

UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRONOMICE ȘI
MEDICINĂ VETERINARĂ BUCUREȘTI

TEZĂ DE DOCTORAT

CERCETĂRI PRIVIND PRODUCEREA UNUI
PREPARAT PE BAZĂ DE BACULOVIRUSURI
PENTRU COMBATEREA INSECTEI *Hyphantria cunea*
Drury (LEPIDOPTERA-ARCTIIDAE)

Conducător științific,
Prof. Univ. Asociat Dr. Doc. Pop V. Ioan

Doctorand,
Maria IAMANDEI

BUCUREȘTI
2005

CUPRINS

	Pagina
INTRODUCERE	6
STADIUL CUNOAȘTERII PRIVIND UTILIZAREA PREPARATELOR PE BAZĂ DE VIRUSURI ÎN SCOPUL LIMITĂRII DENSITĂȚII POPULAȚIILOR DE INSECTE DĂUNĂTOARE	11
CONTRIBUȚII PROPRII	
MATERIALUL ȘI METODA DE CERCETARE	48
1. ÎNMULȚIREA ÎN MASĂ A SPECIEI <i>Hyphantria cunea</i> Drury	48
1.1. SELECTIA ADULȚILOR DE <i>Hyphantria cunea</i> Drury	48
1.1.1. Stabilirea parametrilor de bază necesari pentru selecția adulților	48
1.1.2. Stabilirea prolificității, modului și duratei de depunere a ponteii, la femelele colectate din câmp precum și la femelele obținute prin creșteri în condiții de laborator	49
1.1.3. Selectarea celei mai avantajoase modalități de creștere	49
1.1.4. Controlul calității materialului biologic (verificarea conformității parametrului prolificitate cu cerințele impuse în creșterile de insecte).	50
1.2.: COLECTAREA PONTELOR ȘI DEPUNEREA PE MEDIUL DE CREȘTERE A LARVELOR DE <i>H. cunea</i>	52
1.2.1. Stabilirea duratei incubației și viabilității ouălor la populația de <i>H. cunea</i> colectată din câmp	52
1.2.2. Stabilirea duratei incubației și viabilității ouălor la lotul de <i>H. cunea</i> crescut în condiții de laborator	53
1.2.3. Stabilirea influenței temperaturii din camera de incubație asupra duratei incubației precum și momentul propice pentru transferul larvelor de <i>H. cunea</i> pe substratul de creștere	53
1.2.4. Controlul calității materialului biologic (verificarea conformității parametrului fertilitate a ouălor cu cerințele impuse în creșterile de insecte	53
1.3. CREȘTEREA LARVELOR DE <i>H. cunea</i>	54
1.3.1 Stabilirea spectrului trofic al larvelor speciei <i>H. cunea</i>	54
1.3.2 Selectarea mediului de creștere și stabilirea duratei dezvoltării larvare în condițiile creșterii pe medii artificiale comparativ cu creșterea pe hrană naturală	55
1.3.3. Estimarea randamentului de creștere a larvelor de <i>H. cunea</i>	58
1.4. CERCETĂRI ASUPRA STADIULUI DE CRISALIDĂ	65
1.4.1 Stabilirea modalității de colectare și menținere a crisalidelor	65
1.4.2 Stabilirea duratei stadiului de crisalidă	65
1.4.3. Stabilirea viabilității crisalidelor	69
1.5. CERCETĂRI ASUPRA STADIULUI DE ADULT LA SPECIA <i>H. cunea</i>	69

