**IDENTIFICARE MORFOLOGICĂ**

**INSECTE ORDINUL LEPIDOPTERA**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Elaborat:  Nume: Iulia Venera Rădulescu  Funcţia: RT  Data:  Semnătura: | Verificat: | Avizat: | Aprobat:  Nume: Filofteia Manole  Funcţia: Director LNF  Data:  Semnătura : |
| Nume: Mirela Cean  Funcţia: șef serviciu  Data:  Semnătura : | Nume: Cătălin Petcu  Funcţia: MC  Data:  Semnătura: |
| Localizare exemplar:  MC – original  Director LNF– copie  Entomologie – copie | | | |
| Exemplarul nr. ... / 3 | | | |

1. **SCOP**

Procedura se utilizează pentru identificarea speciilor de insecte încadrate taxonomic în Ordinul Lepidoptera (fluturi), pe baza caracterelor morfologice interne și externe ale acestora, observate la stereomicroscop şi microscop.

1. **DOMENIU DE APLICARE**

Prezenta procedura se aplică în unitatea tehnică Entomologie pentru identificarea insectelor din Ordinul Lepidoptera, insecte denumite popular fluturi, pe baza caracterelor morfologice ale indivizilor aflați în următoarele stadii de dezvoltare: larve, nimfe și adulți. Identificarea se realizează pentru dăunătorii culturilor agricole și silvice, în special pentru cei reglementați ca organisme de carantină pentru Uniune și non-carantină, conform legislației în vigoare.

Exemplarele pot fi recepționate ca atare de la diverși clienți (PCF, OF, alți beneficiari) sau pot fi depistate și colectate din probe de plante, fructe, bulbi, capcane etc., conform PO EN 1, fiind apoi analizate în vederea încadrării taxonomice.

Probele provin din programe de monitorizare/supraveghere, control import, control export, supraveghere teritoriu, eliberare pașaport, circulație intracomunitară etc.

* 1. **REZUMAT**

Proba reprezentată de insecte aflate în diferite stadii (larve, nimfe şi adulţi) se analizează macroscopic (cu ochiul liber) și/sau cu diverse echipamente care asigură o vizualizare superioară (stereomicroscop, lupă etc) pentru a urmări caracterele morfologice externe specifice acestui ordin taxonomic. În funcţie de complexitatea diagnosticului se execută preparate microscopice pentru a vizualiza caractere morfologice interne, în special armătura genitală a adulţilor, element esenţial în stabilirea cu precizie a speciei vizate. De asemenea, pentru stabilirea diagnosticului se pot efectua măsurători biometrice în situaţia în care bibliografia existentă face referinţă la asemenea elemente.

În general, pentru identificarea speciei sunt necesare exemplare adulte sau larve aflate în ultimele stadii larvare. Totuși, unele exemplare pot fi încadrate la nivel de ordin, familie în funcţie de resursele existente ex. materiale de referinţă, desene, schiţe, bibliografie.

1. **DOCUMENTE DE REFERINŢĂ**

**🡪 Reglementări legislative**

- Regulamentul de punere în aplicare (UE) nr. 2072/2019 de stabilire a unor condiții uniforme pentru punerea în aplicare a Regulamentului (UE) 2016/2031 al Parlamentului European și al Consiliului în ceea ce privește măsurile de protecție împotriva organismelor dăunătoare plantelor, de abrogare a Regulamentului (CE) nr. 690/2008 al Comisiei și de modificare a Regulamentului de punere în aplicare (UE) 2018/2019 al Comisiei, cu modificările și completările ulterioare.

**🡪Literatură de specialitate (selecţie)**

- Protocoale OEPP: PM 7/009 (1) *Cacoecimorpha pronubana,* PM 7/010 (1) *Cacyreus marshalli*,PM 7/019 (1) *Helicoverpa armigera*, PM 7/37(1) *Thaumatopoea pityocampa*, PM 7/71 (1) *Opogona sacchari*, PM 7/72 (1) *Tecia solanivora*, PM 7/108 (1) *Paysandisia archon,* PM 7/124 (1)  *Spodoptera littoralis, Spodoptera litura, Spodoptera frugiperda, Spodoptera eridania,* PM 7/134 (1) *Thaumatotibia leucotreta*, PM 157 (1) *Dendrolimus pini*.

- Chambon J.P., 1999 - Atlas des genitalia males des Lépidoptères Tortricidae de France et Belgique, INRA;

- Chambon J.P, 1986 – Les tordeuses nuisibles en arboriculture fruitière, INRA;

- Clifton J., Wheeler J., 2012 - Conifer moths of the British Isles, A Field Guide to Coniferous-feeding Lepidoptera;

- Cocquempot C.- Lepidoptera, Les insects d’importance agronomique – “Pratique de l’identification au laboratoire”, INRA;

- May P., 2014 - A Handbook for Lepidopterists, The Amateur Entomologist;

- Niculescu E.V, König F., 1970 – Fauna RSR, Insecta, Vol XI, Fascicula 10, Lepidoptera, Partea generală, Editura Academiei Republicii Socialiste România;

- Rákosy L., 1966 - Die Noctuiden Rumӓniens (Lepidoptera Noctuidae), Stapfia 46;

- Rákosy L., 2013 - Fluturii din România, Cunoaștere, protecție, conservare, Editura Mega Cluj-Napoca;

- Stănoiu I., Bobîrnac B., Copăcescu S., 1979 - Fluturi din România, Editura Scrisul Românesc.

