

**MINISTERUL EDUCAȚIEI, CULTURII ȘI CERCETĂRII AL REPUBLICII
MOLDOVA
INSTITUTUL DE GENETICĂ, FIZIOLOGIE ȘI PROTECȚIE A
PLANTELOR**

Cu titlu de manuscris
C.Z.U.: 632.95:582.71(478)(043.3)

MAGHER MARIA

**ELABORAREA SISTEMULUI DE COMBATERE INTEGRATĂ A
FOCULUI BACTERIAN AL ROZACEELOR
(*ERWINIA AMYLOVORA*)**

411.09 – PROTECȚIA PLANTELOR

Autoreferatul tezei de doctor în științe agricole

CHIȘINĂU, 2018

Teza a fost elaborată în Laboratorul Fitopatologie și Biotehnologie al Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor.

Conducător științific:

VOLOȘCIUC Leonid, doctor habilitat în științe biologice, profesor cercetător, 411.09 – Protecția plantelor

Referenți oficiali:

COREȚCHI Liuba, doctor habilitat în științe biologice, conferențiar cercetător

CROITORU Nichita, doctor în științe agricole, conferențiar universitar

Componenta Consiliului Științific Specializat:

VOINEAC Vasile, doctor habilitat în științe agricole, profesor universitar, *președinte*

TODIRAȘ Vladimir, doctor habilitat în științe biologice, conferențiar cercetător, *secretar științific*

BURȚEVA Svetlana, doctor habilitat în științe biologice, profesor cercetător

BALAN Valerian, doctor habilitat în științe agricole, profesor universitar

CEBANU Vitalie, doctor în științe agricole, conferențiar cercetător

Susținerea va avea loc la **4 decembrie 2018, ora 14:00**, în ședința Consiliului Științific Specializat **D 10.411.09-03** din cadrul Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor.

Adresa: MD-2002, str. Pădurii, 20, mun. Chișinău, Republica Moldova, tel.: (+373 22) 77-04-47, fax. (+373 22) 55-61-80, e-mail: institut.gtpp@gmail.com

Teza de doctor și autoreferatul pot fi consultate la Biblioteca Științifică Centrală „Andrei Lupan” (MD 2028, str. Academiei 5a, mun. Chisinau) și pe pagina web a ANACEC (www.anacip.md).

Autoreferatul a fost expediat la **02 noiembrie 2018**.

Secretar științific al Consiliului științific specializat

TODIRAȘ Vladimir, dr. hab. șt. biol., conf. cercet.

Conducător științific,

VOLOȘCIUC LEONID, dr. hab. șt. biol., prof. cercet.

Autor

MAGHER Maria



© Magher Maria, 2018

REPERE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII

Actualitatea temei. În Republica Moldova pomicultura este una din ramurile prioritare ale agriculturii cu pondere considerabilă în exportul fructelor [1], iar una dintre bolile cele mai periculoase, comună pentru speciile pomicele sămânțoase, este focul bacterian al rozaceelor produsă de bacteria *Erwinia amylovora*. Focul bacterian afectează, mai ales mărul, părul și gutuiul, provocând pierderi mari atât în livezi, cât și în pepiniere. Având viteză de răspândire rapidă, boala poate distruge tot pomul în numai trei luni de la infectare [2-9].

Pagubele economice produse de *E. amylovora* se soldează prin pierderea recoltei, pieirea pomilor și prin cheltuielile suportate pentru defrișări. Protecția culturilor pomicele sămânțoase față de focul bacterian al rozaceelor este dificilă datorită vitezei cu care se propagă și a agresivității deosebite a bacteriei [10].

Descrierea situației în domeniul de cercetare și identificarea problemelor de cercetare. Primele focare de foc bacterian în Republica Moldova au fost semnalate prin anii 1991-1992 [11], când boala s-a răspândit rapid, făcând mari ravagii la păr și gutui. În anii 1994-1997 bacterioza capătă caracter de epifitotie, în rezultatul căreia au fost defrișate 820 ha de păr și 297,5 ha de gutui. Cu toate că au fost întreprinse tratamente pentru eradicarea bolii, în anii următori au fost depistate simptome de bacterioză și la cultura mărului [12, 13].

De la depistarea focului bacterian al rozaceelor și până în prezent, în Republica Moldova, nu s-au efectuat cercetări ce țin de stabilirea arealului de răspândire, gradului de atac, relației plantă gazdă-fitopatogen și nu au fost stabilite măsuri efective de combatere, iar boala continuă să se manifeste cu diferită intensitate de la an la an, mai ales în livezile neîngrijite, care, pe lângă rozaceele spontane, constituie o bogată rezervă biologică a maladei.