1.5.1 Stabilirea duratei de viață a adulților proveniți din creșterile pe medii artificiale și a adulților obținuți prin creșterea larvelor pe hrană naturală	69
1.5.2 Cercetări privind metoda de creștere a adulților de <i>H. cunea</i> în condiții controlate	70
2. OBȚINEREA BIOMASEI VIRALE	71
2.1. INFECTAREA LARVELOR DE <i>H. cunea</i>	71
2.1.1 Selecția baculovirusului ce urmează să constituie substanța activă	71
2.2 SUPRAVEGHEREA APARIȚIEI EPIDEMIEI ÎN CADRUL POPULAȚIILOR LARVARE DE <i>H. cunea</i>	72
2.2.1. Stabilirea stadiului propice pentru infectare a larvelor	72
2.2.2. Stabilirea limitelor mortalității larvare datorate infecției cu baculovirusuri	74
2.3. COLECTAREA LARVELOR VIROZATE	75
2.3.1 Stabilirea momentului propice pentru colectarea larvelor moarte respectiv infectate cu baculovirusuri	75
2.3.2 Stabilirea metodei de colectare a larvelor	75
2.3.3. Evidențierea procesului infecțios	76
2.4 PĂSTRAREA LARVELOR VIROZATE	76
2.4.1 Stabilirea metodei de păstrare a larvelor virozate	76
CONDIȚIONAREA SUBSTANȚEI ACTIVE	77
3.1. OMOGENIZAREA MATERIALULUI BIOLOGIC ȘI IZOLAREA INCLUZIILOR VIRALE	77
3.2. PURIFICAREA INCLUZIILOR VIRALE	77
3.3. DETERMINAREA CONCENTRAȚIEI BACULOVIRUSURILOR ÎN SUSPENSIA VIRALĂ	81
3.4. CONDIȚIONAREA FINALĂ A SUBSTANȚEI ACTIVE	82
4. CONDIȚIONAREA PREPARATULUI	87
5. CONTROLUL CALITĂȚII PREPARATULUI	89
5.1. Cercetări privind identitatea tulpinii de baculovirus cu cea inițială	89
5.2. Cercetări privind activitatea biologică a biopreparatului	89
6. TESTAREA BIOPREPARATULUI ÎN CONDIȚII DE CÂMP	91
6.1. Cercetări privind activitatea biologică a biopreparatului	91
REZULTATELE CERCETĂRIILOR	
1. REZULTATELE CERCETĂRIILOR PRIVIND ÎNMULȚIREA ÎN MASĂ A SPECIEI <i>Hyphantria cunea</i> Drury	93
1.1. SELECȚIA ADULȚILOR DE <i>Hyphantria cunea</i> Drury	93
1.1.1. Stabilirea parametrilor de bază necesari pentru selecția adulților	93
1.1.2. Stabilirea prolificității, modului și duratei de depunere a pontei, la femelele colectate din câmp precum și la femelele obținute prin creșteri în condiții de laborator	96
1.1.3. Selectarea celei mai avantajoase modalități de creștere	101
1.1.4. Controlul calității materialului biologic (verificarea conformității parametrului prolificitate cu cerințele impuse în creșterile de insecte).	101