Surse electronice:

* <https://idtools.org/id/leps/lepintercept>
* https://mothdissection.co.uk
* <https://britishlepidoptera.weebly.com>
* <https://www.leps.it>
* <https://www.padil.gov.au>
* https://mothphotographersgroup.msstate.edu/genitalia.php?hodges=19295
* https://www.afromoths.net
* https://keys.lucidcentral.org/keys/v3/the-caterpillar-key/index.html
* <https://www.butterfliesandmoths.org/gallery>
* http://pnwmoths.biol.wwu.edu

🡪**Documente emise în sistemul de management al calităţii**

PSL 01 – Spaţii de lucu și condiții de mediu;

A1 PSL 01 Ghid de curățenie/dezinfecţie;

PSL 02 – Echipament. Trasabilitate;

F1 PSL 03 – Analiza capabilităţii laboratorului;

PSL 05 – Asigurarea validității rezultatelor;

PSL 06 – Raportarea rezultatelor analizelor;

F4 PSL 06 - Buletinul de analiză LE și LF pentru analize ale metodelor acreditate și neacreditate;

F5 PSL 06 - Buletinul de analiză LE și LF pentru analize ale metodelor neacreditate;

PO DG 1 – Recepția probelor de plante și produse vegetale;

A1 PO DG 1-Acceptabilitatea tehnică în unitățile tehnice de diagnoză;

F1 PO DG 1- Notă refuz probe;

PO DG 2 – Reactivi, medii și soluții;

F3 PO DG 2 – Fișă evidență reactivi;

F4 PO DG 2 – Fișă de preparare medii de cultură/soluții;

PO DG 3 – Utilizarea materialelor de referință;

F1 PO DG 03 – Fişă de evidenţă material de referinţă în UT Entomologie/Nematologie;

PO EN 3- Validarea/verificarea testelor utilizate pentru depistarea și identificare morfologică și/sau morfobiometrică a insectelor și acarienilor dăunători culturilor agricole;

PO EN 7 – Identificarea componentelor de incertitudine ale metodelor de depistare și identificare morfologică insecte și acarieni;

IS DG 1 – Utilizarea softului GEPRO- Diagnoză

IS DG 3 – Etichetare preparate microscopice;

IS DG 4 – Utilizare și mentenanță microscop;

IS DG 5 – Utilizare şi mentenanţă cameră digitală microscop DFC 295;

IS DG 8 – Utilizare și mentenanță stereomicroscop cu sursă de lumină rece;

IS DG 69 - Utilizare şi mentenanţă plită digitală Stuart;

IS DG 87 - Utilizare și mentenanță microscop cu contrast de fază Zeiss Axio Imager M2;

IS DG 88 - Utilizare şi mentenanţă stereomicroscop Zeiss Axio Zoom V16;

F1 PO EN 1– Fişa de lucru pentru depistare insecte și acarieni.

F2 PO EN 1 Fișa de lucru pentru identificare morfologică insecte și acarieni.

**4. DEFINIŢII ŞI ABREVIERI**

**4.1. DEFINIŢII**

Nu este cazul

**4.2. ABREVIERI**

**ANF:** Autoritatea Naţională Fitosanitară;

**BA:** buletin de analiză;

**DG:** diagnoză – unități tehnice ale LNF din domeniu fitosanitar;

**DF:** Direcţia Fitosanitară din cadrul ANF;

**EN:** unitatea tehnică entomologie;

**EURL:** Laborator European de Referinţă;

**F:** formular

**GEPRO:** gestionarea electronică a probelor de plante şi produse vegetale;

**IPPC:** Convenţia Internaţională pentru Protecţia Plantelor;

**ISPM :** Standarde Internaționale pentru Măsuri Fitosanitare ;

**IS:** instrucţiune specifică;

**KOH**: hidroxid de potasiu;

**LF:** Laborator Fitopatologie ;

**LE:** Laborator Entomologie

**LNF:** Laboratorul Naţional Fitosanitar;

**MC:** manager calitate;

**MR:** material de referinţă;

**OEPP:** Organizaţia Europeană şi Mediteraneeană pentru Protecţia Plantelor;

**OF:** Oficiul Fitosanitar;

**ORNC**: organism reglementat non-carantină;

**PCF:** punct de control la frontieră;

**PO:** procedură operațională;

**PS:** procedură de sistem;

**PSL:** procedură de sistem pentru laboratoare;

**RT:** responsabil tehnic;

**UT:** unitate tehnică- compartiment de lucru din cadrul LE și LF.

**5. DESCRIEREA ACTIVITĂȚII**

**5.1. PRINCIPIUL METODEI**

Se analizează exemplarele la stereomicroscop şi microscop, în scopul observării prezenței caracterelor morfologice interne şi externe, utile pentru identificarea indivizilor aparținând ordinului Lepidoptera.

**5.2. GENERALITĂŢI. NOŢIUNI DE TAXONOMIE.**

Ordinul **Lepidoptera** este unul dintre cele mai bogate cinci ordine de insecte însumând peste 160000 de specii, grupate în două subordine: subordinul **Homoneura** și subordinul **Heteroneura,** diferențiate în 42 de superfamilii şi 131 de familii. Insectele acestui ordin, cunoscute popular sub numele de fluturi și molii sunt printre cei mai distructivi și importanți, din punct de vedere economic, dăunători forestieri, agricoli și ai produselor depozitate.

Larvele, în special cele din fam. Noctuidae, Tortricidae și Pyralidae, sunt unele dintre cele mai frecvent interceptate forme de dăunători agricoli care necesită aplicarea măsurilor de carantină pentru plante şi produse vegetale.

Indivizii aparținând acestui ordin se diferențiază de celelalte ordine de insecte prin:

- prezența solzilor cu care este acoperit corpul adulților (Lepis= solz) ;

- aparatul bucal al adulților, modificat pentru a forma un proboscis alungit (haustellum), la 99,9% dintre Lepidoptere;

- prezența a două deschideri genitale la 99% dintre femele (ostium = por copulator și ovipor = por pentru depunerea ouălor);

- prezența mecanismului de cuplare a aripilor în timpul zborului.

