Coordonator
Dr. ing. Ghică MIHU

# Soluții biologice de combatere a bacteriozelor patogene la plantele horti-viticole



DOMINO®
coeditare cu
RAWEX COMS
București
2010

**Coordonator**
**Dr. ing. Mihu Ghică**

# Solutii biologice de combatere a bacteriozelor patogene la plantele horti-viticole

**2010**

**Descrierea CIP a Bibliotecii Naţionale a României**
**GHICĂ, MIHU**
I.**Solutii biologice de combatere a bacteriozelor patogene la plantele horti-viticole/** Mihu Ghică – București: Do-MinoR: Rawex Combs, 2010
ISBN 978-973- 1838-99-1
ISBN 978-606-8231-10-5

579.8:663+634.8

**Cercetările efectuate care au stat la baza prezentei lucrări au fost finanţate prin Contractul C.N.M.P. 61-041/2007 in cadrul Proiectului de cercetare 2595/2007 intitulat *"Soluţii biologice de combatere a bacteriozelor patogene la plantele horti-viticole"* în cadrul programului P.N.C.D.I. II.**

**Director de proiect - Dr. ing. Ghică MIHU**

**Colectivul de cercetători care au participat la realizarea proiectului:**

| |
|---|
| **C.O. – S.C. - D.V.V. ODOBEŞTI** |
| Dr. ing. Ghică MIHU, Dr. ing. Aurelia PODOSU, Dr. ing. Ileana STOIAN, Dr. ing. Costică VARTIC, Drd. ing. Marioara BOSOI, Ing. Ionica BOSOI, Ing. Lacramioara MIRON |
| **P1. – I.N.C.D.C.F - I.C.C.F. BUCUREŞTI** |
| Prof. univ. Dr. Mişu MOSCOVICI, Dr. Biolog Maria PAMFIL, Ing. Gabriela SĂVOIU, Chimist Adriana GIURGEA, Ing. Amalia ŞTERFANIU, Medic Mădalina RADULESCU. |
| **P2. – CENTRU DE CERCETARE ŞTIINŢIFICĂ ÎN DOMENIUL BIOCHIMIEI APLICATE ŞI BIOTEHNOLOGIEI – BIOTEHNOL, BUCUREŞTI** |
| Prof. dr. Narcisa BĂBEANU, Prof dr. Ovidiu POPA, As. univ. dr. Oana LIVADARIU, Prof. univ. dr. Petruţa, Cătălina CORNEA, Prof. dr. Adrian VAMANU, Şef lucr. dr. Manuel VAMANU, Asist univ. Cătălina VOAIDEŞ, Şef. lucr. dr. Gabriela MARGARIT, dr. Florentina RADUCANU, dr. ing. Eugenia TEMOCICO, dr. ing. Elena PETCU, dr. ing. Maria OPREA. |
| **P3. – S.C. COMPRESERV S.R.L., BUCUREŞTI** |
| Ing. Manuel DRUGULESCU, Ing. Ioana VLAICU. |
| **P4. – S.C. - D.V.V. BUJORU** |
| Drd. Ing. Gabriel TĂBĂRANU, Dr. Ing. Cristina SIMION, Dr. Ing. Nicolae BÂRLIGA, Dr. Ing. Viorica ENACHE, Dr. Biolog Aurel CIUBUCĂ, Drd. Ing Alina DONICI, Ing. Roxana IONASCU, Ing. Ion SIMION |

# CUPRINS

1. Introducere.....7
1.1 Prezentarea conceptului de „Luptă biologică”.....8
1.2. Combaterea biologică a agenţilor patogeni.....9
1.3. Combaterea agentului pathogen.....13
2. Obţinerea biopreparatelor.....15
2.1. Cercetări efectuate pentru obţinerea biopreparatelor..... 15
2.2. Obţinerea produsului bacterian.....16
2.3 Tehnologia de combatere a bacteriozelor la la viţa de vie.....28
2.4. Măsuri de prevenire a bolii.....35
3. Concluzii.....41
3.1. Tehnologia de combatere a bacteriozelor la speciile legumicole.....41
3.2. Impactul social al produsului.....45
3.3. Impactul asupra mediului.....46
4. Bibliografie .....47

# 1. Introducere

Bacteriile fitopatogene reprezintă un pericol permanent pentru sănătatea plantelor producând boli care duc la diminuări importante ale producţiei în culturile horti-viticole.

La nivel internaţional bacteriile ca patogeni ai plantelor au fost evidenţiate la sfârşitul secolului al XIX-lea, când au apărut primele preocupări de fitopatologie în Statele Unite (T. Buirrill, 1878). Cercetările au continuat prin punerea în evidenţă a bacteriozelor la zambilă şi măslin.

Bazele ştiinţifice ale acestui domeniu au fost puse de Smith (1896), care a izolat şi caracterizat bacterioze pe castraveţi, fasole, prun şi cartof. Cercetările au continuat în Franţa şi Germania, înfiintându-se laboratoare speciale cu cercetări realizate de F. Hedges, W. H. Burkholder.

Bacteriile ca patogeni ai plantelor, au fost evidenţiate în anul 1878 de T. J. Burrill, prima semnalare fiind focul bacterian al rozaceelor, după care preocupările în fitopatologie s-au acumulat prin descrierea multor altor bacterioze, bazele ştiinţifice ale acestui domeniu fiind puse de Smith, descriind bacteriile patogene pe legume şi leguminoase, pe pomi fructiferi, cartofi, etc. La începutul sec. XX, cercetările s-au intensificat în Germania, Franţa, Italia, SUA.

Pe plan naţional primele cercetări de bacteriologie au fost iniţiate la începutul secolului XX (dupa *Primul Razboi Mondial*), de V. Ghimpu, A. Racoviţă, A. V. Alexandri şi T. Savulescu, care s-au rezumat la simptomele provocate de patogeni la plantele bolnave.

În anul 1962 a fost înfiinţat *Laboratorul de Bacteriologie Fitopatogenă* în cadrul *Secţiei Independente şi de Protecţia Plantelor din Institutul Central de Agronomie*, ulterior devenind *I. C .D. P. P.*, unde cercetări importante au fost realizate de colectivul condus de V. Severin – continuând cercetările asupra bacteriozelor frecvente pe plantele de cultură.

Cercetări de bacteriologie fitopatogenă s-au realizat şi la *Institutul de Cercetări pentru Legume şi Flori* şi *Staţiunea de Cercetări Viticole Dragăşani*. Zinca (1971) a realizat cercetări asupra cancerului viţei de vie produs de *Agrobacterium tumefaciens* şi a realizat un produs biologic pe baza unei tulpini nepatogene – produs brevetat sub denumirea de BIOZIN.

Bacteriile, alături de toate celelalte organisme vii, sunt o componentă a biosferei. Între acestea s-au stabilit relaţii de simbioză, sinergism sau antagonism. Antagonismul se referă la relaţiile între populaţiile de microorganisme, care limitează dezvoltarea unora dintre ele (Severin, 2006). Interacţiunile dintre bacteriile epifite patogene şi nepatogene au fost studiate *in vitro şi in vivo*, relaţii care au contribuit la realizarea unui concept de combatere biologică (Gipson, 1979; Zwet van şi Keil, 1979).

## 1.1 Prezentarea conceptului de „Lupta biologică”

Lupta biologică a fost definită de Organizaţia Internaţională de Lupta Biologică (OILB), ca o metodă de luptă cu organismele dăunatoare culturilor agricole şi silvice cu ajutorul altor organisme vii sau cu produse ale activităţii lor metabolice.

Aceste metode, datorită avantajelor mari pe care le prezintă şi anume: lipsă de toxicitate faţă de animale şi oameni, fitotoxicitate redusă şi caracter nepoluant, urmează ca în viitor să ocupe un loc mai important în combaterea bolilor plantelor (Severin V., 2006).

Controlul biologic al bacteriilor patogene pe plante prin aditie de microorganisme antagoniste este un mijloc cu potenţial nonhazard al controlului bolilor la plante.

În noul context al globalizării şi al Uniunii Europene cu 27 state membre (printre care şi România), implementarea reglementărilor comunitare privind direcţiile comune de dezvoltare pentru domeniul agricol devine o prioritate la plantele horti-viticole care sunt printre elementele de bază ale agriculturii şi industriei alimentare.

Combaterea biologică a agenţilor patogeni se poate realiza prin preimunizare şi antagonism.

### 1.1.1 Preimunizarea

Rezistenţa indusă este un fenomen nespecific, putând fi provocat prin preinoculare cu bacterii patogene nevirulente, saprofite sau virulente omorâte termic.

Fenomenul de inducere a rezistenţei plantelor faţă de o boală bacteriană prin expunerea prealabilă a plantei gazdă la celulele bacteriene sau cmponente ale acestora (Severin 2006) a fost explicat prin competiţia locusurile de ataşament specific pe peretele suprafeţelor rănite ale celulei gazdă. În literatura de specialitate sunt date o serie de rezultate: Goodman (1967) a obţinut protcţia tulpinilor de măr faţă de Erwinia amylovora prin preinoculare cu o tulpină avirulentă a acestui patogen sau cu o tulpină patogenă de *Pseudomonas syringae pv, tabaci* care nu parazitează mărul. Efectul a fost de inducere a rezistenţei la măr.

Severin şi Kupferberg (1979 ) au obţinut o preimunizare a fasolei la arsura bacterian[ folosind bacteriile Xanthomonas axonopodis pv. phaseolicola avirulent, cu Pseudomonas sevastanoi pv. phaseolicola rasa 1 şi rasa 2 omorâte termic şi Pseudomonas syringae pv. lachrymans, la infecţia cu Pseudomonas sevastanoi pv.phaseolicola rasa 2 celule vii. Efectul maxim s-a obţinut când preimunizarea a avut loc atunci când infecţia a avut loc după 24 ore. O formă deoasebiră de rezistenţă indusă, prin natura factorului inductor,

a fost obţinută la păr, soiul Bartlett faţă de infecţia cu Erwinia amylovora, prin infiltrarea în ţesuturile vegetale a ADN-ului extras de la o tulpină avirulentă a acestui patogen (McIntyre şi colab., 1975)

Un caz de rezistenţă indusă sepcifică este este cel provocat de preinocularea celulelor de avirulente sau omorâte, care previn formarea tumorilor la inocularea unei tulpni virulente.

### 1.1.2 Antagonismul

**Antagonismul** se referă la la relaţiile dintre populaţiile de microorganisme, care limitează dezvoltarea unora dintreele: aceste relaţii se bazează pe producerea de către o pupulaţie microbiană aunor substanţe metabolice toxice (antibiotice) sau competiţia pentru substanţele trofice. Antagonismul poate exista şi între plante şi unele populaţii bacteriene,

În cazul cercetrăilor noastre produsul biologic realizat la INCDCF Bucureşti se încadreasă în acest tip de combatee biologică, biopreparate având acţiune antibacteriană faţă de bacteriile patogene cercetate

*Pseudomonas syringae pv, tomato, Xanthomonas campestris, Erwinia amylovora, Agrobacterium tumefaciens*

În prezent se folosesc puţine produse destinate luptei biologice cu fitopatogeni, deoarece majoritatea metodelor de combatere biologică a patogenilor sunt înca în faza de cercetare.

## 1.2 Combaterea biologică a agenţilor patogeni

Combaterea biologică a bacteriilor fitopatogene cu bacterii saprofite are perspective mari de aplicare practică, de exemplu: *Pseudomonas fluorescens* este folosit în terapeutica arsurii bacteriene a rozaceelor; *Bacillus subtilis* stă la baza produsulelor *Serenade* şi *Systhem 3* folosite în combaterea arsurii rozaceelor.

Pentru combaterea cancerului bacterian la viţa de vie s-au obţinut rezultate tratând butaşii altoiţi înainte de plantare în şcoala de viţe cu tulpina HLB-2, eficace faţă de *Agrobacterium tumefaciens,* aparţinând biovarului 1, izolat de Xiaoyng în China, care a inhibat cancerul în proporţie ridicată (You si colab., 1990; Pu şi Goodman, 1993).

Pe plan internaţional s-au fabricat produse microbiene folosind tulpini de *Trichoderma harzianum şi Trichoderma viridae* care combate fungii filamentoşi şi controlează veştejirea plantelor cauzată de *Rhizoctonia, Sclerotium, Botrytis,* etc.

Produse biologice (biopraparate), au fost create şi în cadrul *I. C. D. P. P. Bucureşti* de F. Oancea (1995), care a realizat cercetări privind folosirea bacteriei *Bacillus subtilis* în combaterea biologică a unor fitopatogeni.

Constantinescu Florica (2000), a realizat cercetări privind folosirea bacteriilor *Bacillus* spp. în combaterea unor ciuperci fitopatogene.

### 1.2.1 Agentul etiologic

Bacteria *Agrobacterium radiobacter pv. tumefaciens* (Smith et Townsend) Kerr, Youngt Panagopoulus sin. *Agrobacterium tumefaciens (*Smith et Townsend) Conn.,1942; *Agrobacterium vitis* Ophel et Kerr, 1990 ordinul *Eubacteriales*.

Cancerul bacterian se caracterizează prin tumori cu proliferare continuă şi autonomie de creştere, transplantabile pe plante sănătoase şi cultivate pe medii sintetice.

Bacteriile se găsesc în cea mai mare parte la exteriorul tumorii, printre celulele epidermice. Unele tulpini virulente (*Art*) au un spectru larg de gazde, altele sunt specializate numai pentru anumite specii de plante. Există mai multe biotipuri de tulpini, în cadrul cărora există tulpini virulente (*Art*) şi tulpini avirulente (*Arr*).

Bacteriile au cel mai frecvent forma de bastonaşe izolate sau lanţuri scurte prevazute cu un singur cil, sunt gram nega-tive si neacidorezistente.

Pe mediu de gel si agar, acestea apar sub formă de colonii circulare, transparente, mici, netede, strălucitoare, mucilagi-noase. Pe diferiţi aminoacizi, bacteriile cultivate timp îndelungat pot să-şi piarda virulenţa parţial sau total.