1.2.: COLECTAREA PONTELOR ȘI DEPUNEREA PE MEDIUL DE CREȘTERE A LARVELOR DE <i>H. cunea</i>	103
1.2.1. Stabilirea duratei incubației și viabilității ouălor la populația de <i>H. cunea</i> colectată din câmp	103
1.2.2. Stabilirea duratei incubației și viabilității ouălor la lotul de <i>H. cunea</i> crescut în condiții de laborator	104
1.2.3. Stabilirea influenței temperaturii din camera de incubație asupra duratei incubației precum și momentul propice pentru transferul larvelor de <i>H. cunea</i> pe substratul de creștere	105
1.2.4. Controlul calității materialului biologic (verificarea conformității parametrului fertilitate a ouălor cu cerințele impuse în creșterile de insecte	105
1.3. CREȘTEREA LARVELOR DE <i>H. cunea</i>	107
1.3.1 Stabilirea spectrului trofic al larvelor speciei <i>H. cunea</i>	107
1.3.2 Selectarea mediului de creștere și stabilirea duratei dezvoltării larvare în condițiile creșterii pe medii artificiale comparativ cu creșterea pe hrană naturală	124
1.3.3. Estimarea randamentului de creștere a larvelor de <i>H. cunea</i>	128
1.4. CERCETĂRI ASUPRA STADIULUI DE CRISALIDĂ	132
1.4.1 Stabilirea modalității de colectare și menținere a crisalidelor	132
1.4.2 Stabilirea duratei stadiului de crisalidă	132
1.4.3. Stabilirea viabilității crisalidelor	133
1.5. CERCETĂRI ASUPRA STADIULUI DE ADULT LA SPECIA <i>H. cunea</i>	135
1.5.1 Stabilirea duratei de viață a adulților proveniți din creșterile pe medii artificiale și a adulților obținuți prin creșterea larvelor pe hrană naturală	135
1.5.2 Cercetări privind metoda de creștere a adulților de <i>H. cunea</i> în condiții controlate	135
2. REZULTATELE CERCETĂRILOR PRIVIND OBTINEREA BIOMASEI VIRALE	138
2.1. INFECTAREA LARVELOR DE <i>H. cunea</i>	138
2.1.1 Selecția baculovirusului ce urmează să constituie substanța activă	138
2.2 SUPRAVEGHEREA APARIȚIEI EPIDEMIEI ÎN CADRUL POPULAȚIILOR LARVARE DE <i>H. cunea</i>	138
2.2.1. Stabilirea stadiului propice pentru infectare a larvelor	138
2.2.2. Stabilirea limitelor mortalității larvare datorate infecției cu baculovirusuri	142
2.3. COLECTAREA LARVELOR VIROZATE	143
2.3.1 Stabilirea momentului propice pentru colectarea larvelor moarte respectiv infectate cu baculovirusuri	143
2.3.2 Stabilirea metodei de colectare a larvelor	144
2.3.3. Evidențierea procesului infecțios	146
2.4 PĂSTRAREA LARVELOR VIROZATE	146
2.4.1 Stabilirea metodei de păstrare a larvelor virozate	146

3. REZULTATELE CERCETĂRILOR PRIVIND CONDIȚIONAREA SUBSTANȚEI ACTIVE	148
3.1. OMOGENIZAREA MATERIALULUI BIOLOGIC ȘI IZOLAREA INCLUZIILOR VIRALE	148
3.2. PURIFICAREA INCLUZIILOR VIRALE	148
3.3. DETERMINAREA CONCENTRAȚIEI BACULOVIRUSURILOR ÎN SUSPENSIA VIRALĂ	152
3.4. CONDIȚIONAREA FINALĂ A SUBSTANȚEI ACTIVE	152
4. REZULTATELE CERCETĂRILOR PRIVIND CONDIȚIONAREA PREPARATULUI	156
5. REZULTATELE CERCETĂRILOR PRIVIND CONTROLUL CALITĂȚII PREPARATULUI	158
5.1. Cercetări privind identitatea tulpinii de baculovirus cu cea inițială	158
5.2. Cercetări privind activitatea biologică a biopreparatului	160
6. REZULTATELE CERCETĂRILOR PRIVIND TESTAREA BIOPREPARATULUI ÎN CONDIȚII DE CÂMP	162
6.1. Cercetări privind activitatea biologică a biopreparatului	162
CONCLUZII FINALE	164
Bibliografie	174

INTRODUCERE

Programele de control biologic, chiar și cele bazate pe implementarea unor agenți microbiologici în controlul insectelor dăunătoare au ca deziderat major reducerea folosirii insecticidelor chimice clasice, ca mijloace de protecție a plantelor, în primul rând din cauza lipsei specificității acestora pentru dăunătorul țintă, iar în al doilea rând datorită efectelor negative asupra omului și a altor categorii de organisme.

Programul de cercetare propus de către noi conduce la identificarea și dezvoltarea unei alternative de a integra un Baculovirus apărut în mod natural într-o populație de insecte dăunătoare într-un biopreparat stabil, sigur și eficient în controlul speciei „țintă”.

Baculovirusurile sunt virusuri patogene exclusiv la nevertebrate, în special la insecte, unde sunt citate la mai mult de 3.000 de specii, la care provoacă epizootii naturale contribuind la reglarea densității populațiilor acestora.