Diagnosticarea corectă a bacteriozei și aplicarea la timp a metodelor și mijloacelor eficiente de combatere constituie o problemă actuală pentru pomicultura Republicii Moldova. Generalizarea răspândirii focului bacterian, încă de la primele detectări, cât și pagubele ce sunt cauzate de această bacterioză au determinat abordarea acestui subiect de cercetare, pentru găsirea unor modalități de diminuare a răspândirii și a pierderilor produse.

Scopul lucrării: studierea răspândirii agentului etiologic al focului bacterian al rozaceelor, rezistenței principalelor soiuri de măr, păr și gutui la atac, precum și selectarea produselor optime și ecologice de control, în vederea maximizării eficacității biologice și a eficienței economice a tratamentelor aplicate împotriva acestei boli.

Obiectivele lucrării:

- determinarea arealului de răspândire și a intensității atacului focului bacterian al rozaceelor la culturile pomicele sămânțoase în condițiile Republicii Moldova;
- stabilirea susceptibilității principalelor soiuri cultivate de măr, păr și gutui la atacul focului bacterian al rozaceelor;
- izolarea, identificarea și determinarea particularităților biologice ale agentului patogen al focului bacterian al rozaceelor *Erwinia amylovora*;
- determinarea acțiunii unor agenți biologici asupra bacteriei *Erwinia amylovora*;

- evaluarea eficacității biologice a unor produse chimice asupra bacteriei *Erwinia amylovora*;
- determinarea eficienței economice a tratamentelor aplicate contra focului bacterian al rozaceelor.

Metodologia cercetării științifice. Arealul de răspândire a focului bacterian al rozaceelor a fost stabilit în urma efectuării monitoringului fitosanitar în diferite localități din cele trei zone agroclimatice ale Republicii Moldova. Izolarea, identificarea și determinarea particularităților biologice ale izolatelor bacteriene au fost efectuate conform metodelor general acceptate [14-20]. Eficiența tulpinilor de microorganisme utile și a altor produse de uz fitosanitar față de *Erwinia amylovora*, în condiții de câmp, a fost evaluată conform recomandărilor din literatura de specialitate [21]. Prelucrarea matematică și statistică a datelor obținute a fost efectuată cu ajutorul programului computerizat Microsoft Excel 2007.

Noutatea și originalitatea științifică. Pentru prima dată în Republica Moldova a fost determinat gradul de atac, arealul de răspândire și intensitatea atacului focului bacterian al rozaceelor la culturile pomicele sămânțoase; stabilite cele mai susceptibile, cât și cele mai rezistente soiuri de măr, păr și gutui la infecțiile naturale cu foc bacterian; identificat fitopatogenul *Erwinia amylovora* prin aplicarea metodelor clasice și contemporane conform Standardului EPPO PM 7/20 (2) (descrierea simptomelor, particularitățile manifestării caracterelor pe diferite medii de cultură, proprietățile structurale, teste de patogenitate pe diferite organe ale plantelor, testul API 20E, Gaz-Cromatografie, DAS-ELISA, IF și PCR); determinate particularitățile fiziologo-biochimice ale izolatelor bacteriene obținute din probele de plante cu simptome și a fost determinată virulența acestora, în baza inoculărilor artificiale; determinată eficacitatea biologică a diferitor formulări cuprice și agenți biologici față de focul bacterian al rozaceelor; evaluată eficiența economică a produselor biologice și chimice aplicate contra focului bacterian al rozaceelor. Pentru prima dată au fost selectate două tulpini bacteriene noi *Pseudomonas fluorescens* CNMN-PsB-04 și *Pseudomonas aureofaciens* CNMN-PsB-05 cu caracter antagonist față de *Erwinia amylovora*.

Problema științifică soluționată constă în fundamentarea științifică a capacității biopreparatului Paurin (*Pseudomonas fluorescens* CNMN-PsB-04 cu titrul de 10^9 ufc/ml) și a produsului Bouillie Bordelaise (770 g/kg sulfat de cupru neutralizat cu hidroxid de calciu) de a inhiba dezvoltarea fitopatogenului *Erwinia amylovora*, ceea ce permite includerea lor în sistemul de protecție integrată a culturilor de măr, păr și gutui, fiind confirmată eficiența economică a tratamentelor.

Semnificația teoretică. Au fost determinate particularitățile biologice ale fitopatogenului *Erwinia amylovora* în condițiile Republicii Moldova, stabilite normele eficiente de consum, cât și perioadele optimale de aplicare a produselor bacteriene și chimice la măr, păr și gutui pentru combaterea fitopatogenului.

Valoarea aplicativă a lucrării. Cel puțin trei metode din cele cercetate (creșterea pe medii de cultură, teste de patogenitate, testul API 20E, Gaz-Cromatografie, DAS-ELISA, IF și PCR), bazate pe principii biologice diferite, trebuie utilizate pentru identificarea fitopatogenului *Erwinia amylovora* – organism de carantină fitosanitară.