Cancerul bacterian la viţa de vie este cunoscut de mult timp, fiind descris în Germania din anul 1822. iar în Franţa din 1853, fără să i se cunoască etiologia. Natura bacteriană s-a stabilit abia în anul 1920. fiind atribuit bacteriei *Agrobacterium tumefaciens.* Viţa de vie este planta afectată de cancer, aproape în toate ţările cultivatoare şi în deosebi unde condiţiile climatice favorizează evoluţia bolii. Cancerul bacterian este semnalat la toate plantele

La noi în ţară patogenul a fost semnalat de tr. Săvulescu pe rădăcini de măr. în 1929 în judeţul Argeş. Boala este este întâlnită la toate plantele dicotiledonate, deci gradul de infestare cu această bacterie fiind mare.

### 1.2.2 Simptomatologie

La viţa de vie, cancerul bacterian are două feluri de simptome, ambele pe părţile aeriene ale plantei şi se manifestă sub forma unor tumori sau gale, de forme şi dimensiuni diferite, rar pe părţile subterane.

La viţele tinere, tumorile apar la baza portaltoiului, la zona de calusare, de înrădăcinare şi la punctul de altoire. Mai târziu apar pe butuc, de regulă pe elementele lemnoase pe care anual se fac tăierile de rodire. La început tumorile sunt mici, de culoare albicioasă, spongioase, apoi cresc şi se întăresc,

devenind brune sau brune-închis, cu o consistenţă spongioasă dar întărită, cu aspect buretos.

Se pot întâlni două tipuri de simptome:

- cancerul propriu-zis ce se manifestă prin tumori bine conturate, sferice sau ovoidale – **figura 1-1**;
- ariceala care apare numai pe braţele mai vechi de un an şi pe tulpina viţelor la formele înalte. Se prezintă sub forma de proliferări continue pe lungimea braţului sau tulpinii, formate din aglomerări de gale canceroase mai mici (tumorete) pe o lungime mai mică sau mai mare a coardei – **figura 1-2**.



*a) Tumori pe scaunul butucului*



*b) Tumori pe brat*

***Figura 1-1** – Cancerul bacterian*

Majoritatea tumorilor putezesc la sfarşitul fiecarui an şi cad, în anul viitor apărând altele noi. Caracteristic pentru cancerul bacterian este apariţia de tumori secundare sau metastaze successive, la o distanţa oarecare de tumorea principală.

Viţele afectate de cancerul bacterian sunt debilitate, frunzele sunt slab colorate, lemnul se maturează insuficient, iar la soiurile cu struguri roşii, frunzele se coloreaza prematur în roşu. În cazul în care atacul se continuă mai mulţi ani la rând, planta piere în intregime.

### 1.2.3 Mecanismul de acţiune

Agentul patogen produce tumori canceroase prin emiterea unui principiu cancerigen şi a unei substanţe stimulatoare de creştere. New şi Kerr în anul 1972 au descris o bacteriocină produsă de *Arr* tulpina 84.

Pe aceasta au denumit-o *Agrocina 84* cu care s-au obţinut rezultate eficiente în combaterea cancerului. Astfel, la noi în ţara, N. Zinca a obţinut

rezultate bune în combaterea *Cancerului bacterian* prin folosirea biopreparatului Biozin pe baza de *tulpina 12 Arr.*



***Figura 1-2*** *– Proliferari continue pe brate (Ariceala)*

Agentul patogen se transmite prin:

- sol unde trăieşte saprofit pe resturile organice, (în special pe solurile nisipoase), unde îşi pastrează patogenitatea pâna la 3 ani;
- materialul de altoit recoltat de la plantele bolnave;
- instalaţii de forţare a viţelor nedezinfectate o data cu butaşii.

### 1.2.4 Epidemiologia bolii

Bacteria poate supraveţui în sol mai multi ani în funcţie de proprietăţile fizice şi chimice ale acestuia. S-a dovedit că exudatele rădăcinilor de porumb inhibă înmulţirea bacteriilor, pe când exudatele unor plante gazdă o stimulează. Răspândirea bacteriilor se realizează pe diferite căi: apă, praf, răni produse de grindină, lucrări în verde, instrumente agricole, etc.

Bacteriile pătrund prin răni care sunt esenţiale în procesul de patogeneză; bacteriile *Agrobacterium radiobacter* pv. *tumefaciens* introduse prin deschideri naturale, nu produc tumori. Perioada de incubaţie variază de la câteva săptămâni la un an, ceea ce face ca odată cu recoltarea viţelor în pepinieră cele infestate să aibă (aparent) un aspect sănătos.

Factorii favorizanţi ai infecţiei şi evoluţiei bolii sunt: temperatura cuprinsă între 15-25°C, umiditatea aerului de 75—80%, dar în special prezenţa leziunilor în scoarţă provocate de atacul insectelor, tăieri de formare, uşurare şi fructificare, grindină, ger.

Boala este favorizată şi de solurile umede, compacte, reci şi cu aciditate ridicată, de excesul îngrăşămintelor cu azot, iar în cazul administrării de îngrăşăminte complexe (N.P.K.) dozele de potasiu trebuie să fie superioare celor de azot.

Dintre factorii nefavorabili ai bolii, amintim: lumina puternică frânează evoluţia tumorilor, viţele cu manifestări de *"legno riccio"* prezintă în majoritatea cazurilor forme de aricească, bacteria instalându-se secundar, iar soiurile de viţă de vie cu cât sunt mai rezistente la îngheţ, cu atât sunt mai puţin atacate de cancerul bacterian.

### 1.2.5 Virulenţa

Din cercetările efectuate reiese că dezvoltarea tumorilor (aricealei) este influenţată de potenţialul genetic şi vârsta plantaţiilor cât şi de factorii ecologici, atingând o frecvenţă de 10-40% la soiurile cele mai sensibile, situate pe terenuri grele, umede şi reci, pe când pe versanţii expuşi la soare frecvenţa viţelor cu cancer se menţine sub 3%. În plantaţiile viticole din judeţul Vrancea fenomenul de debilitare s-a observat încă din primul an de la plantare. Tinerele plante de viţa de vie au creşteri mici, fapt ce determină o insuficientă maturare a lemnului şi astfel sensibilitate ridicată la temperaturile scazute înregistrate peste iarnă. Soiurile de vită de vie reacţionează diferit sub aspectul sensibilităţii faţă de atacul agentului patogen, aceasta fiind corelată cu sensibilitatea la ger. Plantele aparţinând speciilor Vitis flexuosa, V. piasezkii si V.amurensis sunt rezistente, dar nu foarte rezistente (Stoev şi colab.1997). Dupa Zinca (1970), în condiţile de cultură existente în România, soiurile foarte rezistente sunt Chardonnay, Fetească regală, Furmint, Muscat Ottonel, Pinot gris, Zghihară de Huşi, etc., iar foarte sensibile Afuz Ali, Ceaus roz, Italia, Merlot, Muscat de Hamburg, Regina viilor, etc..

## 1.3 Combaterea agentului patogen

### 1.3.1 Măsurile profilactice

Monocultura în pepiniere face ca o mare masă de rădăcini infectate, cat si tumoretele desprinse de pe plante, ramase in sol (**figura 1-3**) să perpetueze de la an la an atacul acestei bacterii.

Măsurile profilactice sunt singurele care au efect, cele curative fiind, de regulă ineficiente.

În acest sens se recomandă ca şcolile de viţă să fie amplasate pe terenuri uşoare care 3-4 ani au fost cultivate cu graminee sau lucernă.

Se recomandă o riguroasă selecţie fitosanitară, interzicându-se recoltarea materialului pentru altoit de la plante bolnave. În pepinieră şi plantaţii trebuie efectuat un control fitosanitar periodic pentru depistarea, eliminarea şi distrugerea materialului bolnav.

Plantările definitive, de asemenea, se vor face numai pe terenuri care 2-3 ani anterior au fost cultivate cu graminee sau lucernă.

Solul plantaţiilor defrişate trebuie menţinut curat de buruieni, când se urmăreşte replantarea cu viţa de vie deoarece bacteria este polifagă şi se poate transmite prin numeroase plante.




***a.*** ***b.***

***Figura 1-3*** *– Tumorete pe organele vegetative*
*a) tumora pe radacina b) tumora pe portaltoi si la punctul de altoire*

Fertilizarea, dacă este necesară, se va face cu mai puţin azot şi mai mult potasiu şi fosfor.

Vor fi adoptate forme de conducere corespunzătoare condiţiilor climatice, cu posibilităţi de protejare împotriva gerurilor.

La plantele infectate cu cancer bacterian pe lângă metodele amintite se va aplica o agrotehnică superioară, respectiv se vor lua măsuri eficiente de protejare a plantaţiilor împotriva temperaturilor scăzute acestea constituind principalul factor favorizant în declanşarea atacului de cancer bacterian. Tăierile se vor face întâi la plantele sănătoase apoi la cele cancerate, iar materialul vegetal rezultat la tăierea viţelor cancerate va fi ars. În plantaţiile bătrâne, viţele care prezintă tumori sau ariceală, vor fi curaţate şi uscăturile arse imediat. Prin îndepărtarea tumorilor, butucii nu sunt eliberaţi de infecţie, dar se constată o pornire mai bună în vegetaţie, plantele de viţă de vie sunt mai viguroase şi producţia creşte.

### 1.3.2 Măsuri chimice de combatere

**Tratamente preventive**

Ca măsură preventivă se recomandă îmbăierea materi-alului săditor într-o soluţie de sulfat de cupru 1% timp de 5 minute.

Dezinfectarea altoiului şi portaltoiului înainte de altoire cu Captan 0,2%, sulfat de cupru 2% sau Formalină 1% are un efect limitat, fiind eficace numai în prevenirea infecţiilor care se produc la altoit şi la fortat, nu şi a celor care se

realizează în sol dupa plantare sau a celor preexistente. După Zinca, 1970, cele mai bune rezultate obţinute la tratarea butaşilor altoiţi înainte de plantarea în şcoala de viţă au fost cele cu formol 1%.

Dezinfectarea instrumentelor folosite la operaţiunile de tăiere se face cu hipoclorit de sodiu în concentraţie de 10% sau formalină 3-5%.

După ce viţele au fost curăţate, înainte de pornirea în vegetaţie, coardele, braţele şi în special butucii vor fi stropiţi până la îmbăiere cu soluţie de sulfat de cupru în concentraţie de 4-5%.

**Tratamente curative**

În plantaţiile de viţă de vie, se aplică tratamente de combatere a bacteriilor fitopatogene cu substanţe chimice sintetizate nonbiologic a cărei substanţă activă are la bază elementul cupru, sub diferite moduri de formulare (oxid sau hidrohid), cum sunt Turdacupral 50 PU 0,4%, Funguran OH 50 PU 0,3%, Champion 50 PU 0,3%, etc, pe bază de captani cum sunt Captan 50 WP 0,2%, Captadin 50 PU, etc., începând din luna mai şi continuând până în luna august.

### 1.3.3 Măsuri biologice de combatere

Tratamentele biologice cu biopreparatul Biozin dau rezultate bune în combaterea cancerului bacterian la viţa de vie, dacă în paralel se aplică şi alte metode, precum şi o agrotehnică corespunzătoare.

O alternativă la produsul Biozin îl reprezintă produsul bacterian realizat şi brevetat de către I.N.C.D.C.F – I.C.C.F. Bucureşti şi testat în cadrul cercetărilor efectuate în proiectul de cercetare *"Solutii biologice de combatere a bacteriozelor patogene la plantele horti-viticole"*.

# 2. Obţinerea biopreparatelor

## 2.1 Cercetări efectuate pentru obţinerea biopreparatelor

Pentru obţinerea biopreparatului s-a pornit de la izolarea din surse naturale vegetale şi sol a microorganismelor. Izolatele au fost conservate pe medii specifice, în vederea caracterizării şi testării. Prin cultivări la nivel de flacoane agitate s-a realizat optimizarea concentraţiilor principalilor constituenţi ai mediului de cultură.

Pentru determinarea valorilor optime ale parametrilor de cultivarea (pH, agitare, aerare) şi obţinerea datelor necesare ridicării la scara a procesului au fost proiectate şi realizate experimentări pe un bioreactor de laborator cu volum total de 9L. Dinamica densităţii optice, a concentraţiei oxigenului dizolvat şi a valorii pH în timpul unei şarje tipice sunt prezentate în **figura 2-1.**

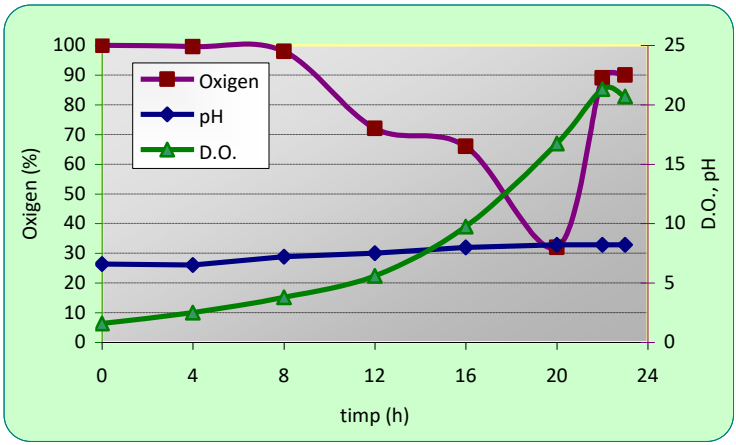



***Figura 2-1*** *– Dinamica parametrilor bioprocesului în cursul unei şarje tipice de cultivare a bacteriei B.subtilis*

## 2.2 Obţinerea produsului bacterian

Pe baza experimentelor realizate şi a analizei rezultatelor obţinute, s-a stabilit fluxul tehnologic (**figura 2-2**) şi schema tehnologică (**figura 2-3**) de obţinere a biopreparatelor la nivel pilot.

Principalele elemente definitorii ale tehnologie de obţinere a biomasei sunt:

- formula mediului de cultura: tărâţe de grâu - 2,5 g, extract de porumb - 1,5 g (50% s.u.), $KH_2PO_4$-0,15 g, $FeSO_4$ - 0,001 g, $MgSO4{\cdot}7H_2O$-0,05 g, apă robinet adus la 100 ml; pH=4 - 4,5, sterilizare 30 minute la 135°C.
- raport de inoculare 1-1,5%, temperatura: 30-32°C, condiţii de agitare/aerare 200 rpm/ 0,3 L/L/min; p: 0.4 atm; concentraţie de oxigen dizolvat mai mare de 20% din valoarea de saturaţie; durata bioprocesului: 22-25 ore.
- concentraţia finala a bioma-sei: 18-20 g/L.
- separarea şi uscarea bacte-riilor s-a făcut prin decantare/ floculare şi atomizare (temperatura de intrare: 170°C, temperatura de ieşire: 70°C) rezultând o pulbere bej-maronie, nehigroscopică, cu gust şi miros caracteristic ce conţine mai mult de 95% spori.