În cadrul ordinului diferențierea între familii și încadrarea taxonomică a speciilor a evoluat de-a lungul timpului având diferite elemente ca bază pentru clasificare, printre care: perioada din zi în care sunt activi: diurni/nocturni; colorația: colorați/cu culori terne (fluturi/molii); dimensiune: macrolelidoptere/microlepidoptere; evoluția elementelor ce compun aparatul bucal: mandibule (la exemplare primitive)/proboscis (la 99% dintre lepidoptere - subordinul Glossata); tipuri de aripi: aripi egale și cu nervațiune homonomă/ aripi anterioare diferite ca formă și nervație față de cele posterioare; tip de mecanism de cuplare a aripilor în timpul zborului: jugat/frenat.

Cele mai multe organismele dăunătoare aparținând acestui ordin reglementate de Uniunea Europeană aparțin familiilor: Tortricidae (22 specii), Noctuidae (4 specii), Gelechiidae (2 specii), Notodontidae (2 specii), Carposinidae, Castnidae, Crambidae, Lasiocampidae, Pyralidae, Tineidae (câte o specie).

**5.3. ECHIPAMENTE, MATERIALE, REACTIVI ȘI SOLUȚII**

**5.3.1. Echipamente**

**-** microscop cu contrast de fază Zeiss Axio Imager. M2: nr inv. MF 20799, serie 3525004422 (putere de mărire 2,5X, 10X, 20 X, 40X, 63X, 100X);

- microscop cu contrast de fază LEICA DMLB: nr. inv. 117 MF, serie 250759 (putere de mărire 2,5X, 10X, 20X, 40X, 63X, 100X);

- microscop examinare în câmp luminos LEICA DMLB: nr. inv. 122, serie 250750 (putere de mărire 10X, 20X, 40X, 100X);

- stereomicroscop Zeiss Azio ZoomV 16: nr. Inv. MF 20804, serie S/N: 3957004489, putere de mărire (179X, 268X)

- stereomicroscop cu lumină LEICA MZ 125: nr. inv. 112 MF, serie 5235099; putere de mărire 10X

- stereomicroscop cu lumină LEICA Mz 125: nr. inv. 113 MF serie 5270945; putere de mărire 10X

- stereomicroscop ZEISS Stemi 1000: nr. inv. 90 MF, serie 455094;

- cameră digitală microscop DFC 295, serie 0645604612;

- plită magnetică STUART SD 160 (4 buc.): nr. inv. 48 BM-MF, serie R00100593; nr. inv. 49 BM-MF, serie R10100610; nr. inv. 20010 MF, serie R420000980; nr. inv. 20016 MF R 420001047.

Echipamentele sunt verificate periodic pentru evaluarea parametrilor tehnici, conform PSL 02 – Echipament. Trasabilitate, precum şi a instrucţiunilor specifice IS DG 4, IS DG 5, IS DG 8, IS DG 69, IS DG 87, IS DG 88.

**5.3.2. Materiale**

- pensete,

- pensule fine;

- sticle de ceas;

- lame microscop pătrate 76X26 mm;

- lamele microscop pătrate 20X20 mm;

- lamele rotunde cu diametrul de diferite dimensiuni în funcţie de dimensiunea specimenului;

- microtuburi;

- ace disecţie de diferite dimensiuni;

- detergent;

- lac de unghii sau produse similare (ex. Glyptol, Brunseal)

**5.3.3** **Reactivi**

- alcool etilic 95%, 98%, 100%;

- balsam de Canada sau Euparal;

- benzilalcool (diluant pentru balsamul de Canada);

- ulei de lavandă;

- clorura de metilen sau alt produse cu acţiune similară, cum ar fi ulei de citrice, terebentină;

- apă distilată.

- glicerină.

**5.3.4. Soluții**

- soluţie Hoyer;

- alcool 70%.

- KOH 10%;

Reactivii utilizaţi pentru obţinerea soluţiilor necesare sunt codificaţi şi depozitaţi conform procedurii specifice PO DG 2- Reactivi, medii şi soluţii. Soluţiile se prepară în camera 15 (preparare medii şi soluţii) conform reţetelor specifice UT entomologie, completându-se formularele specifice F3 PO DG 2 –Fişă evidenţă reactivi şi F4 PO DG 2- Fişă de preparare medii de cultură/soluţii.

**5.4. MOD DE LUCRU**

Recepţia probelor se face de către RT prin vizualizarea şi recepţia electronică a probelor în unitatea tehnică repartizate prin GEPRO-Diagnoză, conform IS DG 1 - Utilizarea softului GEPRO- Diagnoză, notând pe Fişa de lucru pentru depistare insecte şi acarieni (F1 PO EN 1) datele necesare derulării analizei. Urmeazăpreluarea probelor codificate de la recepţie şi transferul acestora în camera de primire probe Entomologie (nr. 6).

Responsabilul tehnic realizează, acceptabilitatea tehnică urmărindu-se conformitatea cu criteriile specifice stabilite (A1 PO DG 1) şi verificarea concordanţei codului probei aplicat pe ambalaj cu cel din fişa electronică. Dacă proba nu este acceptată din punct de vedere tehnic se notează “Nu” în fişa de lucru, menţionându-se motivul respingerii şi în GEPRO se bifează “închide şi respinge proba”, specificând motivul refuzului la rubrica ”menţiuni” și ulterior se completează fișa F1 PO DG 1.

În cazul în care proba nu se analizează imediat se păstrează în condiții corespunzătoare, astfel încât să nu-i fie afectată integritatea, până în momentul începerii analizei.

**5.4.1 Pregătirea şi tratarea probei**

Proba este constituită din insecte primite ca atare de la clienţi, colectate în alcool etilic, etalate în stare uscată, capturate pe capcane lipicioase sau rezultate în urma etapei de depistare de pe plante gazdă sau produsele vegetale.

Pentru identificarea speciilor poate fi necesară urmărirea unor caractere morfo-anatomice ale larvelor şi adulţilor, inclusiv analiza aparatelor genitale ale adulţilor. În acest scop este necesară efectuarea unor preparate microscopice semipermenante (soluţie Hoyer) sau permanente (balsam de Canada/Euparal), care pot fi păstrate în colecţie.