Rezultatele cercetărilor permit recomandarea de tratamente pentru combaterea focului bacterian cu produse biologice în perioada înfloririi și cu preparate cuprice pre- și postfloral. Tulpina P5, identificată ca specie *Erwinia amylovora*, este inclusă în colecția de microorganisme patogene ale laboratorului de Fitopatologie și Biotehnologie a Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor, fiind utilizată în diverse cercetări.

Implementarea rezultatelor științifice. Rezultatele obținute au fost implementate în cadrul gospodăriei ”Exardiv Com” SRL.

Rezultatele științifice principale înaintate spre susținere:

- Arealul de răspândire și intensitatea atacului focului bacterian al rozaceelor la măr, păr și gutui pe teritoriul Republicii Moldova.
- Simptomatologia focului bacterian și susceptibilitatea principalelor soiuri de măr, păr și gutui cultivate în Republica Moldova.
- Caracterele morfologico-culturale și particularitățile fiziologico-biochimice ale izolatelor bacteriene obținute din probe de măr, păr și gutui.
- Tulpina P5 identificată în baza Standardului OEPP - PM 7/20 (2) *Erwinia amylovora*.
- Tulpinile *Pseudomonas fluorescens* CNMN-PsB-04 și *Pseudomonas aureofaciens* CNMN-PsB-05 – antagoniste față de fitopatogenul *Erwinia amylovora*.
- Eficacitatea produselor fitofarmaceutice aplicate contra focului bacterian al rozaceelor.
- Eficiența economică a tratamentelor aplicate la măr pentru combaterea fitopatogenului *Erwinia amylovora*.

Aprobarea rezultatelor științifice. Rezultatele expuse în teză au fost prezentate, discutate și aprobate la ședințele Laboratorului Fitopatologie și Biotehnologie, Comisiei metodice și Consiliului Științific al Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor, precum și în cadrul următoarelor întruniri științifice: Международная научная конференция «Фитопатогенные бактерии, фитонцидология, аллелопатия», г. Киев, 4-6 октября 2005 г.; Международный симпозиум «Защита растений – достижения и перспективы», Кишинев, 19-22 октября 2009 г.; Simpozionul științific internațional „Horticultura modernă – realizări și perspective”, dedicat aniversării a 70 ani de la fondarea Facultății de Horticultură, Chișinău, 23-25 septembrie 2010; Международная Научная Конференция «Микробиологическая биотехнология–научоёмкое направление современных знаний», Кишинев, 6-8 июля 2011 г.; Международный симпозиум «Защита растений – проблемы и перспективы», Кишинев, 30-31 октября 2012 года; al III-lea Simpozion național cu participare internațională ”Biotehnologii avansate – realizări și perspective”, Chișinău, Republica Moldova, 24-25 octombrie 2013; Simpozionul Științific Internațional „Agricultura Modernă – Realizări și Perspective”, consacrat aniversării a 80 de ani de la înființarea Universității Agrare de Stat din Moldova, Chișinău, 2013; Международный симпозиум «Защита растений – результаты и перспективы», Кишинев, 27-28 октября 2015 года; Simpozionul Științific Internațional „Horticultura modernă – realizări și perspective”, dedicat aniversării a 75 de ani de la fondarea Facultății de Horticultură a Universității Agrare

de Stat din Moldova și 75 de ani ai învățământului superior horticol din Republica Moldova, 1-2 octombrie, Chișinău, 2015; Міжнародно науково-практична конференція «Біотехнологічні системи виробництва і застосування засобів біологізації землеробства», Одеса, 3-7 жовтня 2016 року.

Publicațiile la tema tezei. Rezultatele obținute sunt reflectate în 18 lucrări științifice (inclusiv 10 fără coautori), dintre care 3 articole în reviste recenzate naționale și 15 comunicări în cadrul unor manifestări științifice naționale și internaționale.

Volumul și structura tezei. Teza constă din introducere, patru capitole, concluzii generale și recomandări practice, bibliografie din 213 titluri, volumul total de 146 pagini, 34 tabele, 62 figuri și 12 anexe.

Cuvinte-cheie: *Erwinia amylovora*, măr, păr, gutui, intensitatea atacului, susceptibilitatea soiurilor, identificare, combatere, eficacitate biologică, eficiență economică.

CONȚINUTUL TEZEI

În **Introducerea** lucrării se argumentează actualitatea și importanța problemei abordate, sunt formulate scopul și obiectivele tezei, se descrie noutatea științifică a rezultatelor obținute, importanța teoretică și valoarea aplicativă a cercetărilor, implementarea rezultatelor, sumarul compartimentelor tezei și aprobarea rezultatelor, publicațiile în cadrul temei cercetate, structura și volumul lucrării, termenii cheie.