Pentru obtinere a unor biopre-parate utilizate pentru combaterea bacteriozelor patogene la plantele horti-viticole s-a avut în vedere elaborarea unei **tehnologii biotehnologice** compe-titive având la bază cercetări efectuate pe sisteme *in vitro* şi *ex vitro* specifice domeniului de realizare.

### 2.2.1 Testarea acţiunii bactericide a produselor biologice

**Teste privind acţiunea biomasei microbiene la nivel de laborator.**

Testarea preliminară la nivel de laborator a urmărit evidenţierea eficacităţii biopreparatelor pentru combaterea bacteriilor fitopatogene la tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) şi vinete (*Solanum melongena* L.).

**Testarea capacităţii de protecţie** a fost realizata cu biopesticidele realizate in laboratorul **I.N.C.D.C.F.-Bucuresti**, sub forma urmatoarelor biopreparate:

- **Bacterisin 1** (BSP+BSU) – izolat de pe pir şi cereale uscate (ICCF84+ICCF284);
- **Bacterisin 2** (BSP+BSO) – izolat de pe pir şi orz (ICCF84+ICCF382);
- **Bacterisin 3** (BSP+BSV) – izolate de pe pir şi plante medicinale (ICCF84 + ICCF285);
- **Bacterisin 4** (B4) (ICCF385) – izolat de pe frunze de foioase din pădure.

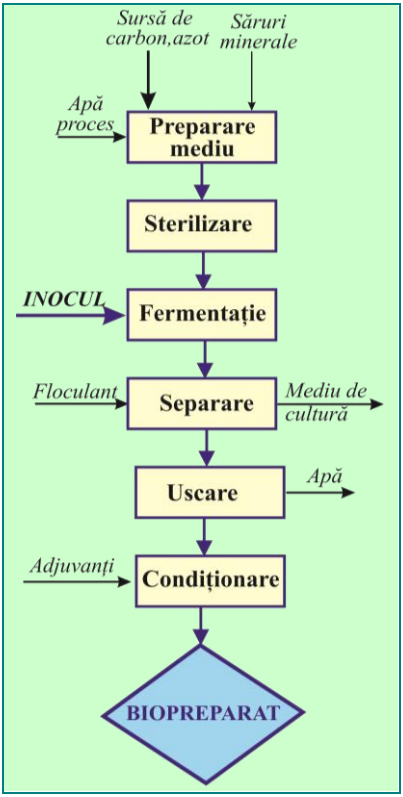



***Figura 2-2*** *– Schema de flux pentru obţinerea biopreparatului bacterian*

Pe semintele de tomate si vinete testarea capacitatii de protectie s-a efectuat la nivel de laborator prin:

- infectarea seminţelor cu bacterii fitopatogene (prin menţinerea într-o suspensie de celule bacteriene cu titru $10^7$ ufc/ml), timp de 2 ore;
- scoaterea seminţelor din soluţie şi menţinerea acestora pe hârtie de filtru uscată timp de 24 ore;
- tratarea seminţelor infectate, timp de 4 ore cu: soluţie de biopreparat Bacterisin 2 sau Bacterisin 1, în concentraţie 2% soluţie cu antibiotic 0,1% sau soluţie de sulfat de cupru 1%;
- pentru martor au fost realizate două variante, cu seminţe infectate şi netratate şi cu seminţe neinfectate şi netratate;
- apoi, seminţele au fost trecute în vase de cultură din plastic prevăzute cu câte două rondele din hârtie de filtru umectate cu apă distilată sterilizată.

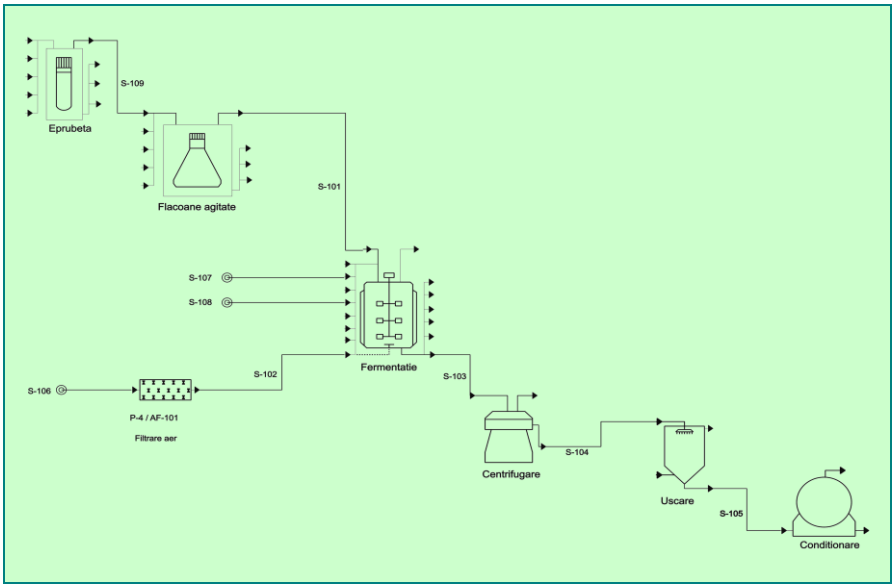



***Figura 2-3*** *– Schema procesului tehnologic de obţinere a biopreparatului*

Schema experimentala utilizata pentru testarea la nivel de laborator a biopreparatelor pentru combaterea bacteriilor fitopatogene în primele stadii de vegetaţie la tomate (*Lycopersicon esculentum*) si vinete (*Solanum tuberosum*) a constat in infectarea cu:

* *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria*:

V1–seminţe infectate, tratate cu biopreparatul Bacterisin 2
V2–seminţe infectate, tratate cu biopreparatul Bacterisin 1 2%
V3–seminţe infectate, tratate cu streptomicină - 0,1%
V4–seminţe infectate, tratate cu soluţie de sulfat de cupru 1%
V5–seminţe infectate şi netratate
V6–seminţe neinfectate şi netratate

** *Pseudomonas syringae pv. tomato*:

V1–seminţe infectate, tratate cu biopreparatul Bacterisin 2 2%
V2 – seminţe infectate, tratate cu biopreparatul Bacterisin 1 2%
V3–seminţe infectate, tratate cu streptomicină - 0,1%
V4–seminţe infectate, tratate cu sulfat de cupru - 1%
V5–seminţe infectate, netratate
V6–seminţe neinfectate, netratate

*** *Erwinia carotovora*:

V1–seminţe infectate, tratate cu biopreparatul Bacterisin 2 2%
V2–seminţe infectate, tratate cu biopreparatul Bacterisin 1 2%

V3–seminţe infectate, tratate cu streptomicină - 0,1%
V4–seminţe infectate, tratate cu soluţie de sulfat de cupru 1%
V5–seminţe infectate şi netratate
V6–seminţe neinfectate şi netratate
Pentru fiecare variantă s-au folosit 30 seminţe.

***Tabel 2-1*** *Influenţa biopreparatelor asupra germinării seminţelor de tomate (Lycopersicon esculentum L)*

| Varianta experimentală | Test de laborator | |
|---|---|---|
| | Energia germinativă (%) | Facultatrea germinativă (%) |
| ***Xanthomonas campestris pv. vesicatoria*** | | |
| V1 – infectat + Baccterisin 2 | 85,00 | 98,00 |
| V2 – infectat + Bacterisin 1 | 62,00 | 99,00 |
| V3 – infectat + streptimicină | 67,00 | 98,00 |
| V4 – infectat + sulfat de cupru | 62,00 | 91,00 |
| V5 – infectat şi netratat | 14,50 | 52,00 |
| V6 – neinfectat şi netratat | 76,00 | 92,00 |
| ***Pseudomonas syringae pv. tomato*** | | |
| V1 – infectat + Bacterisin 2 | 76,00 | 99,00 |
| V2 – infectat + Bacterisin 1 | 85,00 | 99,00 |
| V3 – infectat + streptomicină | 43,00 | 98,00 |
| V4 – infectat + sulfat de cupru | 70,00 | 93,00 |
| V5 – infectat şi netratat | 16,00 | 66,00 |
| V6 – neinfectat şi netratat | 43,00 | 98,00 |
| ***Erwinia carotovora*** | | |
| V1 – infectat + Bacterisin 2 | 85,00 | 98,00 |
| V2 – infectat + Bacterisin 1 | 84,00 | 97,00 |
| V3 – infectat + astreptomicină | 85,00 | 99,00 |
| V4 – infectat + sulfat de cupru | 43,00 | 91,00 |
| V5 – infectat şi netratat | 12,00 | 58,00 |
| V6 – neinfectat şi netratat | 19,00 | 82,00 |
| | DL 5% - 3,71 | DL 5% - 2,17 |
| | DL 1% - 4,95 | DL 1% - 2,90 |
| | DL 0,5% – 6,05 | DL 0,5% - 3,78 |

În cazul utilizării biopreparatelor în vederea protejării seminţelor cu produse biologice provenite din tulpini ale bacteriei *Bacillus subtilis* s-a constatat (**tabelul 2-1**) că preinfectarea cu bacteriile luate în studiu a indus protecţia la un nivel comparabil atât cu cel indus de streptomicină cât şi cu sulfatul de cupru.

***Tabel 2-2*** *Influenţa biopreparatelor asupra germinării seminţelor de vinete (Solanum melongena L.)*

| Varianta e experimentală | Test de laborator | |
|---|---|---|
| | Energia germinativă (%) | Facultatrea germinativă (%) |
| ***Xanthomonas campestris pv. vesicatoria*** | | |
| V1 – infectat + Bacterisin 2 | 83,00 | 97,00 |
| V2 – infectat + Bacterisin 1 | 66,00 | 98,00 |
| V3 – infectat + streptomicină | 68,00 | 97,00 |
| V4 – infectat + sulfat de cupru | 6400 | 93,00 |
| V5 – infectat şi netratat | 16,00 | 54,00 |
| V6 – neinfectat şi netratat | 79,00 | 96,00 |
| ***Pseudomonas syringae pv. tomato*** | | |
| V1 – infectat + Bacterisin 2 | 74,00 | 98,00 |
| V2 – infectat + Bacterisin 1 | 82,00 | 97,00 |
| V3 – infectat + streptomicină | 46,00 | 98,,00 |
| V4 – infectat + sulfat de cupru | 69,00 | 93,00 |
| V5 – infectat şi netratat | 14,00 | 69,00 |
| V6 – neinfectat şi netratat | 42,00 | 93,00 |
| ***Erwinia carotovora*** | | |
| V1 – infectat + Bacterisin 2 | 82,00 | 98,00 |
| V2 – infectat + Bacterisin 1 | 81,00 | 97,00 |
| V3 – infectat + streptomicină | 80,00 | 99,00 |
| V4 – infectat + sulfat de cupru | 42,00 | 92,00 |
| V5 – infectat şi netratat | 14,00 | 57,00 |
| V6 – neinfectat şi netratat | 20,00 | 84,00 |
| | DL 5% - 3,71 | DL 5% - 2,17 |
| | DL 1% - 4,95 | DL 1% - 2,90 |
| | DL 0,5% – 6,05 | DL 0,5% - 3,78 |

Produsele biologice testate Bacterisin 2 2% şi Bacterisin 1 2%) nu au afectat germinaţia seminţelor, iar concentraţia de 2 % a avut o acţiune biologică bună.

Dupa evaluarea parametrilor pentru germinatia semintelor a fost urmărita in continuare eficacitatea biologică a bioprepara-telor în condiţii controlate la nivelul plantulelor obtinute din semin-tele tratate cu biopreparate.

Nici unul din produsele testate nu a indus manifestarea unor simptome de fitotoxicitate.

Produsele biologice 2 2% şi Bacterisin 1 2%) au dovedit o eficacitate bună asupra evoluţiei plantelor.

***Tabel 2-3*** *Eficacitatea biologică a biopreparatelor în condiţii controlate, la tomate (% Plantule sănătoase)*

| Varianta experimentală | Agentul fitopatogen | | |
|---|---|---|---|
| | *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria* | *Pseudomonas syringae pv. tomato* | *Erwinia carotovora* |
| V1 – infectat + Bacterisin 2 | 96,00 | 89,25 | 86,00 |
| V2 – infectat + Bacterisin 1 | 95,00 | 89,00 | 92,75 |
| V3 – infectat + antibiotic | 92,00 | 80,00 | 83,00 |
| V4–infectat+sulfat de cupru | 88,00 | 84.00 | 86,00 |
| V5 – infectat şi netratat | 8,75 | 13,75 | 9,12 |
| V6 – neinfectat şi netratat | 12,75 | 20,50 | 19,75 |
| | DL 5% -26,09<br>DL 1% -34,40<br>DL 0,5% -45,80 | DL 5%-10,33<br>DL 1%-13,60<br>DL0,5%-17,75 | DL5%-12,43<br>DL1% - 4,15<br>DL0,5%-18,02 |

***Tabel 2-4*** *Eficacitatea biologică a biopreparatelor în condiţii controlate, la vinete (%Plantule sănătoase)*

| Varianta experimentală | Agentul fitopatogen | | |
|---|---|---|---|
| | *Xanthomonas campestris pv.vesicatoria* | *Pseudomonas syringae pv. tomato* | *Erwinia carotovora* |
| V1 – infectat + Bacterisin 2 | 93,00 | 88,00 | 87,00 |
| V2 – infectat + Bacterisin 1 | 92,00 | 89,00 | 92,00 |
| V3 – infectat + antibiotic | 92,00 | 82,00 | 84,00 |
| V4–infectat + sulfat de cupru | 87,00 | 81,00 | 83,00 |
| V5 – infectat şi netratat | 7,50 | 10.50 | 9,80 |
| V6–neinfectat, netratat | 14,00 | 21,00 | 20,00 |
| | DL 5% - 26,09<br>DL 1% - 34,40<br>DL 0,5% - 45,80 | DL 5%- 10,33<br>DL 1%- 13,60<br>DL 0,5%- 17,75 | DL5%-12,43<br>DL1%-14,15<br>DL0,5%-18,02 |

### 2.2.2 Testarea acţiunii bactericide a produselor biologice

**Teste privind acţiunea biomasei microbiene pe plante de viţă de vie**

În acest sens cercetările efectuate s-au îndreptat spre selecţionarea unor biopreparate, reprezentând tulpini de microorgansime cu acţiune de limitare a atacului produs de bacteria fitopatogena Agrobacterium tumefaciens.