Manipularea insectelor se face cu pensete foarte fine şi cu ace entomologice prinse în mandrine.

Pentru a surprinde eventuala variabilitate din cadrul speciei este bine să se observe mai multe exemplare. Pentru stabilirea sexului se observă la aripă numărul setelor de la frenulum: 1 la mascul şi două sau mai multe la femele (se verifică ambele părţi pentru că pot varia).

**A. Efectuarea preparatelor microscopice** **pentru adulţi**:

- specimenele aflate pe capcane se îndepărtează de clei cu diverşi solvenţi (ex. ulei de citrice, clorura de metilen, kerosen) curăţându-se apoi cu un detergent;

- curăţarea exemplarelor poate fi necesară şi în alte situaţii (insecte murdare de pământ), o curăţare cu un detergent fiind suficientă;

- înainte de a face preparatul microscopic poate fi necesară înmuierea specimenelor (dacă exemplarul este uscat) în apă distilată călduţă (durata etapei fiind în funcţie de mărimea exemplarului analizat);

- se detaşează apoi segmentele abdominale ale corpului, care fie se fierb în KOH 10% la bain-marin (în funcţie de mărimea insectei respective stabilindu-se durata procesului), fie se păstrează în KOH 10% rece, cel puţin peste noapte (durata depinde de dimensiunea exemplarului);

- după atingerea clarificării dorite, se trec segmentele într-o sticlă de ceas cu apă distilată şi se îndepărtează perii de pe acestea, cu ajutorul unei pensule sau ace fine, apoi printr-o apăsare uşoară se extrag piesele genitale cu ajutorul unui ac de disecţie fiind posibilă stabilirea sexului în această etapă;

- se așază piesele armăturii genitale pe lama microscopică, în glicerină, pentru a observa unele elemente necesare pentru identificarea speciei;

- în final piesele de interes se montează într-o picătură de soluţie Hoyer; preparatul se plasează pe placa de încălzire la aproximativ 50-55°C, o perioadă de timp suficient de mare pentru a îndepărta bulele de apă şi aer apărute în preparat;

- dacă nu este necesară efectuarea unor preparate microscopice pentru piesele genitale, acestea pot fi păstrate în tuburi cu glicerină sau lipite lângă restul corpului pe un cartonaş, în cazul insectelor care se păstrează în stare uscată;

**Pentru efectuarea preparatelor de lungă durată** în Balsam de Canada sau Euparal se parcurg următoarele etape:

- se plasează armătura din KOH în etanol 70% (după parcurgea timpului necesar), timp de 5 minute şi se curăţă de solzii şi setele prezente;

- se trece în etanol 96% pentru alte 5 minute, etapă care are rolul de întări piesele de interes;

- plasare în ulei de lavandă 10 minute (în această etapă preparatul poate sta mai mult timp);

- montare într-o picătură de balsam de Canada;

- acoperire cu o lamelă circulară de mărime corespunzătoare.

**B. Efectuarea preparatelor microscopice** **pentru larve:**

- larvele plasate în alcool etilic 70% sunt secţionate pentru a detaşa partea anterioară şi posterioară a corpului;

- se trec părţile detaşate în KOH 10% într-o eprubetă sau siracuză (în funcţie de dimensiuni), se fierb sub punctul de fierbere (aprox. 80-90°C), la bain-marie până se clarifică;

- se clătesc bine în apă distilată;

- montarea se face în soluţie Hoyer (toate piesele fiind plasate, în general pe o singură lamă microscopică).

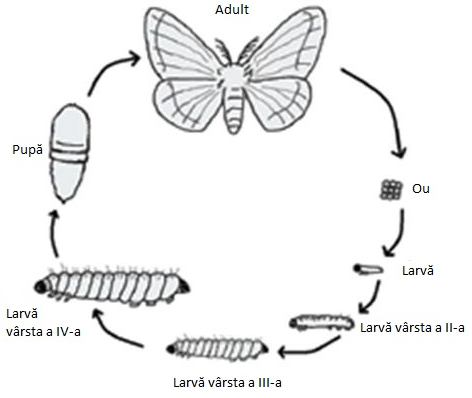
Preparatul se plasează pe placa de încălzire la aproximativ 50-55°C, o perioadă de timp suficient de mare pentru a îndepărta bulele de apă şi aer apărute în preparat şi pentru a clarifica preparatul.

Preparatele microscopice destinate conservării într-o colecţie sunt etichetate, conform instrucţiunii IS DG 3 Etichetare preparate microscopice, păstrate la temperatura camerei 2-3 săptămâni şi sigilate ulterior cu două straturi de lac de unghii sau alt produs cu acţiune similară (cele din soluţia Hoyer) şi câteva săptămâni în incubator la o temperatură de 39-40°C (cele din balsam de Canada).

Preparatele microscopice sunt examinate la microscop, în câmp luminos sau contrast de fază, după caz, utilizând o mărire a microscopului cuprinsă între 25-1000 X.

**5.4.2 Observarea caracterelor morfologice pentru realizarea diagnosticului.**

Lepidopterele sunt insecte cu metamorfoză completă (holometabole), dezvoltarea indivizilor parcurgând patru etape distincte în care structura de bază a corpului se transformă complet și anume: ou, larvă sau omidă, pupă, nimfă sau crisalidă și imago sau adult (fig. 1).

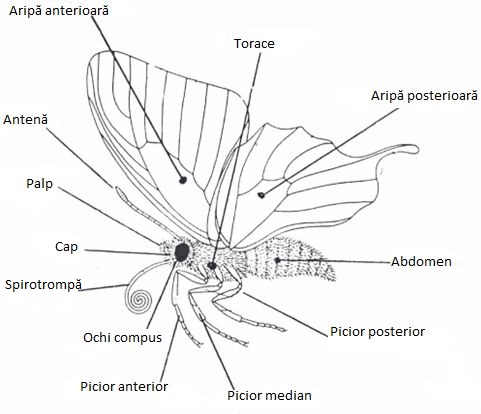


**Fig.1. Metamorfoza lepidopterelor**

Cheile de determinare, utilizate frecvent pentru identificarea și încadrarea insectelor în Ordinul Lepidoptera urmăresc caractere morfologice prezente la adulți, pupe și larve de vârsta a IV-a.