Pagubele produse de către artropode producției agricole se cifrează la nivel global între 12,2 și 20%, uneori chiar mai mult în țările în curs de dezvoltare (Oerke și colab., 1994; Agrios, 1997). Aceste pierderi nu pot fi limitate fără costuri imense impuse de folosirea abuzivă a substanțelor chimice fitosanitare.

Toate aceste considerente, pe lângă problemele legate de costul ridicat al forței de muncă în producerea și aplicarea pesticidelor, efectele nedorite asupra organismelor nețintă cât și preocupările pentru calitatea mediului, a vieții și a sănătății umane, au generat și au accelerat interesul pentru elaborarea unor noi alternative de control bazate pe produse naturale și agenți de control biologic.

Întrucât baculovirusurile au atras atenția asupra propriilor calități încă de la descoperirea lor, multe dintre ele au fost studiate ca potențiali agenți biologici de control al populațiilor de lepidoptere dăunătoare. Unele dintre trăsăturile importante evidențiate le recomandă pentru folosirea lor integrată în programe de management

integrat de control. Cercetările recente sunt focalizate pe trei direcții principale în special legate de minimizarea unor limite ale acțiunii acestor virusuri:

- persistența redusă în mediul înconjurător în special fiind anihilate de acțiunea razelor UV;
- elaborarea unor metode eficiente și economice de producere în masă a unei cantități mari de produs viral, prin mărirea randamentului creșterii în masă a gazdei naturale;
- găsirea căilor de mărire a vitezei de acțiune a baculovirusurilor și de sporire a virulenței acestora.

Sistemele de producție virală cunoscute se bazează pe producerea în masă a particulelor virale pe două căi:

- prin creșterea în masă a larvelor gazdă și infectarea lor cu inocul viral în faza maximă a producției de biomasă (sistemul „*in vivo*”);
- prin creșterea în masă, în tancuri speciale, pe linii celulare colectate de la gazda specifică sau de la o altă specie (sistemul „*in vitro*”).

Ambele sisteme au avantajele și dezavantajele lor, discuțiile și cercetările legate de un anumit sistem sau altul de producere sunt controversate, deși pe ambele căi s-au obținut rezultate notabile.

Primele încercări ale sistemului „*in vivo*” au constat în acumularea de biomasă larvară prin creșterea larvelor pe gazda naturală, ceea ce nu exclude posibilitatea contaminării microbiene (Elmore și colab., 1961; Heimpel și colab., 1966). Având în vedere și faptul că insectele erau colectate în apă pentru a permite descompunerea, iar singura procesare era omogenizarea „ușoară” a acestui amestec, nu era exclusă prezența multor altor contaminanți. Primele complicații au apărut în momentul când s-a încercat standardizarea acestor tipuri de biopreparate și era identificată prezența unei alte specii de virus, nu întotdeauna cu acțiune sinergică.

O etapă de progres pe calea producerii „*in vivo*” a fost marcată de succesele înregistrate în perfecționarea dietelor semisintetice de creștere (Vanderzant și colab.,

1962), care au permis nu numai eliminarea plantei gazdă, ci și posibilitatea creșterii pe scară largă de artropode utile.

Prin producerea în masă „*in vivo*”, primul biopreparat viral a fost obținut la specia de noctuid *Mamestra brassicae* care a fost crescută pe mediu artificial. Notabile în această direcție au fost și cercetările desfășurate de Ignoffo în 1964 și 1965 având ca rezultat final producerea pe scară largă și complet mecanizat a unui biopreparat pe baza unui baculovirus obținut de la specia *Heliothis armigera*. Produsul comercial, înregistrat cu ajutorul firmelor Minerals Corp. și Sandoz Inc. sub numele de Elcar[®] a fost primul produs viral comercializat pe piață, aflat încă în uz și omologare în o serie de țări de pe glob, bazat pe baculovirusul VPNHe (Ignoffo și colab., 1981). Tehnologia elaborată, intens mecanizată a stat la baza producerii altor biopreparate virale bazate pe baculovirusurile: AcMVPN (de la *Autographa californica*), HzVPN (de la *Helicoverpa zea*), CpVG (de la *Cydia pomonella*), TnVPN (de la *Trichoplusia ni*) etc.