Astfel, s-au testat tulpinile de *Bacillus subtilis*, provenite de la INCDCF-Bucureşti sub formă de biopreparate:

-Bacterisin 1

-Bacterisin 2

-Bacterisin 3

-Bacterisin 4

Acţiunea bactericidă a acestor produse biologice a fost testată pentru combaterea agentului patogen *Agrobacterium tumefaciens*.

*"In vitro"* s-a folosit metoda includerii în mediul de cultură pentru fiecare produs, pe care s-a inoculat bacteria luata în studiu, obţinută din culturi pure. În funcţie de dezvoltarea coloniilor s-a înregistrat procentul de inhibiţie şi s-a calculat concentraţia limită şi coeficientul de corelaţie.

Bioprepartele au fost testate preventiv, pentru protejarea materialului de înmulţire la altoire, prin aplicarea tratatmentelor cu produsele selecţionate în laborator.

În vederea stabilirii concentraţiei cu acţiunea cea mai bună, s-au testat mai multe diluţii în mediul de cultură, pentru fiecare produs biologic în parte (de 12%, 10%,8%,4%).

Pe mediul de cultură pregătit şi repartizat în Petri cu diametrul de 8 cm, s-a repicat bacteria luată în studiu. La interval de 3 zile, timp de 15 zile, s-a notat dezvoltarea coloniilor patogene pe substrat cu biopreparatul inclus – **figura 2-4**.

Rezultatele au fost atestate statistic prin calculul concentraţiei limită (CL%) şi a coeficientului de corelaţie (CC). Concentratia limită de 50% a fost situată la valori de 2%.




***a) Bacterisin 3 – 4%*** ***b) Bacterisin 4 – 12%***

***Figura 2-4*** *– Actiunea biologica a biopreparatelor ila diferite concentratii asupra dezvoltarii cancerului bacterian*

În urma cercetărilor efectuate, din **tabelul 2-5** se observă că bioprodusele testate au inhibat dezvoltarea coloniilor *bacteriei Agrobacterium tumefaciens,* până la concentraţie de 4%. La concentraţii mai mici, ca de exemplu la 3%, coloniile s-au dezvoltat, ocupând suprafaţa mediului între 12,46 -25,96 % (notat în **tabelul 2-5** ca procent de inhibiţie). Produsul provenit de la tulpina BSP+BSU (Bacterisin 1) a demonstrat o acţiune inhibitoare puternică, bacteria dezvoltându-se doar la concentraţia de 2%, unde procentul de inhibiţie a fost de 48,23% (**tabelul 2-5**).

***Tabel 2-5*** *Acţiunea biologică a unor biopreparate asupra dezvoltării unor bacterii patogene*

| Biopreparat | Conc. (%) | *Agrobacterium tumefaciens* | | |
|---|---|---|---|---|
| | | % de Inhibitie | CL*- 50% | CC** |
| Bacterisin 2 | 4,0 | 100,00 | 1,97 | 0,927 |
| | 3,0 | 87,54 | | |
| | 2,0 | 68,53 | | |
| Bacterisin 4 | 4,0 | 98,57 | 2,98 | 0,945 |
| | 3,0 | 52,11 | | |
| | 2,0 | 17,99 | | |
| Bacterisin 3 | 4,0 | 100,00 | 2,69 | 0,879 |
| | 3,0 | 77,19 | | |
| | 2,0 | 38,95 | | |
| Bacterisin 1 | 4,0 | 100,00 | 2,70 | 0,935 |
| | 3,0 | 81,11 | | |
| | 2,0 | 48,23 | | |
| Martor netratat | - | 0,00 | - | - |

*CL - Concentraţie limită ; **CC - Coeficient de corelaţie

Prin utilizarea bioproduselor în concentraţie de 4% s-a asigurat o bună protecţie a coardelor de Fetească neagră, infectate natural cu bacteria patogenă *Agrobacterium tumefacien* provenite de la S.C.D.V.V. Odobeşti. Pornirea în vegetaţie a lăstarior şi dezvoltarea lor a fost bună. Analizând fragmente din aceste coarde, dispuse pe mediu de cultură peptonă-glucoză-agar, s-a urmarit modul în care s-au dezvoltat colonii ale bacteriei *Agrobacterium tumefaciens.* Astfel, la martorul netratat, procentul de plante sănătoase fiind de 6% (**tabelul 2-6**).

Coardele tratate cu bacterisin 1 în concentraţie de 4% a asigurat un procent de plante sănătoase de 82%; cele îmbăiate în bacterisin 2 4% a asigurat un procent de plante sănătoase de 89%; produsul bacterisin 3 4% a protejat coarele în procent de 77%. Cele mai bune rezultate s-au obţinut la produsul Bacterisin 4, care a asigurat un procent de 92% plante sănătoase.

***Tabel 2-6*** *Eficacitatea unor biopreparate în condiţii controlate. Soiul Fetească neagră*

| Varianta | Conc.% | % plante sănătoase |
|---|---|---|
| Bacterisin 1 | 4 | 82,00 |
| Bacterisin 2 | 4 | 89,00 |
| Bacterisin 3 | 4 | 77,00 |
| Bacterisin 4 | 4 | 92,00 |
| Martor netratat | - | 6,00 |

Coardele provenind de la butuci cu simptom de cancer bacterian prelevate din plantaţia viticolă existentă la S.C.D.V.V. Odobeşti de la diferite

soiuri, au fost ţinute în soluţia produselor biologice la concentraţia de 4% timp de 2 ore, după care au fost păstarte în tăvi cu apă – Foto 6. Observaţiile s-au efectuat după pornirea fragmentelor de coarde în vegetaţie (**tabelul 2-7**).

***Tabel 2-7*** *Pornirea în vegetaţie a fragmentelor de coarde la diferite soiuri afectate de cancerul bacterian*

| Soiul | Bioprodusul | Conc. (%) | Pornire în vegetaţie |
|---|---|---|---|
| Muscat de Hamburg | Bacterisin 2 | 4 | slabă |
| | Bacterisin 3 | 4 | f. slabă |
| | Bacterisin 4 | 4 | bună |
| | Mt. sănătos | - | bună |
| Fetească neagră | Bacterisin 2 | 4 | bună |
| | Bacterisin 3 | 4 | slabă |
| | Bacterisin 4 | 4 | f. bună |
| | Mt. sănătos | - | bună |
| Muscat d'Adda | Bacterisin 2 | 4 | bună |
| | Bacterisin 3 | 4 | bună |
| | Bacterisin 4 | 4 | f. bună |
| | Mt. sănătos | - | bună |
| Galbenă de Odobeşti | Bacterisin 2 | 4 | bună |
| | Bacterisin 3 | 4 | slabă |
| | Bacterisin 4 | 4 | f. bună |
| | Mt. sănătos | - | bună |

După testarea bioproduselor pe diferite soiuri şi analizarea efectelor generate, reiese faptul că soiul Muscat de Hamburg este cel mai sensibil la atacul de cancer bacteian, iar dintre bioproduse cu rezultatele cele mai bune se evidentiază B4 izolat de pe frunze de foioase din padure – **figura 2-5**.




*a. Muscat de Hamburg* *b. Muscat D'Adda*

***Figura 2-5*** *– Actiunea bioprodusului Bacterisin 4 (B4) asupra fragmentelor de coarda*




***Figura 2-6*** *– Pornirea in vegetatie a fragmentelor de coarde la diferite soiuri de vita de vie tratate cu bioproduse (Bacterisin 4 – B4; Bacterisin 3 – BSV; Bacterisin 2 – BSO)*

### 2.2.3 Eficacitatea produselor biologice folosite în vederea protejării culturii şi a materialului săditor la viţa de vie

În cadrul cercetărilor efectuate au fost testate în plantaţiile de viţă de vie, pe rod, existente la S.C.D.V.V. Odobeşti şi în complexul de altoire şi forţare cat şi în pepiniera de viţă de vie existentă la S.C.D.V.V. Bujoru bioproduse obţinute de I.C.D.C.F. Bucureşti.

Aceste bioproduse aplicate asupra plantelor prin stropire, în concentraţie de 4% au inhibat diferenţiat dezvoltarea coloniilor bacteriene de *Agrobacterium tumefaciens*.

Varianta martor – tratată cu un produs fitofarmaceutic chimic (standardul chimic) folosită a fost reprezentată prin produsul comercial Funguran OH 50 PU, aplicat prin stropirea plantei, în concentraţie 0,3%. Prin aplicarea tratamentul la varianta martor, cu produsul Funguran OH 50 PU, gradul de inhibiţie al dezvoltării bacteriei este de 14,58% - **tabelul 2-8**.

În ceea ce priveşte folosirea bioproduselor în schema de tratament prin aplicarea în combinaţie a bioproduselor Bacterisin 1 si Bacterisin 2, se înregistrează o reacţie de răspuns cu eficacitate bună, procentul de inhibiţie

fiind de 12,50%. Se constată faptul că standardul chimic se situiază deasupra bioprodusului Bacterisin 1 - **tabelul 2-8**.

***Tabel 2-8*** *Frecvenţa atacului de cancer bacterian (Agrobacterium tumefaciens) la soiul Fetească neagră*

| Varianta | Produsul/ Conc. | Repetiţia | Nr. butuci analizaţi | Nr. butuci cu atac | Frec-venţa (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| V1 | Bacterisin 1 4% | 1 | 24 | 6 | 25,00 |
| | | 2 | 24 | 4 | 16,66 |
| | | 3 | 24 | 5 | 20,83 |
| **Media** | | | **24** | **5** | **20,83** |
| V2 | Bacterisin 2 4% | 1 | 24 | 2 | 8,33 |
| | | 2 | 24 | 4 | 16,66 |
| | | 3 | 24 | 3 | 12,50 |
| **Media** | | | **24** | **3** | **12,50** |
| V3 | Bacterisin 4 4% | 1 | 24 | 4 | 16,60 |
| | | 2 | 24 | 1 | 4,17 |
| | | 3 | 24 | 4 | 16,66 |
| **Media** | | | **24** | **3** | **12,50** |
| V4 | Martor chimic 0,3% (Funguran OH 50 PU) | 1 | 24 | 5 | 20,83 |
| | Martor chimic 0,3% (Funguran OH 50 PU) | 2 | 24 | 2 | 8,33 |
| | Martor chimic 0,3% (Funguran OH 50 PU) | 3 | 24 | 3,49 | 14,58 |
| Media | | | 24 | 3,49 | 14,58 |
| Martor netratat | - | - | 57 | 13 | 22,81 |

***Tabel 2-9*** *Numărul mediu de tumori si dimensiunile lor pe variantele studiate*

| Varianta | Produsul | Conc. (%) | Nr. mediu de tumori | Diametrul tumorii (cm) |
|---|---|---|---|---|
| **V1** | Bacterisin 1 | 4 | 0,20 | 0,2-4,0 |
| **V2** | Bacterisin 2 | 4 | 0,58 | 0,1-0,5 |
| **V3** | Bacterisin 4 | 4 | 0,33 | 0,1-2,0 |
| **V4** | Funguran OH 50 PU | 0,3 | 0,50 | 0,1-2,1 |
| **Mt. netratat.** | | - | 0,45 | 0,6-4,5 |

În acest caz dimensiunile tumorilor au variat între 0,1 şi 4,5 cm, iar gradul de atac a fost cuprins între 0,05 - la bioprodusele Bacterisin 1 şi Bacterisin 4 şi 0,30 - la varianta martor tratat chimic cu Funguran OH 50 PU (**tabelul 2-9**).

Privind eficacitatea produselor folosite, se poate spune acelaşi lucru, astfel din datele prezentate în **tabelul 2-10**, se observă că aceasta este de 96% la cele două biopesticide - Bacterisin 1, Bacterisin 4 şi de 93% la biopesticidul Bacterisin 2. În consecinţă, acţiunea inhibitoare fiind foarte puternică comparativ cu varianta martor tratată chimic, unde eficacitatea este de 71%.

***Tabel 2-10*** *Gradul de atac a cancerului bacterian al viţei de vie pe variante*

| Varianta | Produsul | Conc. (%) | F (%) | I (%) | GA (%) | E (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| V1 | Bacterisin 1 | 4 | 20,83 | 0,20 | O,05 | 96,00 |
| V2 | Bacterisin 2 | 4 | 12,50 | 0,58 | 0,08 | 93,00 |
| V3 | Bacterisin 4 | 4 | 12,50 | 0,40 | 0,05 | 96,00 |
| V4 | Funguran OH 50 PU | 0,3 | 14,58 | 2,10 | 0,30 | 71,00 |
| Mt. netratat | | - | 22,81 | 4,50 | 2,02 | 0 |

Din testele efectuate în condiţii controlate s-a constatat faptul că în urma efectuării tratamentelor apar diferenţe, de expresie morfologică, graduate, determinate de sensibilitatea soiului. În aceleaşi condiţii experimentale s-a observat faptul că temperatura optimă pentru dezvolterea cancerului este de 22-30˚C, iar umiditatea relativa de 80%. Temperaturile de peste 30˚C şi umiditate relativă peste 80% inhibă dezvoltarea tumorilor. Lumina are un efect inhibitor asupra procesului de tumorogeneză.

Evoluţia bolii este favorizată şi de o serie de factori pedoclimatici, fiziologici şi tehnologici dintre care amintim: solurile umede şi compacte, accidente climatice (grindina), atacul nematozilor, lipsa de afinitate între altoi şi portaltoi, aplicarea îngrăsămintelor cu azot.