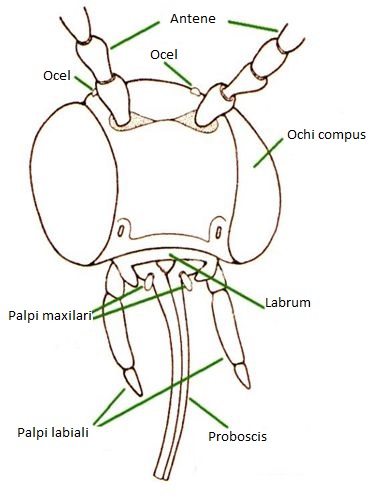
**5.4.2.1 Observarea caracterelor morfologice externe ale adulţilor**

Adulții (fig. 2) au lungimea corpului ce variază între 1-60 mm, anvergura aripilor între 3-300 mm și se deosebesc morfologic de alte ordine prin: corp acoperit de perișori și solzi, două perechi de aripi membranoase acoperite cu solzi și aparat bucal de supt și lins (proboscis sau spirotrompă – o spirală lungă cu care aspiră hrana lichidă compusă în principal din nectar).



**Fig.2. Morfologia generală a adulţilor din ordinul Lepidoptera**

Pe **cap** se disting: aparatul bucal compus din proboscis, palpi labiali, palpi maxilari și labrum; o pereche de ochi compuși, o pereche de oceli și o pereche de antene (figura 3).



**Fig. 3. Părţile componente ale capului**

Pe **torace** sunt prinse de partea ventrală 3 perechi de picioare, iar de partea dorsală două perechi de aripi.

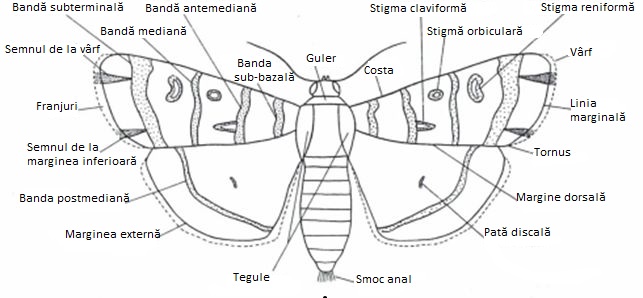
Aripile sunt formate din două membrane de chitină, străbătute de nervuri, care reprezintă ramificații traheene. Lepidopterele au 4 aripi acoperite cu solzi pigmentați, dintre care aripile anterioare sunt atașate la mezotorace, iar aripile posterioare sunt atașate la metatorace. Prin culori, desene și nervațiune se formează modele distincte, utile morfologic pentru identificare.

Dimensiunea și forma aripilor anterioare față de cele posterioare ajută la separarea speciilor în cele două subordine: cele care au aripile egale și cu nervațiune similară (**Homoneura)**, iar cele la care aripile sunt diferite ca formă și nervație (**Heteroneura).**

La o aripă distingem următoarele părți (fig 4):

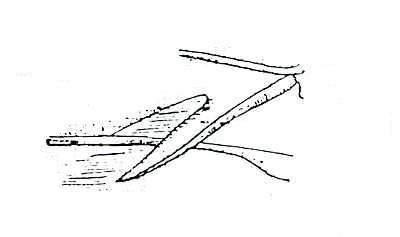
* baza – regiunea din apropierea punctului de fixare de torace;
* marginea externă – este opusă bazei;
* costa sau marginea costală – marginea anterioară (superioară) a aripii;
* marginea internă – marginea posterioară (inferioară) a aripii.
* unghiurile aripii sunt în număr de două: apex – unghiul situat la partea superioră-externă a aripii și tornus - unghiul de la partea inferioară-externă a aripii;
* discus – partea mijlocie a aripii unde se află nervurile discale.

La aripile posterioare se modifică denumirile astfel: tornus devine unghi anal, marginea internă se numește margine anală, iar regiunea situată sub celulă se numește regiune anală.



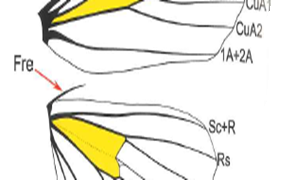
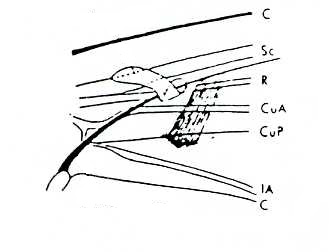
**Fig. 4. Elementele morfologice ale aripilor**

În timpul zborului aripile se cuplează între ele printr-o articulație specifică. La lepidopterele primitive cuplarea aripilor este de tip jugat şi se face cu ajutorul unui lob mărit poziționat lângă marginea bazală posterioară a aripii anterioare (jugum) care se agață de costa sclerotizată de pe marginea anterioară a aripii posterioare (fig. 5).

**Fig. 5. Cuplaj de tip jugat**

La marea majoritate a lepidopterelor sistemul de prindere este de tip frenat, caracterizat printr-un frenulum la baza aripilor posterioare și un retinacul la baza aripilor anterioare. Frenulum este constituit dintr-un smoc de peri rigizi în număr de 2-20 la femele și de un singur păr puternic la masculi, care se atașează de marginea posterioară a aripii anterioare printr-un sistem de reținere (retinacul) (fig. 6).