1. FOCUL BACTERIAN AL ROZACEELOR – *ERWINIA AMYLOVORA* (BURR.) WINSL. ET AL.

Compartimentul include sinteza informației expuse în literatura de specialitate privind bacteria *Erwinia amylovora*, care produce focul bacterian al rozaceelor, cea mai periculoasă boală pentru plantațiile de gutui, păr și măr. Aici găsim informații ample referitor la simptomele focului bacterian, plantele gazdă, răspândire, nocivitate, caracteristica bacteriei *Erwinia amylovora*, metode de diagnostic al agentului fitopatogen, măsuri de combatere, aspecte istorice și economice ale focului bacterian al rozaceelor în Republica Moldova.

2. CONDIȚII, MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE

Lucrarea include rezultatele științifice obținute în perioada studiilor de doctorat, cât și ale programului individual de cercetare în cadrul proiectului instituțional „Biotehnologia producerii și aplicării preparatelor pentru combaterea organismelor daunatoare”-10.04.038 F. Investigațiile de laborator au fost realizate în: Laboratorul „Fitopatologie și biotehnologie” al Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor (mun. Chișinău, Republica Moldova); Laboratorul „Bacteriologie” al Centrului de Carantină, Identificare, Expertize de Arbitraj și Dezinfectare a Producției (mun. Chișinău, Republica Moldova); Secția Bacteriologie al Inspectoratului Central pentru Protecția plantelor și semințelor (or. Torun, Polonia). Cercetările au fost efectuate în decursul anilor 2003-2014.

2.1. Condiții agroecologice din Republica Moldova. Republica Moldova are o climă temperat-continentală, ce se formează ca urmare a poziției țării la distanță

aproximativ egală de ecuator și de Polul Nord. Radiația solară, dinamica maselor de aer și relieful formează o climă cu ierni relativ blânde și cu puțină zăpadă, cu veri lungi, călduroase și cu umiditate redusă. Valorile temperaturilor medii anuale alcătuiesc 7,8⁰C în Nord (Briceni), 9,5⁰C în Centru (Chișinău) și 10,0⁰C în Sud (Cahul), iar precipitațiile medii anuale variază de la 617 mm în Nord și sub 500 mm în Sud-Est. Temperatura maximă atinge +40⁰C, iar cea minimă circa –30 –35⁰C. Clima este moderat continentală [22].

2.2. Locul efectuării experiențelor staționare și condițiile climaterice din perioada vegetației. Experiențele de câmp s-au desfășurat pe teritoriul Stațiunii Experimentale a Institutului Științifico - Practic de Horticultură și Tehnologii Alimentare (IȘPHTA) la măr, păr și gutui.

Condițiile climaterice din anii incluși în studiu au fost diferite de la an la an și au dus la manifestarea sau lipsa simptomelor bacteriozei în funcție de fenofazele culturilor pomicole.

Temperatura medie diurnă în lunile aprilie-mai ale anului 2012 a variat de la 13,3⁰C la 19,2⁰C [22], iar precipitațiile din această perioadă au contribuit la înmulțirea bacteriilor fitopatogene. Condițiile meteorologice din următoarele luni, de asemenea, au favorizat dezvoltarea bacteriozei, fiind depistate simptome pe fructe, frunze și lăstari tineri. Condițiile climatice din perioada de vegetație ale anului 2013 la fel au contribuit la răspândirea bacteriozei și creșterea intensității atacului la culturile pomicole sămânțoase.

2.3. Obiecte de cercetare în condiții de laborator și câmp. În experiențele de laborator au fost incluse tulpinile de referință *Erwinia amylovora* E10 (Institutul Științifico-Practic de Horticultură și Tehnologii Alimentare, Chișinău); PD 4072 *Erwinia amylovora* (Laboratorul Central Fitosanitar, București); NCPPB 683 *Erwinia amylovora* (Colecția Națională de Bacterii Fitopatogene, FERA, York, UK) și 179 de izolate bacteriene obținute din probe de măr, păr și gutui.

În experiențele de câmp, ca obiect de cercetare au servit soiuri de măr, păr și gutui din diferite exploatații pomicole, livezi părăsite și gospodării auxiliare ale populației amplasate în cele trei zone geografice ale Republicii Moldova (Tabelul 2.1). Monitoringul fitosanitar s-a efectuat din primăvară, începând cu perioada umflării mugurilor, până în toamnă după scuturarea frunzelor.