***Tabel 2-11*** *Cantitatea şi calitatea producţiei de struguri obţinută la soiul Fetească neagră - Odobeşti 2008-2009*

| Specificare | Tip tratament | Cantitate medie, Kg/plantă | Zahăr g/l | Aciditate g/l |
|---|---|---|---|---|
| Plantă bolnavă | Biologic | 2,90 | 190.22 | 6,5 |
| | Chimic | 2,89 | 190.02 | 6,4 |
| Martor sănătos | Netratat | 4,88 | 200,53 | 5,9 |

Din datele centralizate în **tabelul 2-11** se observă faptul că între variantele tratate cu bioproduse şi produsul chimic (standardul chimic) nu au existat diferenţe semnificative în ceea ce priveşte cantitatea şi calitatea producţiei. Diferenţe au existat între plantele bolnave şi cele sănătoase. Acelaşi lucru se poate spune şi despre maturarea coardelor. În unele cazuri s-a observat faptul că o ramură a unui butuc bolnav s-a uscat, dar din plantă (din scaunul butucului) a pornit un lăstar lacom care s-a dezvoltat, ulterior dând naştere la o ramură viguroasă – **figura 2-7**.

Din testele bacteriologice efectuate „in vitro”, pe medii de cultură, s-a observat faptul că în acest caz bacteria este prezentă, activă şi trecută pe mediu de cultură „in vitro” s-a dezvoltat rapid.



***Figura 2-7*** *– Lastar cu aspect sănătos pornit din butuc bolnav*

## 2.3 Tehnologia de combatere a bacteriozelor la la viţa de vie

Pentru prevenirea şi combaterea cancerului bacterian al viţei de vie se are în vedere aplicarea unui complex de măsuri tehnologice, agrotehnice, fizice, chimice şi biologice denumit generic *“combatere integrată”*.

Tehnologia de *“combatere integrată”* a cancerului bacterian al viţei de vie reprezintă o îmbinare a metodelor de prevenire şi combatere dar şi a diferitelor produse fito-farmaceutice. Asupra ansambului de metode de combatere, putem enumera următoarele tipuri de metode folosite, astfel:

- metode agrofitotehnice;
- metode tehnologice;
- metode chimice;
- metode biologice.

În principiu toate aceste metode se aplică – teoretic - numai atunci când sunt justificate din punct de vedere economic, respectiv când se depăşeşte pragul economic de dăunare (PED).

Având în vedere virulenţa agentului patogen, capacitatea de multiplicare, rata mare de supravieţuire cât şi capacitatea tehnologică limitată în combatere, prin mijloace şi metode cunoscute, de o mare importanţă se bucură metodele preventive, prin care se obţine efectul maxim de micşorare a pagubelor produse de cancerul bacterian. În acest context o importanţă deosebită prezintă următoarele aspecte:

- alegerea terenului în funcţie de cerinţele soiului şi de gradul de infestare al acestuia;
- stabilirea distanţelor de plantare;
- folosirea corectă şi la timp a măsurilor de igienă culturală;
- depistarea precoce a tumorilor, înlăturarea acestora şi/sau extirparea braţelor cu tomori şi/sau chiar a tulpinilor şi arderea acestora;
- înlocuirea elementelor de rod bătrâne afectate cu elemente tinere;
- scoaterea întregului butuc, ambalare şi transportul părţii lemnoase rezultate după extragerea plantei din plantaţie, în condiţii de izolare pentru prevenirea infectării solului şi arderea acestora;
- folosirea erbicidelor pentru combaterea buruienilor ce pot constitui plante gazdă pentru agentul patogen.

Până în prezent s-a demonstrat faptul că cea mai simplă metodă de control a evoluţiei agentului patogen care produce cancerul bacterian este metoda chimică. Aceasta constituie un ansamblu de tratamente, efectuate într-o anumită succesiune, cu produse fito-farmaceutice, în concentraţii şi momente clar stabilite. Este recomandat ca momentul începerii tratamentelor va fi stabilit de către specialişti, prin avertizare, şi bine determinat în funcţie de criteriul biologic, ecologic si fenologic.

În acest sens, la viţa de vie, se aplică tratamente profilactice sau de combatere a bacteriilor fitopatogene cu substanţe chimice sintetizate nonbiologic a carei substanţa activă are la bază elementul cupru, sub diferite moduri de formulare (oxid sau hidroxid), cum sunt Turdacupral 50 PU 0,4%, Funguran OH 50 PU 0,3%, Champion 50 PU 0,3%, etc, pe bază de captani cum sunt Captadin 50 PU 0,2%, Captan 50 WP – 0,2%, etc., începând din luna mai şi continuând până în luna august. De asemenea, în plantaţiile tehnologice destinate producţiei de struguri se pot aplica şi tratamente profilactice în momentul efectuării tăierilor de fructificare şi/sau în plantaţiile mamă furnizoare de coarde altoi/portaltoi în momentul recoltării coardelor.

De menţionat este faptul că atât timp cât bacteria este prezentă în sistemul vascular al plantei de viţă de vie **până în prezent nu s-a obţinut şi/sau testat o substanţă activa care să o combată total**.

În contextul aprofundării principiilor de *„**combatere integrată”*** şi **în anumite condiţii** ce impun diminuarea toxicităţii şi a efectelor secundare a produselor chimice, aplicate în agricultură, se pot utiliza atât produsele

chimice cât şi cele biologice, într-un program de combatere bine definit şi în proporţii diferite.

***Tabel 2-12*** *Schema de tratament cu folosirea biopreparatelor în cadrul programului de combatere integrată a cancerului bacterian la viţa de vie*

| Nr. crt. | Faza de creştere şi dezvoltare a viţei de vie | Denumire produs | Conc. (%) | GA (%) | E (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | În momentul efectuării tăierilor de fructificare. | Bacterisin 1 | 4,0 | 0,06 | 97,02 |
| | | Bacterisin 2 | 4,0 | 0,08 | 96,03 |
| | | Bacterisin 3 | 4,0 | 0,10 | 95,12 |
| | | Bacterisin 4 | 4,0 | 0,05 | 97,52 |
| | | Mt.Chimic Funguran OH 50 PU | 0,3 | 0,30 | 87,9 |
| | | Mt. netratat | - | 2,02 | - |
| 2 | Dezmugurit | Bacterisin 1 | 4,0 | 0,41 | 95,12 |
| | | Bacterisin 2 | 4,0 | 0,45 | 77,72 |
| | | Bacterisin 3 | 4,0 | 0,49 | 75,74 |
| | | Bacterisin 4 | 4,0 | 0,38 | 81,18 |
| | | Mt.Chimic Funguran OH 50 PU | 0,3 | - | 65,84 |
| | | Mt. netratat | - | 2,02 | - |
| 3 | Carnit | Bacterisin 1 | 4,0 | 0,21 | 89,60 |
| | | Bacterisin 2 | 4,0 | 0,20 | 90,09 |
| | | Bacterisin 3 | 4,0 | 0,22 | 89,10 |
| | | Bacterisin 4 | 4,0 | 0,18 | 91,08 |
| | | Mt.Chimic Funguran OH 50 PU | 0,3 | 0,58 | 71,28 |
| | | Mt. netratat | - | 2,02 | - |
| 4 | Desfrunzit | Bacterisin 1 | 4,0 | 0,21 | 89,60 |
| | | Bacterisin 2 | 4,0 | 0,20 | 90,09 |
| | | Bacterisin 3 | 4,0 | 0,22 | 89,10 |
| | | Bacterisin 4 | 4,0 | 0,18 | 91,08 |
| | | Mt.Chimic Funguran OH 50 PU | 0,3 | 0,58 | 71,28 |
| | | Mt. netratat | - | 2,02 | - |

În cadrul cercetărilor efectuate, s-a stabilit o schema de ***„combatere integrată”*** (**figura 2-8**) şi o ***„schemă de tratament”*** (**tabelul 2-12**) menită să conducă la combaterea agentului patogen *Agrobacterium tumefacines* care produce boala denumită *„Cancerului bacterian al viţei de vie”*.

O alternativă la combaterea chimică, a agentului patogen, o constituie folosirea mecanismelor antagonice existente între diferite specii şi genuri de bacterii. Reacţia antagonistă manifestată se caracterizează, pe de o parte, prin ocuparea gazdei (a plantei) cu o bacterie care să nu genereze manifestări patogene şi care să conducă la imposibilitatea infectării plantelor, respectiv a tesuturilor şi organelor prin sistemul vascular libero-lemnos, cu agentul

patogen care produce cancerul bacterian al viţei de vie, respectiv - *Agrobacterium tumefaciens*.

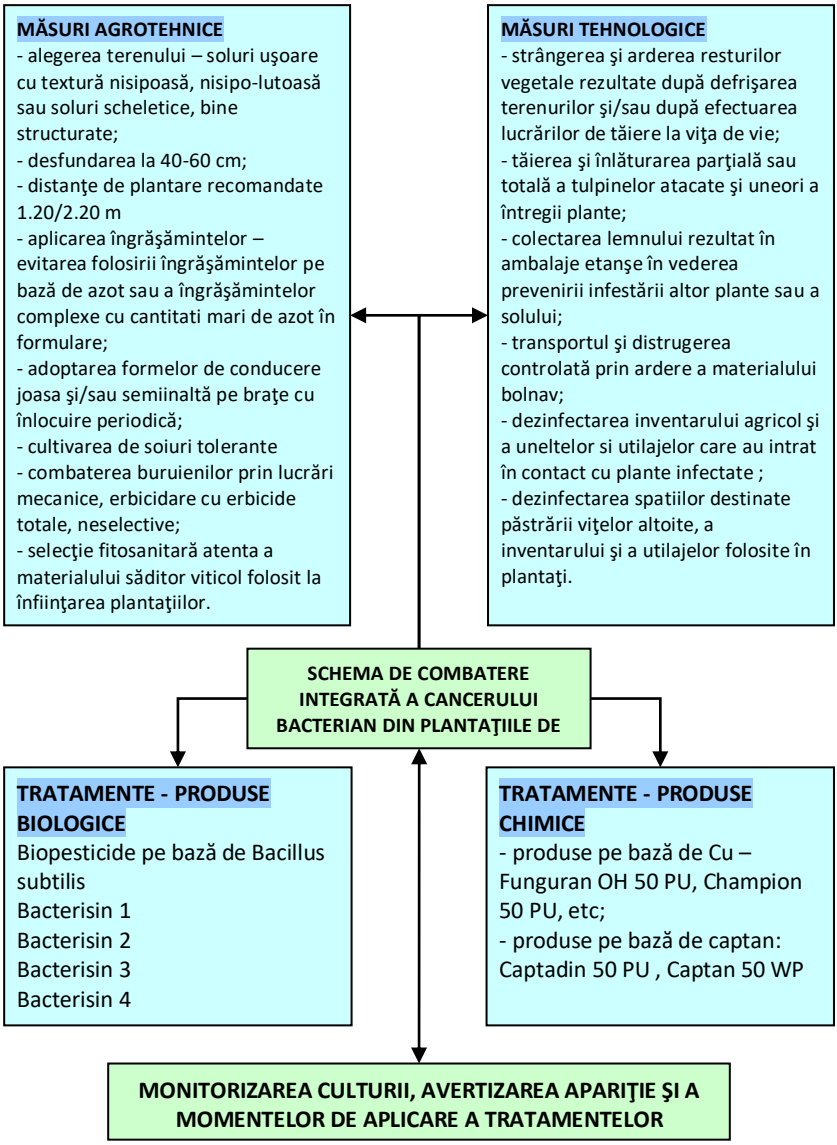



***Figura 2-8*** *– Schema de combatere integrată a cancerului bacterian în plantaţiile de viţă de vie*

Un incovenient, în ceiea ce înseamna aplicarea produselor biologice respectiv a preparatelor bacteriene, îl reprezintă costul per unitatea de

tratare. Produsele bacteriene sunt încă destul de scumpe, iar aplicarea necesită cunostinţe aprofundate de microbiologie încât adresabilitatea acestora fiind deocamdată restransă şi limitată.

În acest context recomandăm folosirea preparatelor bacteriene în schemele de combatere a bacteriozelor determinate de *Agrobacterium tumefaciens* la **plantele cu „valoare ridicată”** asa cum sunt plantele mamă furnizoare de coarde altoi/portaltoi, din **„categoriile biologice superioare” .**

Aceste plante au ca destinaţie producerea coardelor altoi/portaltoi, **destinate** producerii materialui săditor, cu care se vor **înfiinţa plantaţiile mamă COMERCIALE** furnizoare de coarde altoi/portaltoi din categoria biologică ***„Certificat”***.

De asemenea, recomandăm folosirea biopreparatelor pentru dezinfectarea coardelor altoi şi portaltoi pentru producerea viţelor altoite, a spaţiilor destinate altoirii şi forţării, în vederea producerii viţelor altoite şi NU pentru tratamentul în culturile comerciale de viţă de vie destinate producerii de struguri pentru masă şi/sau vin.

### 2.3.1 Tehnologia de combatere integrată a bacteriozelor în procesul de producere a materialului săditor la viţa de vie

De la invazia filoxerei în Europa începând cu anul 1863 înmulţirea viţei de vie s-a complicat obligând viticultorii la cheltuieli suplimentare, creându-se un sector distinct în cadrul viticulturii. Acest sector a capatat o importanţă deosebită odată cu raspândirea bolilor bacteriene şi virotice care produc pagube însemnate materialului săditor viticol putând ajunge până la distrugerea unor plantaţii cu viţă de vie.

Extinderea în cultură a cancerului bacterian al viţei de vie ar constitui o adevărată catastrofă economică pentru viticultura naţională şi internaţională.

Înmulţirea viţei de vie prin altoire este arta de a uni părţi din plante diferite, astfel încât acestea să-şi continue creşterea ca o plantă unică (Hortman şi Kester, 1965).

În prezent măsurile profilactice sunt singurele care pot da rezultate, dintre care cele agrotehnice au un rol mai



***Figura 2-9*** *– Butaşi altoiţi*

imporatant, astfel:

- scolile de viţă vor fi amplasate pe ternuri uşoare care timp de 3-4 au fost cultivate cu graminee sau lucernă, în vederea distrugerii faunei dăunătoare din sol;
- materialul pentru înmulţirea vegetativă va fi recoltat numai de la plante sănătoase;
- înainte de plantare viţele vor fi triate, eliminându-se tot materialul infestat:
- plantările definitive se vor face numai pe terenuri care 2–3 ani au fost cultivate cu plante monocotiledonate sau lucernă;
- în apa cu care se prepară mocirla în care se cufundă rădăcinile viţelor înainte de plantare, se pot adăuga unele fungicide care asigură viţelor o bună protecţie faţă de infecţiile cu cancer din sol (sulfat de cupru 1 %, Captadin 50 PU - 1%, Topas EC- 0,025%, etc.).