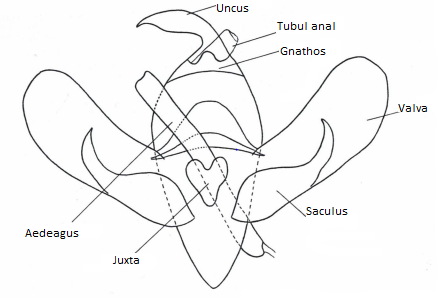
 

**Fig. 6. Cuplaj de tip frenat**

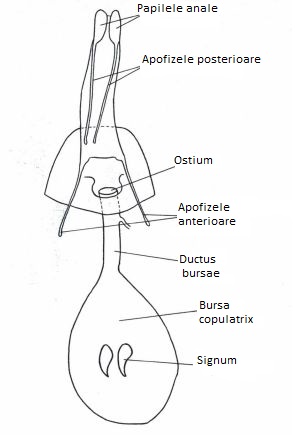
**Abdomenul** conține părțile principale ale tubului digestiv, părți ale aparatului circulator și aparatul reproducător, este format din 10 segmente dintre care ultimele două la masculi și ultimele trei la femele sunt modificate constituind armătura genitală.

Studiul morfologiei armăturii genitale este esențial pentru identificarea la nivel de specie deoarece acestea deși sunt complexe din punct de vedere structural sunt caracterizate printr-o variație relativ mică în cadrul aceleiași specii, dar cu variație mare între specii.

Principalele elemente structurale ale aparatului genital (armătura genitală) la mascul și la femelă sunt prezentate în schemele din figurile 7 și 8.



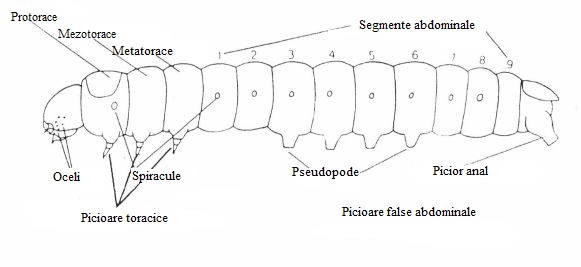
**Fig. 7. Schema generală a armăturii genitale la mascul (♂)**



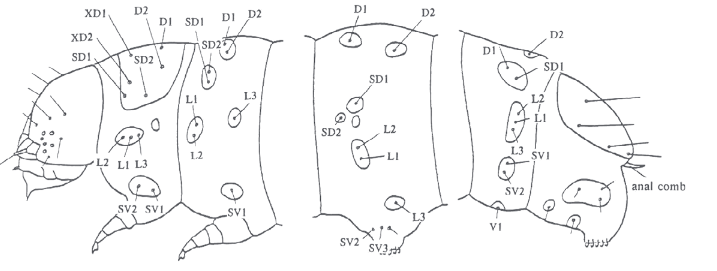
**Fig. 8.** **Schemă generală a armăturii genitale la femelă (♀)**

**5.4.2.2 Observarea caracterelor morfologice externe ale larvelor.**

Larvele lepidopterelor, numite popular omizi au aspect vermiform şi sunt formate din trei părți: cap, torace și abdomen (fig. 9). Corpul lor moale, de formă cilindrică este protejat de o cuticulă flexibilă, cu suprafața acoperită cu sete mai mult sau mai puțin numeroase și dezvoltate, uneori împodobită cu expansiuni mai rigide, iar capul este puternic sclerificat. Modul de distribuire al perilor pe suprafața corpului (chetotaxia), chiar și la speciile aparent glabre, oferă informații utile pentru studiul sistematic. Informații utilizate pentru diferențierea speciilor de lepidoptere încă din faza de larvă a de vârsta a 4-a au la bază aranjarea setelor pe fiecare segment ce formează corpul omizilor – chetotaxie, în care acestea sunt denumite după poziția pe care o au (D = dorsală, SD= sub-dorsală, L= laterală, SV= sub-ventrală, V= ventrală) (fig. 10).



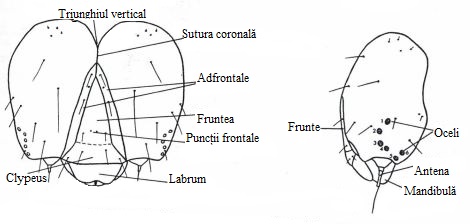
**Fig. 9. Larva tipică de lepidoptere**



**Fig. 10. Chetotaxia larvelor de lepidoptere**

Caracterele morfologice externe ale larvelor se urmăresc la partea anterioară şi posterioară a corpului, pe ambele părți.

**Capul**, numit capsula cefalică, clar diferențiat de restul corpului și puternic sclerificat este format din doi lobi, care conțin în unghiul format prin despărțitura lor anterioară în partea ventrală aparatul bucal de rupt și masticat, complex și bine dezvoltat. De asemenea, sunt prezente o pereche de antene mici și ocelii (fig. 11 ). Capsula cefalică și elementele asociate, cum ar fi piesele aparatului bucal, oferă caractere utile pentru identificare.



**Fig. 11. Elementele morfologice ale capului**

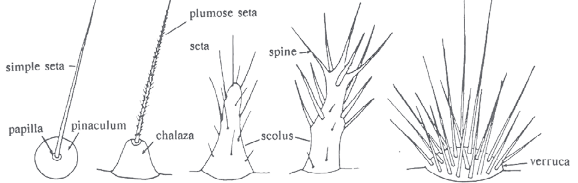
**Toracele** este format din trei segmente, fiecare dintre ele purtând câte o pereche de picioare articulate, echipate cu o gheară. Pe torace se găsește o singură pereche de stigme funcționale situată la marginea posterioară a protoracelui.

**Abdomenul** este format din 10 segmente, are tegumentul moale, prezintă opt perechi de stigme și un număr variabil de perechi de picioare abdominale sau picioare false (pseudopode). Picioarele abdominale sunt apendice ale segmentelor abdominale terminate prin ventuze cu gheare mici (croșete), conectate la musculatura internă. Tergitul segmentului X (ultimul segment abdominal) formează de obicei o placă anală complet sclerificată, care la unele specii prezintă la extremitatea posterioară un pieptene anal, divers conformat. Dezvoltarea și aranjarea picioarelor toracice și a picioarelor false abdominale (proleg), precum și numărul și dispunerea croșetelor (fig. 12) este utilă pentru diferențierea diferitelor grupuri de lepidoptere.