Aceste sisteme de producere au dat un randament mai mare sau mai mic, în funcție de stadiul de mecanizare atins de tehnologia aplicată ca și de ușurința cu care au putut fi crescute speciile gazdă corespunzătoare (Hostetter și colab., 1991).

Perfecționările pe linia tehnologiei de producere a preparatelor virale au avut loc și în ceea ce privește producția „*in vitro*”. Cele mai multe linii celulare folosite pentru producerea „*in vitro*” au fost obținute de la *Autographa californica* (Vail și colab., 1991). Tehnologia se bazează pe două strategii:

- producția de baculovirusuri în culturi celulare în suspensie, în flux continuu;
- producția de baculovirusuri în culturi celulare, în șarje.

Sistemul de producție „*in vitro*” a devenit competitiv odată cu obținerea la un preț de cost scăzut a mediului lichid fără ser (Godwin și colab., 1991). Majoritatea baculovirusurilor obținute prin sistemul „*in vitro*” au fost de tip VPN dar s-au obținut în cantități mici și baculovirusuri de tip VG (Naser și colab., 1984).

Alte avantaje ale sistemului „*in vitro*” țin de manipularea mai ușoară și de posibilitatea eliminării contaminării cu agenți microbiologici străini.

Cercetările mai recente vizează acele caracteristici ale produselor virale care, din punctul de vedere al criteriului de eficacitate al unui produs fitofarmaceutic sunt considerate dezavantaje. Printre acestea se numără:

- a) acțiunea lentă, în timp, asupra gazdei-țintă;
- b) rezistența și persistența scăzută în mediu;
- c) standardizarea/condiționarea/controlul calității

În vederea ameliorării unora dintre aceste caracteristici și sporirii performanțelor produselor virale, se desfășoară numeroase cercetări, în diferite centre de cercetare din S.U.A. și Europa, unele rezultate notabile fiind deja valorificate prin comercializarea unor produse eficiente, dar și prin o serie de aplicații colaterale, foarte importante în medicină și farmacologie.

Pe linia măririi eficacității produselor virale se axează și cercetările legate de modificarea genetică a baculovirusurilor în sensul sporirii virulenței acestora și a reducerii timpului de acțiune letală asupra larvelor infectate.

Evaluarea potențialului de impact al unui produs bazat pe un baculovirus recombinant asupra unei populații nețintă care trebuie făcută în cadrul analizei riscului, necesită identificarea susceptibilității unei specii față de infecția cu acel produs, în directă relație cu probabilitatea ca indivizii speciei respective să poată fi expuși dozei infecțioase respective.

Ținând seama de aceste considerente, ca și de faptul că în majoritatea țărilor există un cadru de reglementări, eliberarea de baculovirusuri recombinante în natură trebuie efectuată cu prudență, numai după un studiu privind atât informații, date, despre evaluarea impactului cât și despre eficacitatea controlului biologic (Glover, 1994). Abia în urma acumulării acestor de date se pot desfășura experimente de lansare în câmp, pe arii restrânse urmate de lansări pe scară largă, cerințe indispensabile înainte de înregistrare și lansare pe piață.

În concluzie, ambele metode de producere “in vivo” și “in vitro” sunt promițătoare pentru producerea de insecticide virale. Multe baculovirusuri importante și toate virusurile granulozei necesită o producere “in vivo”, din cauza lipsei culturilor

celulare în acest moment. Eficiența metodei de producere “in vivo” se limitează în prezent la producerea și comercializarea unor tipuri sălbatice de VPN. Creșterea eficienței măsurilor de protecția plantelor prin folosirea insecticidelor baculovirale de tip recombinant VPNr care produc toxine specifice insectelor va avea loc numai prin producerea acestora prin metode in vitro.