***Figura 2-10*** *– Parafinarea viţelor dupa forţare*



***Figura 2-11*** *– Stratificarea butaşilor în rumeguş*

În majoritatea ţărilor viticole bolile produse de fitoplasme, viruşi, viroizi, ciuperci patogene şi bacterii provoacă pagube însemnate plantaţiilor viticole. După infectarea plantelor, populaţiile agenţilor patogeni cu virulenţă deosebită nu mai pot fi controlate prin metode clasice, iar viţele intră în declin. Din aceste considerente, la producerea materialului săditor viticol este necesar protejarea viţelor altoite impotriva cancerului bacterian al viţei de vie.

În cadrul cercetărilor efectuate la S.C.D.V.V. Bujoru cu tulpini de *Bacillus subtilis* (condiţionat sub forma unei pulberi – Bacterisin 1 folosit la obţinerea de soluţie cu concentraţie de 4%), în prevenirea şi combaterea bacteriei patogene s-au testat următoarele soiuri: Muscat de Hamburg, Merlot şi Fetească regală. Astfel, s-au efectuat observaţii şi determinări cu privire la eficacitatea tratamentelor cu biopesticid împotriva cancerului bacterian. Modelul experimental a fost amplasat în şcoala de viţe a S.C.D.V.V. Bujoru.

Cercetările în şcoala de viţe au vizat realizarea unei scheme de tratament pentru aplicarea biopreparatelor în combaterea cancerului bacterian, stabilirea momentului optim de aplicare în corelaţie cu procesul de producere a materialului săditor viticol, astfel:



***Figura 2-12*** *– Stratificarea butaşilor în vederea forţării*

- **pregătirea coardelor portaltoi**: coardele portaltoi au fost scoase din siloz şi introduse în apă pentru rehidratare şi apoi s-a făcut orbirea butaşilor portaltoi;

**-pregătirea coardele altoi**: coardele altoi după scoaterea de la păstrare sunt fasonate şi introduse pentru umectare în bazine, cu soluţie de biopesticid 4%;

**- altoirea şi tratamentul butaşilor:** coardele altoi şi portaltoi astfel pregătite s-au altoit la masă, în uscat, îmbinarea făcându-se în omega. După acesta butaşii s-au înmuiat în soluţie de Calovit 1,5% prin imersia capatului superior, timp de 2-3 secunde, iar dupa zvântare s-au parafinat – **figura 2-9**.

**- parafinarea viţelor altoite** s-a efectuat cu parafină Rebwachs WF (0,00175% 2.5 dinchloro-benzoiqui si 0,1% oxyquinoleine) la tempera-tura de 68-75$^0$C – **figura 2-10**.

**- stratificarea butaşilor altoiţi** s-a făcut în rumeguş, prin acoperire parţială a butaşilor – **figura 2-11**.

**- forţarea butaşilor altoiţi** durează o perioadă de 18-20 de zile şi s-au aplicat din trei în trei zile stropiri cu Cryptonol 2,5% pentru a preveni apariţia şi dezvoltare a putregaiului cenuşiu şi a cipercilor din genurile *Alternaria* spp. si *Fusarium spp*. – **figura 2-12**.



***Figura 2-13*** *– Clasarea butaşilor scoşi de la forţat*

**- clasarea butaşilor scoşi de la forţat** s-a efectuat prin eliminarea butaşilor altoiţi neporniţi în vegetaţie şi necalusaţi la punctul de altoire. Viţele calusate şi pornite în vegetaţie au fost tratate cu Radistim 2,0% prin introducerea bazei butaşului timp de 2-3 secunde în soluţie – **figura 2-13**.

- **parfinarea butaşilor altoiţi:** s-a efectuat înainte de plantarea în şcoala de viţe cu parafina - Ciragref 120 AD 42/25 – **figura 2-14**.

**- plantarea butaşilor altoiţi în câmp**: s-a facut la bilon folosind pentru mulcire folie neagră perforată – **figura 2-15**.

Pentru limitarea răspândirii şi combaterea cancerului bacterian în procesul de producere a materialului săditor viticol se impun aplicarea unui ansamblu de masuri cât şi aplicarea unei scheme de combatere integrată. Dintre măsuri menite să contribuie la prevenirea şi combaterea cancerului prezentăm:

- măsuri de prevenire a bolii;
- măsuri de combatere chimică şi biologică.



***Figura 2-14*** *– Parafinarea viţelor dupa forţare*

## 2.4 Măsuri de prevenire a bolii

Măsurile de prevenire a cancerului bacterian:

- selecţia fitosanitară riguroasă în plantaţiile de portaltoi şi altoi;
- dezinfectarea materialului folosit la altoire, cu Chinosol W sau Solvochim 0,5% prin stropire-îmbăiere, imersie timp de 15-20 minute într-o solutie de Captan 0,2% sau sulfat de cupru 1%;
- dezinfectarea uneltelor cu soluţie de formol 5%;



***Figura 2-15*** *– Viţe altoite plantate în pepinieră*

- tratarea butaşilor cu apă caldă, la temperatura de 50°C timp de 60 minute;
- respectarea cu stricteţe a asolamentului în şcoala de viţe;
- înainte de plantare viţele, vor fi atent selectate şi triate şi se vor exclude de la plantare viţele infestate;
- identificarea, extragerea şi distrugerea prin ardere a plantelor bolnave;
- dezinfectarea locului unde au fost semnalate plantele bolnave cu soluţie de formol 2% (5–6 litri/groapă);
- folosirea în asolament pe terenurile destinate şcolii de viţă un număr de 2–3 ani în care să fie cultivate cereale, plante monocotiledonate sau lucernă.

### 2.4.1 Măsuri de combatere

**Combatere chimică:**

- în apa cu care se prepară mocirla în care se scufundă rădăcinile viţelor înainte de plantare, se adăugă fungicide care asigură protecţie faţă de

infecţiile cu cancer din sol (sulfat de cupru 1%, Captadin 50 PU-1%, Topas EC-0,025%, etc.).
- după căderea frunzelor la viţele altoite din şcoala de viţe se vor efectua tratamente prin stropire cu ulei horticol 1% sau sulfat de cupru 3-5%.

**Combatere biologică:**
- combatere cu tulpini avirulente de *Agrobacterium radiobacter* care inhibă activitatea patogenă a agentului patogen *Agrobacterium tumefaciens* (N. Zinca, 1971).

### 2.4.2 Folosirea biopesticidului obţinut din *Bacillus subtilis*.

Biopesticidul utilizat Bacterisin 1 a fost conditionat ca pulbere şi folosit în concentratie de 4%. Biopesticidul a fost testat pe soiurile Muscat de Hamburg, Merlot şi Fetească regală. În urma testării realizate în anii 2008 - 2009 s-au obţinut urmatoarele rezultate (**tabelul 2-13**), astfel: la **varianta - III** s-a înregistrat o frecvenţă a viţelor cu cancer de 0,0% la soiul Fetească regală şi de 9,09% la soiul Muscat de Hamburg. La soiurile Muscat de Hamburg, Merlot şi Fetească regală - **varianta I** frecvenţa ridicată a viţelor cu simptome de cancer, scoate în evidenţă faptul că timpul de aplicare a tratamentului de 2 ore şi doza de 4 g/l de biopreparat sunt insuficiente pentru o protecţie bună a materialului săditor, pentru eficienţă maximă este necesar un timp de 10 ore şi doză de biopreparat la 5g/l.

Analizând datele din **tabelul 2-14** se poate observa faptul că în momentul aplicarii tratamentului timp mai îndelungat (24 ore) este influienţat negativ randamentul la calusare al viţelor în funcţie de soi. Astfel, la toate variantele de tratament se observă că soiul Fetească regală a înregistrat un randament între 40,00% şi 60,00% iar la celelalte soiuri s-au inregistrat randamente între 9,33% la soiul Muscat de Hamburg (**varianta II**) şi 28,66% la Merlot (**varianta I**).

Din rezultatele cercetărilor realizate ulterior, prezentate în **tabel 2-15**, observăm valori satisfăcătoare la **varianta I** - (F%) 9,09% la soiul Muscat de Hamburg şi 10,52% la Merlot. De menţionat este faptul că soiul Muscat de Hamburg a înregistrat o frecvenţă scazută a viţelor bolnave, cu valori cuprinse între 7,14% şi 9,09%. Acest fapt, **ne permite să afirmăm faptul că biopesticidul protejează viţele tinere împotriva bacteriei patogene**. Comparând rezultatele obţinute la **vatianta I** (soiuri tratate cu biopesticid) şi **Martor** (netratat) se poate observa efectul pozitiv al tratamentului asupra combaterii cancerului bacterian al viţei de vie. Astfel, se impune elaborarea unei scheme de combatere integrată a cancerului bacterian, schemă ce cuprinde totalitatea măsurilor profilactice şi curative cu folosirea pesticidelor şi a biopesticidului.

***Tabel 2-13*** *Experimentare model funcţional în şcoala de viţe pentru stabilirea eficacităţii biopreparatelor în protejarea materialului săditor viticol faţă de acţiunea patogenă a bacteriei Agrobacterium tumefaciens*

| Nr. crt | Varianta | Soiul | Viţe plantate în câmp (buc.) | Viţe pornite (buc.) | Viţe nepornite (buc.) | Viţe cu simptome de cancer bacterian (buc.) | | Frecvenţă viţe cu cancer 13.11. 2008 (%) | Observaţii |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | 10.07. 2008 | 13.11. 2008 | | |
| 1. | I | Muscat de Hamburg | 134 | 98 | 36 | 4 | 7 | 7,14 | - altoiul de la butucii bolnavi; -tratament cu biopesticid 4 g/l |
| 2. | | Merlot | 149 | 46 | 102 | 9 | 22 | 47,82 | |
| 3. | | Fetească regală | 95 | 40 | 55 | 6 | 11 | 27,50 | |
| 4. | II | Muscat de Hamburg | 112 | 64 | 48 | 0 | 0 | 0.0 | -altoiul de la butucii bolnavi; -tratament cu sulfat de cupru 1%. |
| 5. | | Merlot | 129 | 62 | 67 | 0 | 0 | 0.0 | |
| 6. | | Fetească regală | 106 | 45 | 61 | 4 | 4 | 8,88 | |
| 7. | III | Muscat de Hamburg | 28 | 22 | 6 | 2 | 2 | 9,09 | - altoiul recoltat de la butuci sănătoşi; -tratament cu biopes-ticid 4 g/l. |
| 8. | | Fetească regală | 17 | 4 | 13 | 0 | 0 | 0.0 | |
| 9. | Martor | Muscat de Hamburg | 173 | 134 | 39 | 0 | 0 | 0.0 | - altoiul recoltat de la butuci sănătoşi; -tratament cu sulfat de cupru 1%. |
| 10. | | Merlot | 159 | 128 | 31 | 0 | 0 | 0.0 | |
| 11. | | Fetească regală | 165 | 116 | 49 | 0 | 0 | 0.0 | |

***Tabel 2-14*** *Rezultate experimentale privind randamentul la altoire utilizând biopreparatul Bacterisin 1 în combaterea cancerul bacterian produs de Agrobacterium tumefaciens (Smith et Townsend)*

| Nr. crt | Varianta | Soiul | Viţe altoite (buc.) | Viţe pornite (buc.) | Viţe nepornite (buc.) | Randament la altoire (%) | Observaţii |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1. | I | Muscat de Hamburg | 150 | 32 | 118 | **21,33** | - altoi proveniţi de la butuci cu simptome de cancer bacterian;<br>- trataţi cu biopesticid 4% timp de 48 de ore înainte de altoit. |
| 2. | | Merlot | 150 | 43 | 107 | **28,66** | |
| 3. | | Fetească regală | 150 | 64 | 86 | **42,66** | |
| 4. | II | Muscat de Hamburg | 150 | 14 | 136 | **9,33** | - altoi proveniti de la butuci sănătoşi;<br>- trataţi prin imersie în solutie cu biopesticid 4% timp de 48 ore înainte de altoit;<br>- infectaţi artificial cu bacterii patogene. |
| 5. | | Merlot | 150 | 18 | 132 | **12,00** | |
| 6. | | Fetească regală | 150 | 60 | 90 | **40,00** | |
| 7. | III | Muscat de Hamburg | 100 | 58 | 42 | **58,00** | - altoi proveniţi de la butuci cu simptome de cancer bacterian;<br>- varianta netratat. |
| 8. | | Merlot | 100 | 44 | 56 | **44,00** | |
| 9. | | Fetească regală | 100 | 60 | 40 | **60,00** | |

***Tabel 2-15*** *Rezultate experimentale obţinute în şcoala de viţe privind stabilirea variantelor optime de combatere a cancerului bacterian la viţa de vie Agrobacterium tumefaciens (Smith et Townsend) cu utilizarea biopreparatul Bacterisin 1*

| Nr. Crt. | Soiul | Viţe plantate în pepiniera (buc.) 11.05.2009 | Viţe sănătoase (buc.) | Viţe nepornite în vegetaţie (buc.) | Viţe cu simptome de cancer bacterian (buc.) | Frecvenţă viţe cu cancer (%) | Observaţii |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 04.11.2009 | | | | |
| **1.** | Muscat de Hamburg | 32 | 22 | 8 | 2 | **9,09** | - altoi proveniţi de la butuci bolnavi;<br>- trataţi cu biopesticid 4% timp de 48 de ore înainte de altoit. |
| **2.** | Merlot | 43 | 19 | 24 | 2 | **10,52** | |
| **3.** | Fetească regală | 64 | 42 | 22 | 4 | **9,52** | |
| **4.** | Muscat de Hamburg | 14 | 3 | 11 | 1 | **33,33** | - altoi proveniţi de la butuci sănătoşi;<br>- trataţi prin imersia în soluţie cu biopesticid 4% timp de 48 ore înainte de altoit;<br>- infectaţi artificial. |
| **5.** | Merlot | 18 | 6 | 12 | 3 | **50,00** | |
| **6.** | Fetească regală | 60 | 12 | 48 | 5 | **41,66** | |
| **7.** | Muscat de Hamburg | 58 | 39 | 19 | 7 | **17,94** | - altoi proveniti de la butuci cu simptome de cancer bacterian;<br>- netratat. |
| **8.** | Merlot | 44 | 29 | 15 | 11 | **37,93** | |
| **9.** | Fetească regală | 60 | 35 | 25 | 9 | **25,71** | |