**Fig. 12. Mod de aranjare a croşetelor pe picioarele false (proleg)**

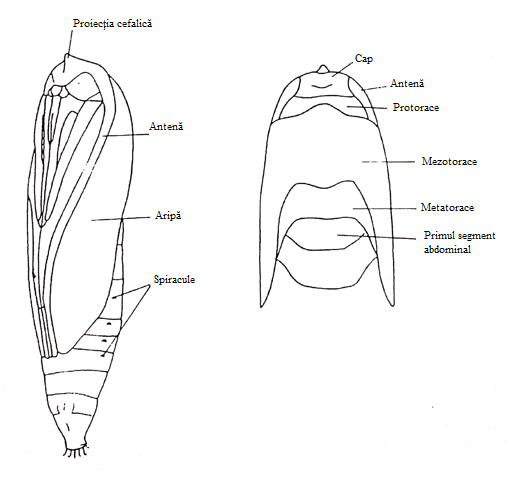
Tegumentul abdomenului poate fi neted sau acoperit cu diverse formaţiuni, cum ar fi: tuberculi, granulaţii, sete, spini, negi, scolii, coarne etc (fig. 13).



**Fig. 13. Tipuri de sete**

**5.4.2.3 Observarea caracterelor morfologice externe ale nimfelor (pupelor)**

Crisalida, pupa sau nimfa este al 3-lea stadiu în dezvoltarea unui fluture, caracterizată ă prin prezența unui înveliș chitinizat secretat de omidă la sfârșitul dezvoltării sale. Adesea este fixată pe un suport rigid sau închisă într-un înveliș de aglomerate de diverse origini. Pupele au forme variate, culori şi ornamente specifice, oferind caractere utilizate pentru sistematică şi identificare.



**Fig. 14. Schema generală a nimfei de lepidoptere**

La o pupă se pot deosebi capul, toracele, abdomenul, antenele, aripile, picioarele toracice dar acestea sunt de obicei sudate și nefuncționale (fig.14), fără alte orificii funcționale decât stigmele, iar orificiile genitale sunt neperforate.

**5.4.3 Măsuri pentru asigurarea** **corespunzătoare** **a** c**ondiţiilor de lucru**

Pentru evitarea contaminării încrucişate, precum şi asigurarea condiţiilor de lucru, se iau o serie de măsuri de curăţenie şi dezinfecţie conform prevederilor procedurii PSL 01 Spaţii de lucru şi condiții de mediu şi Anexei A1 PSL 01 Ghid de curățenie/dezinfecţie.

Astfel, în vederea prevenirii contaminării se aplică următoarele măsuri:

- purtarea halatelor de laborator în camerele destinate unităţii tehnice entomologie, în momentul efectuării analizelor;

- amplasarea unor plase la geamuri pentru evitarea pătrunderii insectelor din mediu sau scăparea accidentală a acestora în mediu;

- imobilizarea insectelor aflate în probă (plasarea la temperaturi negative, utilizare cloroform sau alte substanțe cu același efect), astfel încât colectarea lor să se facă în siguranță;

- manipularea insectelor în momentul identificării în stare moartă, în vederea eliminării riscului de răspândire în mediul înconjurător;

- manipularea substanţelor chimice conform fişelor de securitate, astfel încât să se asigure siguranţa în utilizare.

Deşeurile rezultate în urma efectuării analizelor sunt eliminate/distruse conform procedurii PO DG 1 Recepţia probelor de plante şi produse vegetale. Gestionarea deşeurilor.

* + 1. **Asigurarea validităţii rezultatelor**

Validarea/verificarea testelor utilizate în entomologie se efectuează conform cerințelor PO EN 03- Validarea /verificarea testelor utilizate pentru depistarea și identificarea morfologică și/sau morfobiometrică a insectelor și acarienilor dăunătorilor culturilor agricole

Asigurarea validității rezultatelor se realizează conform procedurii PSL 05–Asigurarea validității rezultatelor, modalităţile aplicabile UT Entomologie fiind utilizarea MR, citire dublă (nivel primar de control), teste intralaboratoare (probe de control), diagnosticarea prin mai multe tehnici, reîncercarea obiectelor păstrate (nivel secundar de control), participare la ring-teste/teste de eficienţă (nivel terţiar de control).

Tipurile de materialele de referinţă utilizate în unitatea tehnică sunt specificate în PO DG 3 – Utilizarea şi păstrarea materialelor de referință. Pentru gestionarea materialelor de referinţă existente în UT se completează F1 PO DG 03- Fişă de evidenţă material de referinţă în UT Entomologie/Nematologie.

Pentru identificarea speciei țintă sunt utilizate preparate microscopice de referință, fotografii și protocoale de diagnostic, elaborate de organizaţii recunoscute în domeniu, cum ar fi EURL, IPPC şi OEPP.

Pentru confirmarea rezultatului şi în cazul unor incertitudini, se utilizează materialele de referinţă existente procedându-se la compararea cu eşantionul de identificat, având în vedere să se utilizeze acelaşi stadiu şi sex.

În toate etapele proba este în permanenţă marcată cu codul de identificare, cu etichetă sau cu marker, astfel încât să se asigure trasabilitatea probei.

Preparatele microscopice se păstrează pentru o perioadă de cel puţin un an, în condiţii corespunzătoare, având grijă să nu se deterioreze starea acestora.

În cazul în care proba este constituită din mai multe exemplare şi nu se procesează în totalitate, se pot păstra insectele în tuburi cu alcool etilic 70%, la întuneric pentru evitarea pierderii culorii pentru o perioadă de cel puţin un an în condiţii corespunzătoare astfel încât să nu se deterioreze insectele. Pentru asigurarea validității rezultatelor au fost stabilite componentele de incertitudine asociate cu metodele aplicate în unitatea tehnică şi măsurile aplicabile pentru a reduce impactul factorilor critici depistaţi asupra calităţii diagnosticului (PO EN 7 - Identificarea componentelor de incertitudine).