Tabelul 2.1. Localități din Republica Moldova unde au fost observate simptome de foc bacterian

Zona geografică a Republicii Moldova	Raionul	Localitatea
Nord	Municipiul Bălți	Sadovoe
	Dondușeni	Frasin, Țaul, Pocrovca
	Drochia	Gribova
	Edineț	Ruseni
	Rîșcani	Hiliuți, Pîrjota
	Sângerei	Rădoaia
	Soroca	Slobozia Cremene, Vădeni
Centru	Municipiul Chișinău	Codru, Bubuieci, Băcioi, Sîngera

Continuarea tabelului 2.1.		
Centru	Nisporeni	Bălănești, Milești
	Ialoveni	Puhoi
	Anenii-Noi	Chetrosu, Țânțăreni
	Căușeni	Săiți, Zaim
Sud	Cahul	Badikul Moldovenesc, Brînza
	Cantemir	Gotești, Țiganca
	Leova	Sărata Nouă
	Ștefan Vodă	Purcari, Tudora
	Taraclia	Aluatu
	U.T.A. Găgăuzia	Congaz, Chirsova, Svetlii

Pentru testele de patogenitate au fost utilizate fructe verzi de păr (soiul Noiabrskaiia, Sokrovișce și Vîstavocinaia), fructe verzi de măr (soiul Golden Delicious), lăstari tineri de gutui (soiul Auriu), fructe verzi de tomate (soiul Cristal).

2.4. Determinarea gradului de afectare a pomilor de către bacterioză. Pentru evaluarea gradului de afectare a pomilor de către bacterioză s-a folosit o scară cu 6 note [23], iar frecvența (F%) și intensitatea atacului (I%) au fost evaluate conform formulelor din literatura de specialitate [21].

2.5. Produse de uz fitosanitar utilizate în experiențe. În experiențele de câmp au fost utilizate următoarele produse chimice: soluție de 1-3% zeamă bordeleză; Bouillie Bordelaise (770 g/kg sulfat de cupru neutralizat cu hidroxid de calciu, „Cerexagri B.V.”, Franța); Kocide 2000 (538 g/kg hidroxid de cupru, „Du Pont International Operations Sarl”, Elveția), Cuproxat SC (345 g/l sulfat de cupru tribazic, „Nufarm GmbH & Co KG”). Dintre produsele biologice au fost experimentate Paurin (*Pseudomonas fluorescens* CNMN-Pb-04, cu titrul 10^9 ufc/ml, IGFPP), Rizoplan (*Pseudomonas fluorescens* AR-33, cu titrul 5×10^8 ufc/ml, IGFPP), Trihodermină Th-7F-BL (*Trihoderma harzianum* Rifai, cu titrul 15×10^8 ufc/ml, IGFPP) [24, 25] și suspensie bacteriană de *Pseudomonas aureofaciens* CNMN-Pb-05 cu titrul 10^7 ufc/ml.

2.6. Determinarea acțiunii antagoniste a diferitelor tulpini bacteriene și a produselor cuprice față de *Erwinia amylovora* în condiții de laborator. Determinarea acțiunii antagoniste a agenților biologici și a produselor cuprice a fost efectuată prin metoda discurilor din hârtie de filtru în cutii Petri, pe mediul nutritiv gelozat [26]. Pentru fiecare produs au fost utilizate câte 3 cutii. După o incubare de 3 zile la 26°C , erau vizualizate eventualele zone sterile din jurul discului. În varianta control a fost utilizată apă sterilă.

2.7. Montarea experiențelor de câmp la măr, păr și gutui. Variantele experimentale au fost distribuite randomizat, conform indicațiilor din literatura de specialitate [27]. Tratamentele au fost aplicate până la înflorire, în perioada înfloririi pomilor și creșterii intensive a lăstarilor. La pomii cu simptome de bacterioză tratamentele au fost aplicate după înlăturarea organelor afectate. Repetițiile au fost amplasate randomizat pe câte un rând din fiecare soi. Eficiența tratamentelor a fost evaluată după 7 zile de la ultimul tratament.

2.8. Determinarea eficienței biologice și economice a produselor experimentate. Eficacitatea biologică a produselor fitofarmaceutice a fost determinată conform relației [21]:

$E\% = \frac{(P_k - P_o) \times 100}{P_k}$, unde: E – eficacitatea biologică a reducerii atacului comparativ cu martorul; P_k – procentul de dezvoltare a bolii în martor; P_o – procentul de dezvoltare a bolii în varianta tratată.

Pentru determinarea eficienței economice a tratamentelor, s-au considerat datele colectate de la soiul Renet Simireno. Prelucrarea datelor și calculul indicatorilor de eficiență economică au fost făcute în baza datelor prelevate din contabilitatea SC „Exardiv-Com” SRL. În experiență au fost studiați următorii indicatori: cheltuielile totale (lei/ha); veniturile totale (lei/ha); costul la unitatea de produs (lei/t); prețul de vânzare a produsului (lei/t); profitul la unitatea de suprafață (lei/ha); rata rentabilității (%) [28].