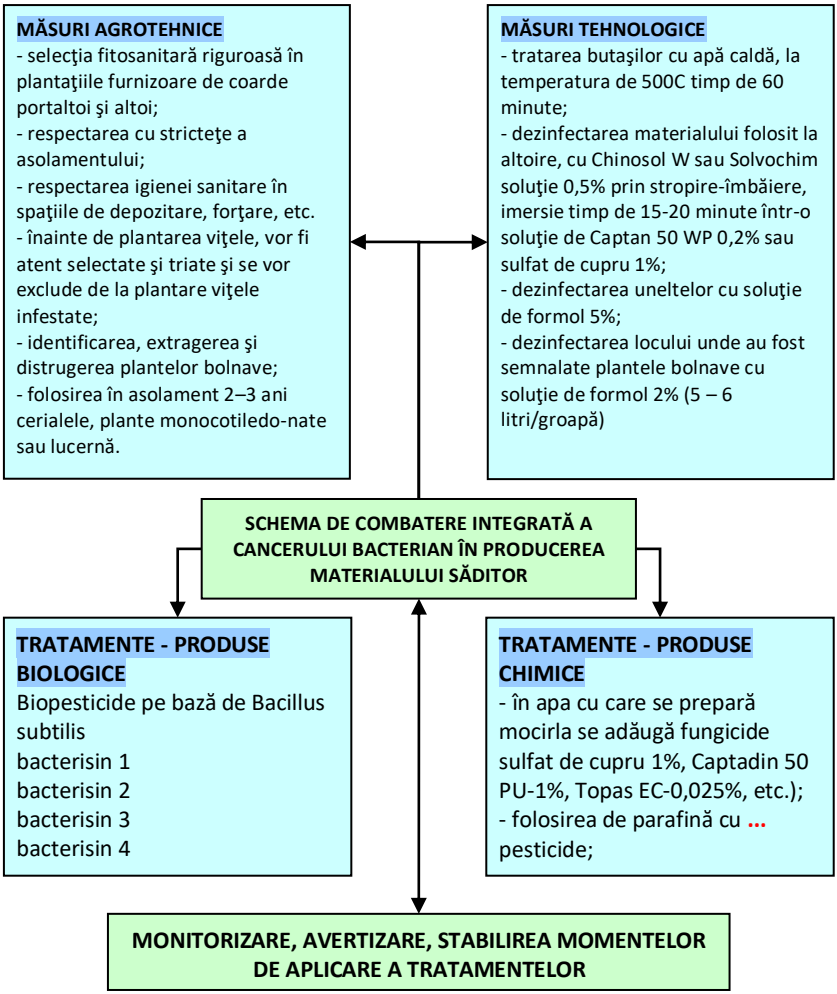



***Figura 2-16 –*** *Schema de combatere integrată a cancerului bacterian în producerea materialului săditor viticol*

# 3. Concluzii

Transmiterea bacteriilor poate fi realizată în momentul efectuării la viţa de vie de lucrări specifice (tăieri de formare şi/sau fructificare, altoire, copilit, carnit, la legume, etc.), sau prin materialul de înmulţire.

Expresia maxima observată a virulenţei agentul patogen *Agrobacteium tumefaciens* la vişa de vie, se situează în perioada din an ce începe cu luna iunie când temperaturile au sunt mari.

Pentru prevenirea şi combaterea cancerului bacterian la viţa de vie se aplică un complex de măsuri agrotehnice, mecanice, biologice si chimice.

Biopreparatele provenite de la diferite tulpini de *Bacillus subtilis* folosite în concentraţie de 4% au indus protecţia plantelor de viţa de vie tratate, cu o eficacitate bună, având valori cuprinse între 93 şi 96% La varianta standard tratată chimic cu produsul Funguran OH 50 PU 0,3%, eficacitatea este de 71%.

În plantaţiile mamă de viţa de vie furnizoare de coarde, se recomanda aplicarea tratamentelor profilactice de combatere a bacteriilor fitopatogene cu substanţe chimice sintetizate nonbiologic (Turdacupral 50 PU, Captan 50 WP, etc), începând din luna mai şi continuând până în luna august. Aceste tratamente se aplică, de regulă, toamna după efectuarea lucrărilor de tăiere pentru recoltarea coardelor, primavara la efectuarea taierilor de fructificare, cât şi după efectuarea lucrărilor în verde. Se recomanda efectuarea tratamentelor asupra coardelor folosite la altoire în procesul de producere a materialului săditor.

Atât produsele fitofarmaceutice chimice de sinteză, cât şi produsele biologice, nu combat în totalitate agentul patogen ci **doar asigură stoparea infectării plantelor sănătoase** în urma efectuării lucrărilor de tăiere sau a lucrărilor în verde, cât şi în procesul de altoire-forţare şi în şcoala de viţe, drept pentru care **le recomandăm a fi folosite de regula în prevenţie în scheme de combatere integrată,** anterior prezentate.

## 3.1 Tehnologia de combatere a bacteriozelor la speciile legumicole

Plantele de tomate (*Lycopersicon esculentum L.*) contaminate cu bacterii fitopatogene din tulpina de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* au beneficiat de protecţie fitosanitară superioară prin aplicarea tratamentului cu antibiotic (E% = 91,7). Tratamentele realizate pe baza biopreparatelor Bacterisin 4 (4%) şi Bacterisin 3 (4%), au generat o eficacitate bună (88,6% şi respectiv 87,2%), deoarece aceasta a fost la un nivel apropiat faţă de

eficacitatea generată de antibiotic şi la un nivel superior faţă de eficacitatea generată de martorul tratat chimic (E% = 71,6%).

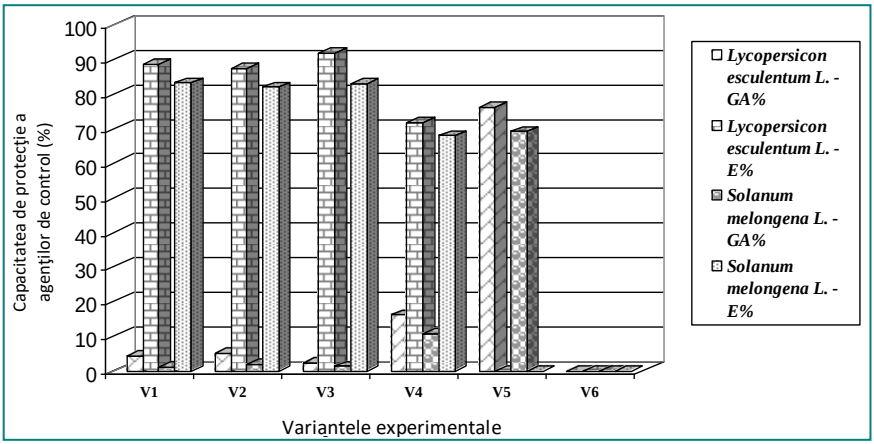



***Figura 3-1*** *– Capacitatea de protecţie a agenţilor de control (biopreparat, antibiotic şi sulfat de cupru) în tratamentele utilizate împotriva contaminării, cu bacteria fitopatogenă Xanthomonas campestris pv.vesicatoria, pe Lycopersicon esculentum L. şi Solanum melongena L.*



***Figura 3-2*** *– Frunze de Lycopersicon esculentum L . afectate de Pseudomonas syringae pv. Tomato*

Tratamentele realizate pentru protecţia plantelor de vinete (*Solanum melongena L.*.) contaminate cu bacterii fitopatogene din tulpina de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* au înregistrat cea mai bună protecţie prin utilizarea biopreparatului Bacterisin 4 (4%) - E% = 83,1%. Prin tratamentele realizate pe baza antibioticului sau pe baza biopreparatului Bacterisin 3 (4%) au fost înregistrate valori foarte bune ale eficacităţii (E% = 82,9%, respectiv E% = 81,9%). În timp ce, tratamentul realizat pe baza sulfatului de cupru, recomandat uzual în legumicultură, a generat o valoare a eficacităţii de doar 67,9%. (**figura 3-1**; **figura 3-3**; **figura 3-4**).

Plantele de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) contaminate cu bacterii fitopatogene din tulpina de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* au avut o protecţie forte bună de peste 85,0% prin tratamentele realizate pe baza de antibiotic (E% = 89,4%) sau pe baza de produse biologice, respectiv Bacterisin 4 (4%) cu E% = 86,1% şi biopreparatul Bacterisin 3 (4%) cu E% = 85,5%.

Plantele de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) utilizate cu rol de martor tratat chimic au înregistrat o eficacitate inferioară (E% = 80,1%), faţă de valorile obţinute pentru tratamentele pe bază de antibiotic sau de biopreparate.

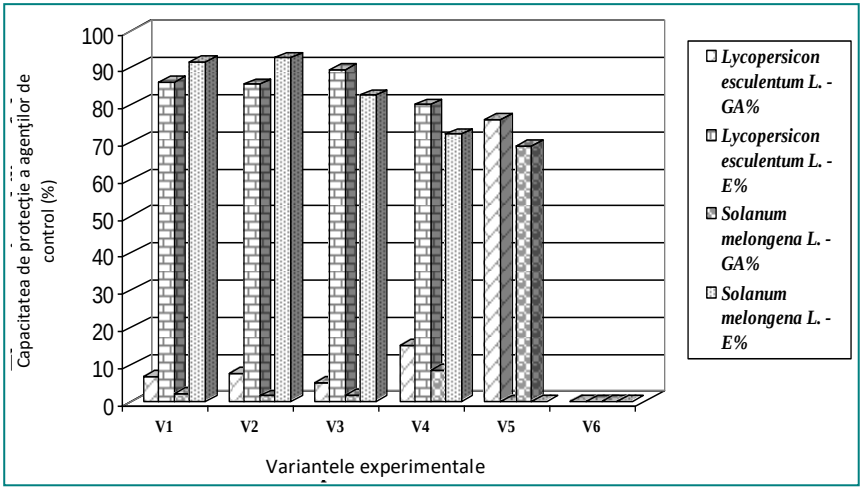



***Figura 3-3*** *– Capacitatea de protecţie a agenţilor de control (biopreparat, antibiotic şi sulfat de cupru) în tratamentele utilizate împotriva contaminării cu bacteria fitopatogenă Pseudomonas syringae pv. tomato, pe Lycopersicon esculentum L. şi Solanum melongena L.*

Pentru plantele de vinete (*Solanum melongena* L.) contaminate cu bacterii fitopatogene din tulpina de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* a fost înregistrată cea mai bună protecţie ca urmare a aplicării tratamentelor pe bază de biopreparate. Astfel, tratamentele realizate pe baza biopreparatelor Bacterisin 3 (4%) şi Bacterisin 4 (4%) au generat cele mai bune valori ale eficacităţii (E% = 92,6%, respectiv 91,6%). În timp ce, tratamentele pe bază de antibiotic sau de sulfat de cupru au generat valori inferioare ale eficacităţii (E% = 82,6%, respectiv 72,0%).

Tratamentele realizate pentru protecţia plantelor de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) contaminate cu bacterii fitopatogene din tulpina de *Erwinia carotovora* au generat rezultate experimentale superioare, în cazul biopreparatelor Bacterisin 4 (4%) – E% = 89,5% - şi Bacterisin 3 (4%) – E% = 84,8% - faţă de antibiotic (E% = 83,5%) sau agentul chimic (E% = 74,8%).

Plantele de vinete (*Solanum melongena* L.) contaminate cu bacterii fitopatogene din tulpina de *Erwinia carotovora* au avut un nivel al protecţiei asemănător pentru trei dintre tratamentele aplicate. Practic, tratamentele aplicate au generat rezultate experimentale care au avut valori apropiate, atât

în cazul utilizării biopreparatelor Bacterisin 4 (4%) şi Bacterisin 3 (4%) – E% =93,4%, respectiv E%=92,9% - cât şi în cazul utilizării antibioticului (E%=91,4%). Varianta de tratament care a utilizat sulfat de cupru a generat cel mai mic nivel al protecţiei plantelor de vinete (*Solanum melongena* L.) având o eficacitate de 82,8%.

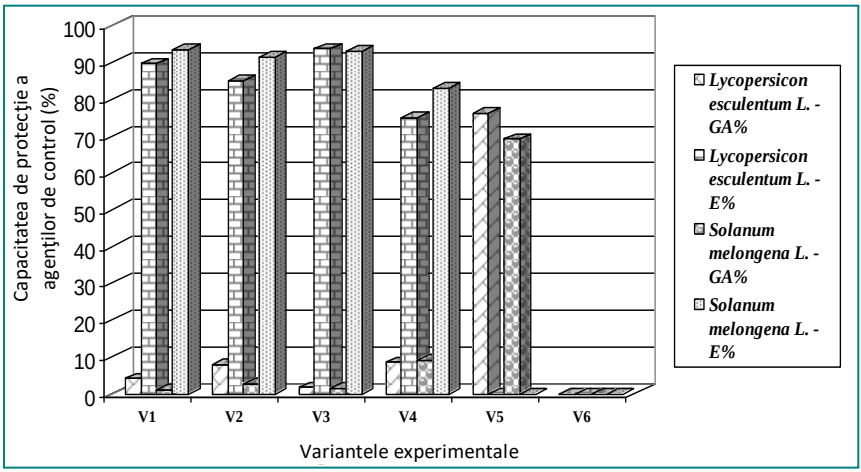



***Figura 3-4*** *– Capacitatea de protecţie a agenţilor de control (biopreparat, antibiotic şi sulfat de cupru) în tratamentele utilizate împotriva contaminării cu bacteria fitopatogenă Erwinia carotovora, pe Lycopersicon esculentum L. şi Solanum melongena L.*

Din corelarea datelor experimen-tale înregistrate, prin investigarea posibi-lităţilor de biocontrol a bacteriilor apar-ţinând tulpinilor de *Xanthomonas cam-pestris* pv. *vesicatoria*, *Pseudomonas sy-ringae* pv. *tomato* şi *Erwinia carotovora*, rezultă existenţa unei relaţii între tipul elementului utilizat ca agent de control (biopreparat, antibiotic sau sulfat de cupru) şi sensibilitatea bacteriilor fitopatogene la acţiunea acestuia.

