost înlocuită cu ceară utilizată la producerea mierii, la fel a fost exclusă făina de

grâu. A fost determinată productivitatea speciilor de nematozi entomopatogeni *Steinernema feltiae* și *Heterorhabditis bacteriophora*, fiind utilizat mediul nutritiv modificat pentru producerea gazdei de laborator a nematozilor. La determinarea influenței tipului de mediu asupra greutatea corpului larvelor de molia mare a cerei s-a constatat că greutatea corpului larvei de ultima vârstă de molia mare a cerei a variat între 200- 225mg în varianta cu 120g miere și 180-215mg în varianta cu sirop de sorg. Prin urmare, s-a conchis că mediul nutritiv este tehnologic, își păstrează calitățile nutritive pe tot parcursul dezvoltării generației, fapt care asigură un randament sporit al obținerii nematozilor pe gazda crescută în condiții artificiale.

Noi am stabilit că productivitatea nematozilor entomopatogeni (*Heterorhabditis bacteriophora*) diferă de la gazdă la gazdă și prezintă, de exemplu, la *Galleria mellonella* 500ji/mg de substanțe nutritive, 700ji/mg la *Sitotroga cerealella* și aproximativ 400ij/mg la *Ephestia kuehniella*. Datele obținute denotă interesul pentru aceste gazde în aspectul utilizării lor în procesul de înmulțire în masă a nematozilor entomopatogeni, de aceea vom continua cercetările în această direcție.

CONCLUZII:

Pentru utilizarea largă a nematozilor entomopatogeni mai rămân nesoluționate un șir de probleme:

1. Asigurarea regimului termic și hidric adecvat pentru supraviețuirea și activitatea lor.
2. Depășirea sensibilității la acțiunea razelor UV.
3. Efectul letal al unor pesticide (nematocide, fumiganți ș.a.).
4. Influența letală sau restrictivă a proprietăților solului (salinitatea înaltă, pH) [14].
5. Aprofundarea cercetărilor în aspectul elucidării integrale sau parțiale ale acestor impedimente, ce limitează aspectul aplicativ al nematozilor entomopatogeni, vor duce nemijlocit la ameliorarea procesului de producere, perfecționarea habitatului și sporirea eficienței și spectrului de aplicare a acestor agenți în sistemele de protecției integrată a culturilor agricole dar și în spațiile forestiere și de agrement.

Bibliografie:

1. Busuioc, M. *Entomologie agricolă*. Chișinău, 2006. 639 p.
2. Heidi, G.B.; David, J. Clarke. *Mutualism and pathogenesis*. In: Xenorhabdus and Photorhabdus: two roads to the same destination. In: Molecular microbiology, 2016, 64(2), pp. 260-268.
3. <http://www.biodan.ru/biodan-1.html>, data vizitei 31.05.2017.
4. Vyas, R.V.; Patel, N.B.; Yadav, P.; Ghelani, Y.H.; Patel, D.J. *Performance of entomopathogenic nematodes for management of gram pod borer, Helicoverpa armigera*. In: Ann Plant Prot Sci, 2003, 11, pp. 107–109.
5. Jothi, B.D.; Mehta, U.K. *Pathogenicity of three species of EPN against cotton bollworm Helicoverpa armigera*. In: Hub. Entomon, 2006, 31, pp. 259–266.
6. Nguyen, K.B.; Hunt, D.J. (eds). *Entomopathogenic nematodes: systematics, phylogeny and bacterial symbionts*, vol V. Brill, Leiden-Boston, 2007. 816 p.
7. Hussain, M.A.; Ahmad, W. *Management of Helicoverpa armigera by entomopathogenic nematodes*. Lambert Academic Publishing GmbH & Co. KG, Saarbrücken, 2011. 168 p.
8. Vinay, K.; Garima, Sh.; Shapiro-Ilan, I.; Sudershan, G. In: *Biocontrol Potential of Steinernema thermophilum and Its Symbiont Xenorhabdus indica Against Lepidopteran Pests*: In: Virulence to Egg and Larval Stages Journal of Nematology 46(1), 2014, pp. 18–26.
9. Gebremichael Gebremariam Agago, Batco A., Gaugler R., Chuon B. N. *Entomopathogenic nematode distribution in the soil of Moldova*. În: *Lucrări științifice*, vol. 14, Materialele Conferinței Științifice Internaționale „Realizări și perspective în horticultură, viticultură, și silvicultură” dedicată aniversării a 65 de ani de la fondarea Facultății de Horticultură, Chișinău, 2005.
10. Турицин, В. *Экологические особенности реализации биологической активности энтомопатогенных нематод (Nematoda: Steinernematidae) для контроля численности вредных насекомых*. Автореферат. Санкт-Петербург, 2010. 19 с.
11. Poinar, G. 1979. *Nematodes for biological control of insects*. Florida, CRC Press.
12. Dutky, S.; Thompson, J.; Cantwell, G. 1964. *A technique for the mass propagation of the DD-136 nematode*. In: Insect pathology. 6, p. 417.
13. Milstead, J.; Poinar, G. 1978. *A new entomogenous nematode for pest management systems*. In: Agriculture, 32, p. 12.
14. Gozel, U. and Gozel, C. 2016. *Entomopathogenic Nematodes in Pest Management in Agricultural and Biological Sciences, Integrated Pest Management: Environmentally Sound Pest Management*, <https://www.intechopen.com/books/integrated-pest-management-ipm-environmentally-sound-pest-management/entomopathogenic-nematodes-in-pest-management>, data vizitei 31.05.2017.