2.9. Identificarea tulpinilor bacteriene obținute din plantele gazdă. Testele de identificare a izolatelor bacteriene au fost efectuate pentru confirmarea identității agentului patogen din probele prelevate și concretizarea arealului de răspândire a bolii. Părțile de plante cu simptome de necroză și exsudat bacterian au fost colectate în timpul sondajelor fitosanitare și pregătite pentru analize conform indicațiilor din literatură [29]. Însămânțarea maceratului a fost efectuată prin metoda epuizării în trei cutii Petri de 10 cm Ø, utilizând câte 0,1 ml pentru fiecare probă, pe trei medii nutritive: King B, CGA (cartof – glucoză – agar) și CPA (carne – pepton – agar). Incubarea a decurs la 27°C, iar rezultatele au fost citite după 24 - 72 ore. Tulpina de referință a fost însămânțată și menținută în aceleași condiții. Coloniile suspecte au fost supuse purificării prin epuizarea de ansă, în eprubete cu mediul nutritiv înclinat King B și incubate la 27°C. Culturile pure au fost menținute pe mediul CGA, la +5°C și reînsămânțate peste fiecare 3 luni, iar pentru determinarea hipersensibilității izolatelor bacteriene am utilizat plante de *Pelargonium* sp. [30]. Pentru fiecare izolat au fost făcute câte trei injectări cu suspensie de 10⁶ ufc/ml. Pentru control am utilizat apă sterilă. Plantele, după inoculare, au fost menținute în condiții de cameră, iar reacția a fost vizualizată după 24 ore.

Pentru determinarea caracterelor morfologico-culturale și particularităților fiziologico-biochimice ale tulpinilor bacteriene au fost îndeplinite următoarele lucrări: colorarea bacteriilor după Gram; microscopie optică și electronică pentru depistarea mobilității, formei și dimensiunii celulelor bacteriene; cultivarea pe mediile diagnostice King B [31], mediul Cross & Goodman [32], mediul CCT [33], mediul Levan [34], mediul MM1, mediul MM1Cu [35]; stabilirea necesității bacteriilor în factori de creștere, tipului de metabolism și de producere a lecitinazei; determinarea sursei de carbon utilizate și a enzimelor saharolitice; stabilirea punctului termic letal, a creșterii la diferite temperaturi și toleranței bacteriei la clorura de sodiu; Testul Voges-Proskauer; formarea de levan; producerea de catalază; reacția oxidazei; hidroliza amidonului și gelatinei; prezența enzimelor proteolitice; acțiune asupra laptelui; eliminarea indolului; producerea și eliminarea de amoniac; reducerea nitraților; cultivarea izolatelor bacteriene pe diferite medii nutritive diagnostice

lichide și solide; cultivarea izolatelor pe felii de cartof pentru depistarea prezenței fermenților pectinolitici [14-20, 36].

Testul de patogenitate în condiții de laborator și câmp. Fructe verzi de păr cu diametru de cca 1,5 – 4 cm au fost dezinfectate cu alcool de 70% apoi spălate cu apă sterilă. După uscare, în condiții sterile, fructele au fost inoculate, prin înțepare în trei puncte, cu un ac cu inocul, achiziționat direct din colonii de 48 ore și cu suspensie bacteriană (titrul de $10^7 - 10^8$ cfu/ml) obținută din izolate de 24 ore, prin injectare sub piele. Fructele inoculate au fost incubate la $26^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$, fiind examinate peste două, patru și șapte zile [37]. Rezultatul era considerat pozitiv dacă în zona inoculată după 2-5 zile apăreau necroze cu picături de exudat bacterian. Izolatele care au produs numai necroze, fără picături de exudat, au mai fost testate pe fructe nematurate de tomate. Acestea au fost sterilizate ca și fructele de măr, apoi inoculate cu câte 100 μ l de suspensie bacteriană de $10^6 - 10^7$ cfu/ml și incubate în condiții de cameră umedă pentru 10 zile la $25^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$. Fructele martor au fost injectate cu apă sterilă. Pentru fiecare izolat au fost utilizate câte trei fructe. În cazul depistării unui putregai uscat în zona inoculată izolatul era considerat ca specie de *Pseudomonas sp.* În condiții de câmp fructele de păr (soiul Sokrovișce) au fost injectate sub epidermă în trei puncte. În varianta control a fost utilizată apă sterilă. Apariția eventualelor simptome de atac au fost evaluate peste 2, 3, 7 și 10 zile după inoculare.

2.10. Analiza tulpinii *Erwinia amylovora* P5 prin metode contemporane. Pentru identificarea izolatului P5, obținut din plante de măr cu simptome de bacterioză, conform recomandărilor Organizației Europene și Mediteraniene de Protecție a Plantelor [29], au fost aplicate următoarele metode de analiză: sistemul standardizat API 20E, gaz-cromatografia acizilor grași, reacția de polimerizare în lanț (PCR), DAS-ELISA și imunofluorescența indirectă (IF).