* 1. **RAPORTAREA REZULTATELOR**

Rezultatele analizei sunt menţionate în formularele “Fişa de lucru pentru depistare insecte și acarieni” (F1 PO EN 1), “Fişa de lucru pentru identificare insecte și acarieni” (F2 PO EN 1) şi în GEPRO-Diagnoză.

Rezultatele sunt exprimate sub forma calitativă astfel:

- în cazul în care nu sunt identificate în probă insecte aparţinând ordinului Lepidoptera, în BA se menţionează “Nedepistat”

- în situaţia în care sunt identificate insecte din ordinul Lepidoptera, în BA se menţionează “Depistat”, iar la rubrica menţiuni se precizează specia/genul/ordinul depistată/depistat.

- în situaţia în care specia depistată este un organism de carantină pe buletinul de analiză sau un organism reglementat non-carantină (ORNC) apare şi menţiunea “În atenţia DF-ANF”.

Pe baza informaţiilor respective se generează electronic buletinul de analiză, validarea rezultatului efectuându-se conform procedurii PSL 06 – Raportarea rezultatelor analizelor utilizându-se buletinul de analiză LE și LF pentru analize ale metodelor acreditate /neacreditate (F4 PSL 06).

Pe lîngă fişa de identificare se păstrează pentru o perioadă de cel puţin 5 ani şi alte evidenţe ale diagnosticului, cum ar fi: fotografii ale unor structuri taxonomice importante şi distinctive, măsurători biometrice, dovezi ale unor diagnoze externe, după caz.

Fotografiile şi măsurătorile se execută la microscopul LEICA DMLB, cu camera Leica DFC 295 și soft încorporat LAS V 4.2.0, respectiv microscopul cu contrast de fază Zeiss Axio Imager, cu camera Axiocam 506, cu softul Zen Blue ediția 3,4.

Fotografiile se salvează cu codul probei, urmat de cifra a...z sau alte elemente de identificare (ex cap, antenă), pentru fiecare fotografie asociată unei probe, asigurându-se trasabilitatea informaţiilor, în fişierul denumit “Diagnoze XXXX” (XXXX reprezentând anul în curs), aflat în:

- partiţia D, folderul POZE din computerul cu numărul de inventar 154 MF, sau

- partiția C, folderul POZE din computerul cu numărul de inventar MF 20799, sau

- partiția C, folderul POZE din computerul cu numărul de inventar MF 20804.

**6. RESPONSABILITĂŢI**

**6.1. DIRECTOR LNF**

- aprobă noile versiuni/revizii ale procedurii;

- semnează buletinele de analiză în care este specificată această încercare şi notele de refuz;

- repartizează probele intralaborator (de control) pentru șeful de serviciu.

**6.2. MANAGER CALITATE**

-avizează noile versiuni/revizii ale procedurii.

**6.3. ȘEF SERVICIU ENTOMOLOGIE**

- verifică noile versiuni/revizii ale procedurii;

- efectuează analiza capabilității contractului completând formularul F1 PSL 03-Analiza capabilității laboratorului;

- consultă clientul și înregistrează rezultatul discuției atunci când există îndoieli referitoare la adecvarea unei probe pentru analiză, când o probă nu este conformă cu caracteristicile sale sau când analiza solicitată nu este descrisă suficient de detaliat;

- stabilește, repartizează și evaluează rezultatele probelor intralaborator (de control) ale personalului din subordine;

- analizează probele intralaborator (probele de control) repartizate de directorul LNF;

- participă la teste de eficienţă/comparări interlaboratoare;

- vizează fișele de lucru şi semnează buletinele de analiză.

**6.4. RESPONSABIL RECEPȚIE PROBE**

- recepționează probele și efectuează acceptabilitatea administrativă conform PO DG 1 Recepția probelor de plante și produse vegetale. Gestionarea deşeurilor;

- codifică și înregistrează probele în GEPRO-Diagnoză.

**6.5. RESPONSABIL TEHNIC**

- înregistrează probele în GEPRO - Diagnoză şi în fişa de lucru;

- verifică probele în vederea efectuării acceptabilităţii tehnice;

- efectuează analiza la stereomicroscop sau la microscop;

- realizează preparate microscopice;

- formulează rezultatele şi introduce datele în GEPRO - Diagnoză;

- stabileşte motivul refuzului unei probe pe care îl introduce în GEPRO - Diagnoză;

- verifică şi semnează buletinele proprii de analiză;

- analizează probele intralaborator (probele de control) repartizate;

- participă la teste de eficienţă/comparări interlaboratoare.

**6.6. TEHNICIAN**

- preia probele de la recepţie;

- realizează curaţarea echipamentelor, materialelor, sticlăriei utilizate în laborator şi a spaţiilor de lucru.

**6.7. RESPONSABIL EDITARE BULETINE DE ANALIZĂ**

- emite buletinul de analiză din GEPRO- Diagnoză și îl transmite pentru verificare și semnare responsabililor tehnici şi şefului de serviciu;

- completează formularul F1 PO DG 1 - Nota refuz probe și o transmite clientului în cazul refuzului din punct de vedere administrativ;

- redactează nota de refuz şi o transmite clientului în cazul probelor respinse din punct de vedere tehnic;

- scanează buletinele de analiză și le transmite clientului conform PSL 06 - Raportarea rezultatelor analizelor;

- arhivează buletinele de analiză, împreună cu cererile de analiză pentru asigurarea trasabilității.

**6.8. RESPONSABIL SECRETARIAT ANF**

- ştampilează BA/nota de refuz.

**7. ANEXE**

Nu este cazul.

**8. ÎNREGISTRĂRI**

Nu este cazul