Testarea la nivel de laborator a eficacitatii biopreparatelor Bacterisin 3 şi Bacterisin 4 pentru combaterea biologică a bacteriilor fitopatogene (*Xanthomonas campestris pv. vesicatoria*, *Pseudomonas syringae pv. tomato* şi *Erwinia carotovora*) la plante de *Lycopersicon esculentum* L. şi de *Solanum melongena* L., a condus la următoarele concluzii:

- la legume este necesară utilizarea de substanţe chimice sintetizate nonbiologic aplicate individual: Captadin 0,2%; Dithane M-45 0.2%; Turdacupral 0,4%; etc. sau în combinaţie, atât în scop profilactic cât şi de tratare a bolilor provocate de bacterioze fitopatogene, cu atât mai mult cu cât obţinerea răsadurilor se realizeaza în spaţii protejate;

- tratamentele cu biopreparate au determinat atat un efect de stimulare a plantelor de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) şi vinete (*Solanum melongena* L.), cat şi marirea rezistenţei la atacul bacteriilor fitopatogene;
- în cazul utilizării biopreparatelor s-a constatat că preinfectarea cu tulpini patogene a indus protecţia la un nivel comparabil, atât cu cel obţinut prin utilizarea sulfatului de cupru cât şi cu cel realizat prin aplicarea antibioticelor.



***Figura 3-5 –*** *Pete de Xanthomonas campestris pv. vesicatoria pe tomate*

Rezultatele obtinute recomandă aplicarea tratamentelor pe baza biopreparatelor microbiene pentru combaterea biologică a bacteriilor fitopatogene (*Xanthomonas campestris pv.vesicatoria*, *Pseudomonas syringae pv. tomato* şi *Erwinia carotovora*), în primele stadii de vegetaţie la plante de *Lycopersicon esculentum* L. şi de *Solanum melongena* L.



***Figura 3-6 –*** *Ofilirea plantelor de tomate (Lycopersicon esculentum L.) sub acţiunea bacteriană*

## 3.2 Impactul social al produsului

Interesul pentru prevenirea contaminării mediului s-a intensificat în ultimii ani şi se discută mult despre modalitatea de reducere a poluării mediului indiferent din ce sursă. Agenţii chimici au avut rolul lor în istorie, dar tehnologia avansează şi la fel biotehnologia, ceea ce a dus la utilizarea de surse externe de enzime, tulpini de bacterii, de fungi, etc.;

- cea mai importantă direcţie de perspectivă la ora actuală pentru combaterea bolilor plantelor de cultură, este obtinerea preparatelor microbiene pe bază de bacterii şi ciuperci, direcţie care necesită studii complexe de izolare şi selecţie a microorganismelor, studii de tehnologie, dar şi analize de toxicologie, de testari pe bacteriile şi ciupercile fitopatogene.

Pe plan national au existat si există cercetari pentru obţinerea de produse biologice în combaterea unor cipuerci patogene folosind ciuperca

*Trichoderma viridae* si/sau *Trichoderma harzianum.* De asemenea, există studii cu tulpini de *Bacillus subtilis* pentru obtinerea de produse biologice cu rol antifungic şi de combatere a micotoxinelor produse de ciuperci.

Utilizarea biopreparatelor în agricultură prezintă ca avantaje:

- lipsa de toxicitate fată de animale şi oameni;
- fitotoxicitatea redusă a produselor folosite;
- nu necesită o perioadă de repaus între aplicarea tratamentului şi valorificarea materialului biologic tratat.

Utilizarea de biopreparate, atât în scopul reducerii poluării mediului inconjurător, cât şi în scopul informării interactive despre implicaţiile financiare pe care le generează valorificarea antagonismului microbian în reducerea costurilor de producţie prin utilizarea biopreparatelor.

Prezenta broşură vizează **acţiunea de valorificare şi disiminare a rezultatelor cercetărilor** prin:

- promovarea biopreparatelor în unităţile de producţie din viticultură în vederea obţinerii de rezultate pozitive în prevenirea cancerului la viţa de vie pe material săditor sau aflat în exploatare;
- promovarea biopreparatelor în unitaţile de producţie din legumicultura în vederea obţinerii de rezultate pozitive în prevenirea şi combaterea bacteriozelor la tomate si castraveţi;
- implementarea unei tehnologii superioare bazată pe principiile UE de combatere a bacteriozelor cu biopreparate care duce la scăderea pierderilor din culturile horti-viticole;
- limitarea fenomenului de declin la viţa de vie în podgoriile cu afecţiuni puternice de cancer bacterian;
- obţinerea materialului săditor viticol liber de *Agrobacterium tumefaciens*;
- obţinerea răsadului de tomate şi vinete liber de bacterii patogene (*Pseudomonas, Xanthomonas, Erwinia*).
- elaborarea unor soluţii care să respecte principiile agriculturii durabile.

## 3.3 Impactul asupra mediului.

Produsul face parte dintr-o gamă de biopreparate pentru combaterea bolilor produse de bacterii fitopatogene şi se încadrează în normele date de Organizaţia Internaţională de Luptă Biologică (OILB).

# 4. Bibliografie


1. Constantinescu F., 2000 – Cercetari privind folosirea bacteriilor Bacillus spp. in combaterea unor ciuperci fitopatogene, Teza de doctorat, U. S. A. M. V. Bucuresti;
2. Costache M., Roman T., 2003 – Ghid pentru recunoaste-rea si combaterea bolilor si daunatorilor la legume, Ed. AGRIS;
3. Grecu Virgil, 1980 – Îndrumătorul pepineristului viticol, Editura Ceres, Bucureşti.
4. Lazăr AL., Bobes I., Comes I., Dracea A., Hatmanu M., 1977 - Fitopatologie, Editura Didactică şi Pedagogică, Bucureşti Severin V., 1996 – Focul bacterianal rozaceelor [Erwinia amylovora], Ed. CERES, Bucuresti;
5. Marc Ongena, Philip J., Trends in Microbiology, vol 16, 3, 2008, 115-125
6. Mirică I., Mirică Afrodita, 1976 - Combaterea bolilor şi dăunătorilor la viţa de vie, Editura Ceres, Bucureşti.
7. Nagorska et al., acta biochimica polonica, 54, 2007, p 495-508
8. Oancea F., 1995 – Cercetari privind folosirea bacteriei Bacillus subtilis in combaterea biologica a unor fitopatogeni – Proplant 95, p. 121-126;
9. Pierre Huglin, Christophe Schneider,2003 - Biologie et écologie de la vigne, Editura Lavoisier Tec &Doc,Paris.
10. Pu X. A., Goodman R. N., 1993 – Tumor formation by Agrobacterium tumefaciens is suppressed by Agrobacterium radiobacter HLB-2 on grape plants, American J. Enol. Vitic., 44, 3, 249-254;
11. Severin V., Iliescu H. C., 2006 – Bolile bacteriene ale plantelor, Ed. GEEA, p. 93.
12. Stein T., Molecular microbiology, 56, 4, 2005., p. 845-857
13. Tiţă I. – Producerea materialului de înmulţire viticol din categoriile biologice superioare, 2004 - Editura Tipnaste, Piteşti.
14. Thakore Y -,,Ind. Biotechnol,, 2,, 2006, p. 194-208
15. Ţardea C., Dejeu L.,1995 - Viticultură, Editura Didactică şi Pedagogică, Bucureşti.
16. Ulea E.,2003 - Fitopatologie, Editura "Ion Ionescu de la Brad", Iaşi.
17. Zinca, 1971 – Cercetari asupra cancerului vitei de vie produs de Agrobacterium tumefaciens (Smith et. Townsent). Conn., Teza de doctorat, Bucuresti, I. A. N. B.;
18. You J. F., Xie X. M., Chen P. M., Guo J. M., 1990 – Control of grape crown gall disease with HLB-2 strain of Agrobacterium radiobacter, Chinese J. Biol. Contr., 6, 1, 35-37;

# Cuvântul autorilor

Însuşi noţiunea de biopreparat bacterian care are ca arie de aplicabilitate agricultura stârneşte interesul cititorului astfel, încât, îmbinarea şi integrarea acesteia în noţiunea de „combatere integrată" capătă o valenţă superioară. Cert este faptul că pană în prezent combaterea bolilor determinate de microorganisme cu dezvoltare în interiorul sistemului vascular al plantelor nu a fost însoţită de un real succes atât prin folosirea mijloacelor chimice cât şi prin folosirea mijloacelor biochimice şi/sau biologice, permanent s-au căutat căi, principii, metode, mecanisme şi mijloace care să contribuie la limitarea dezvoltării agenţilor patogeni şi a pagubelor produse de aceştia.

Bacteria *Agrobacterium radiobacter pv. tumefaciens* (Smith et Townsend) Kerr, Youngt Panagopoulus sin. *Agrobacterium tumefaciens* (Smith et Townsend) Conn., ordinul *Eubacteriales* produce la plantele de cultură boala denumită **„cancerul bacterian"**, boală ce determină reducerea capacităţii de producţie, debilitarea şi moatrea plantelor.

Controlul biologic al bacteriilor patogene pe plante prin adiţie de microorganisme antagoniste este un mijloc cu potenţial nonhazard al controlului bolilor la plante. Combaterea biologică a bacteriilor fitopatogene cu bacterii saprofite are perspective mari de aplicare practică pentru combaterea cancerului bacterian.

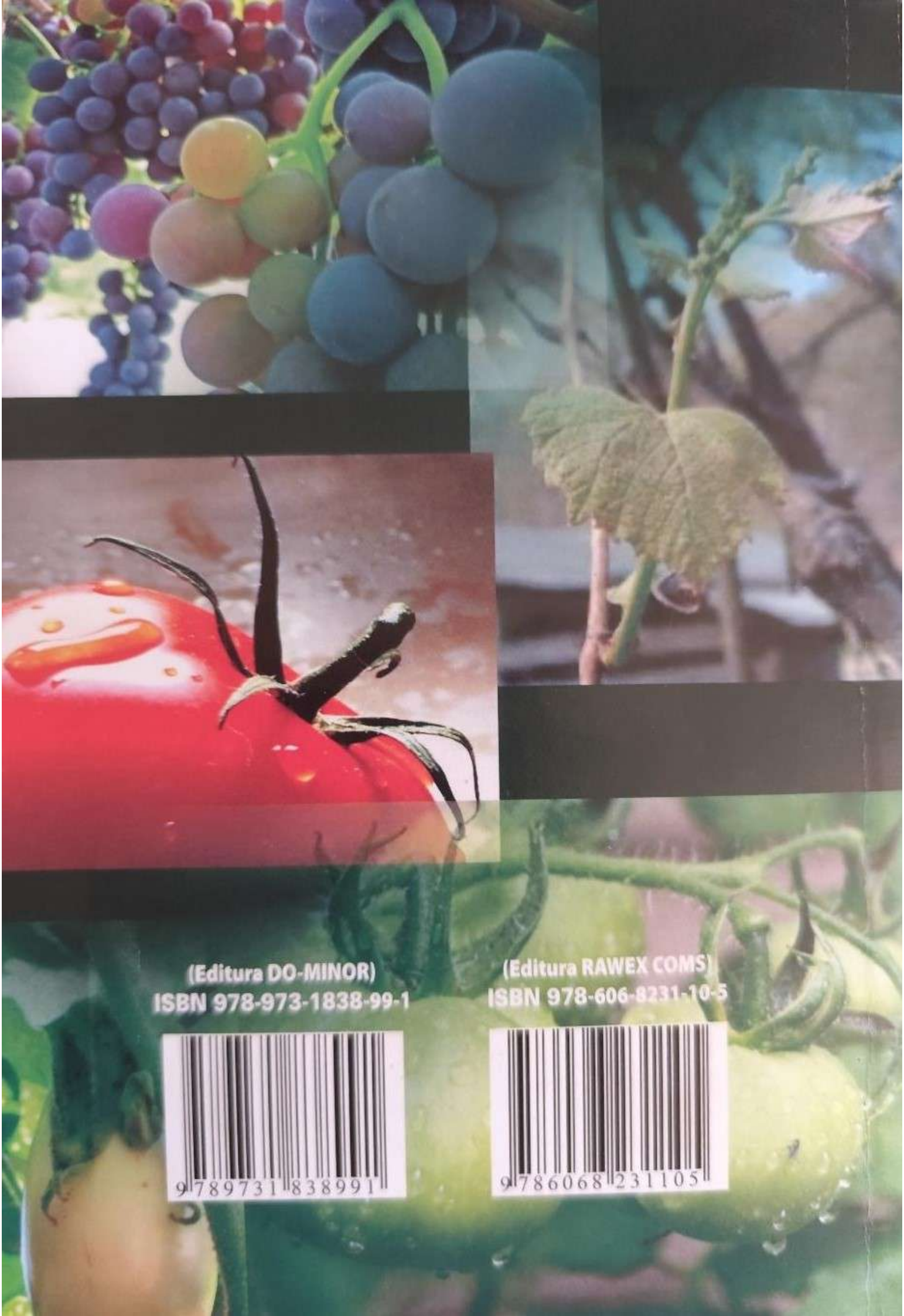
Pe plan international s-au fabricat produse microbiene folosind tulpini de *Trichoderma harzianum* si *Trichoderma viridae* care combat fungii filamentoşi şi controlează vestejirea plantelor, cauzată de *Rhizoctonia, Sclerotium, Botrytis,* etc.

Produse biologice (biopraparatele), au marele avantaj de a nu produce modificări agresive la nivelul ecosistemului iar includerea acestora într-o tehnologie de "combatere integrată" conduce, inevitabil, la obţinerea de rezultate superioare.

Numeroşi cercetători au efectuat studii şi cercetări complexe folosind diferite bacterii în combaterea unor ciuperci şi a unor bacterii fitopatogene însă nu s-a putut ajunge la obţinerea unui bioprodus şi a unui biopreparat care să producă combaterea integrală a acestora, eficacitatea bioproduselor fiind, de regulă, situată intre 70-85%.

**Produsul realizat de catre INCDCF–ICCF Bucureşti** reprezintă **o alternativă** şi în acelaş timp **o cale de combatere** a bacteriozelor patogene la speciile de plante horticole putând fi introdus, cu succes, într-o tehnologie de combatere integrată.

Prezentul ghid se doreşte a fi un îndrumar în care autorii prezintă rezultatele obţinute şi posibilităţile în care se foloseşte bioprodusul, în cadrul unui program de combatere integrată a agentului patogen *Agrobacterium t.*



(Editura DO-MINOR)
ISBN 978-973-1838-99-1

(Editura RAWEX COMS)
ISBN 978-606-8231-10-5