3. IDENTIFICAREA ȘI DETERMINAREA PARTICULARITĂȚILOR BIOLOGICE ALE AGENTULUI PATOGEN AL FOCULUI BACTERIAN AL ROSACEELOR (*ERWINIA AMYLOVORA*)

3.1. Simptomele bacteriozei și gradul de afectare a pomilor de către focul bacterian al rozaceelor. Monitorizarea culturilor de măr, păr și gutui s-a soldat cu depistarea simptomelor de bacterioză pe muguri, flori, frunze, fructe, lăstari, ramuri și tulpini. Infecția nu s-a manifestat cu aceeași intensitate în fiecare an, primele simptome fiind depistate în timpul și imediat după înflorire [38-42]. În condițiile zonei centrale a Republicii Moldova, anii 2012 și 2013 au fost favorabili pentru dezvoltarea focului bacterian al rozaceelor, care, la o răspândire de 37,7%, calculată la 100 pomi de măr, atinge intensitatea de 5,7% [43]. În perioada înfloririi pomilor, simptomele bolii s-au manifestat prin hidrozarea și ofilirea florilor, urmate de brunificare la măr și gutui, iar la păr – înnegrire. Pe lăstari simptomele bacteriozei au fost depistate începând cu faza lor inițială de creștere și până în luna august. Pe lăstari și ramuri mai vechi au fost frecvent depistate ulcerații și exsudări [44, 45].

Principalele soiuri de măr, păr și gutui, existente în cultură pe teritoriul Republicii Moldova, au reacționat diferit la atacul focului bacterian. Simptomele bacteriozei au fost depistate la soiurile de măr cu diferită epocă de coacere. Printre cele mai

sensibile au fost Idared, Mantuaner, Reglindis și Renet Simirencu, care fac parte din grupa soiurilor aflate în cultură, atât în livezile industriale, cât și în multe gospodării particulare. Din cele 25 de soiuri de măr studiate, nu au prezentat simptome de bacterioză următoarele: Generos, Calvil de zăpadă, Banană de iarnă, Candil Sinap, Richard Delicious și Starkrimson Delicious (Tabelul 3.1).

Tabelul 3.1. Comportamentul pomilor de măr la atacul focului bacterian al rozaceelor

Nr. d/o	Gradul de afectare	Soiuri		
		de vară	de toamnă	de iarnă
1.	0	-	Generos, Calvil de Zăpadă	Banană de iarnă, Candil Sinap, Richard Delicious*, Starkrimson* Delicious
2.	1	Slava Peremojțiam	Prima, Remo, Sir Prise*	Florina, Jonagold, Jonathan, Renet de Champagne, Wagener Premiat
3.	2	Red Melba, Șafran de vară	Spartan	Campion, Golden Delicious, GoldSpur,
4.	3	-	Reglindis*	Idared, Mantuaner, Renet Simirencu
5.	4	-	-	-

*- soiuri excluse din Catalogul soiurilor de plante al Republicii Moldova.

Toate soiurile de păr și gutui incluse în studiu au manifestat simptome de bacterioză, iar pomii au fost afectați în dependență de soi de la unu până la trei grade, uscându-se până la 25% din lăstarii și ramurile de schelet (Tabelul 3.2).

Tabelul 3.2. Comportamentul pomilor de păr și gutui la atacul focului bacterian al rozaceelor

Nr. d/o	Gradul de afectare	Soiuri	
		de păr	de gutui
1.	0	-	-
2.	1	Generalul Leclerk, Kieffer's Seedling, Untoasa Bosc, Williams, Zorka	-
3.	2	Noiabraskaia, RX 1247, Vîstavocinaia	Auriu, Zarea
4.	3	Sokrovișce	Codreanca, Cometa, Iujanka, Turunciukskaia, Urojainaia
5.	4	-	-

Conform rezultatelor obținute, în condițiile Republicii Moldova, speciile pomicele sămânțoase sunt susceptibile la atacul focului bacterian al rozaceelor, care, pe lângă daunele produse direct mai diminuează și recolta din anul viitor.

3.2. Frecvența și intensitatea atacului focului bacterian la culturile pomicele sămânțoase. Soiurile predominante de măr existente în cultură, la inițierea

observațiilor, au fost Jonathan, Mantuaner, Starkrimson Delicious, Banană de Iarnă, Idared, Slava Peremojțiam, Red Melba, Șafran de vară, GoldSpur și Wagener Premiat. Dintre cele opt soiuri prezentate în figura 3.1, simptome de bacterioză au manifestat doar patru. Cu o frecvență de 9,0% și o intensitate de 1,6%, boala s-a manifestat la soiul Mantuaner, iar la soiurile Jonathan și Idared cu frecvență de 2,0% și intensitatea de 0,4% [46].

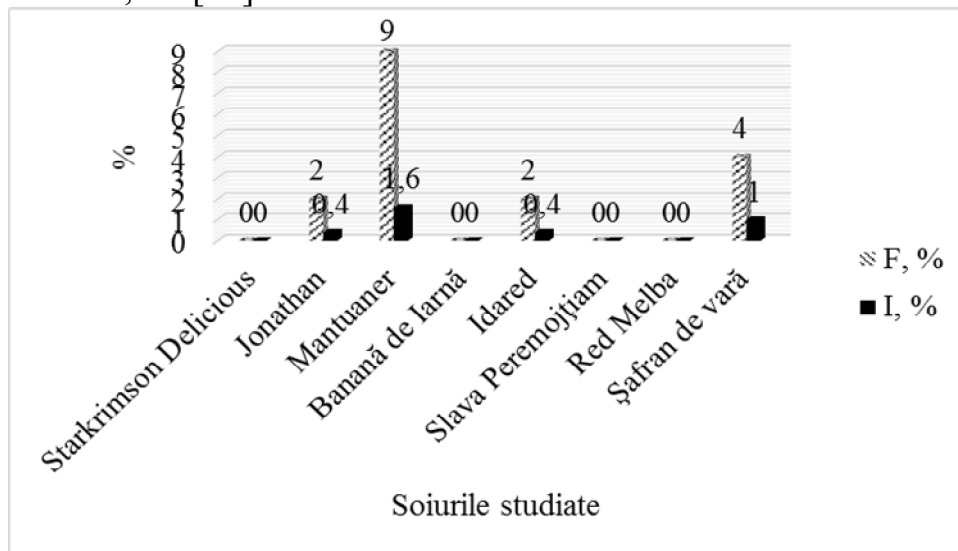


Fig. 3.1. Frecvența și intensitatea atacului focului bacterian în livada de măr a Institutului Științifico-Practic de Horticultură și Tehnologii Alimentare.

Simptome de bacterioză nu au fost depistate la soiurile Starkrimson Delicious, Banană de Iarnă, Slava Peremojțiam și Red Melba.

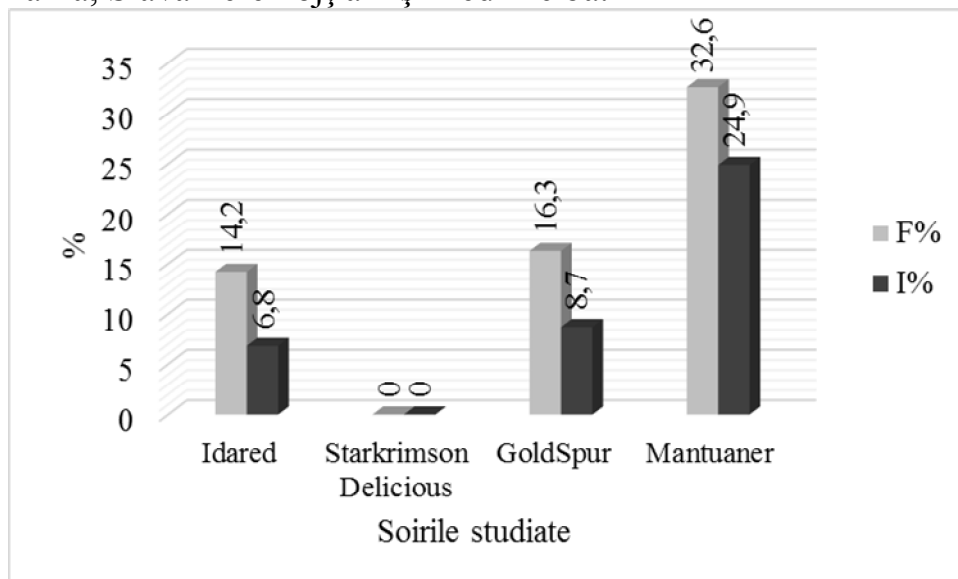


Fig. 3.2. Frecvența și intensitatea atacului de foc bacterian la măr – r. Sângerei, satul Rădoia.

Conform datelor din figura 3.2 observăm că, din cele 4 soiuri de măr examinate într-o altă livadă din zona de nord a Republicii Moldova, doar la Starkrimson Delicious nu au fost depistate simptomele bacteriozei. La restul soiurilor boala s-a manifestat cu frecvență variată de la 14,2% până la 32,6%. Mai puternic a fost afectat soiul Mantuaner, unde intensitatea atacului a constituit 24,9%.

Din cele șase soiuri de măr studiate, într-o livadă particulară din satul Japca (raionul Fălești), doar la Starkrimson Delicious n-au fost depistate simptomele bolii (Figura 3.3), cel mai puternic fiind afectat Mantuaner, la care intensitatea atacului a fost de 23,7% la o frecvență de 46,3%.

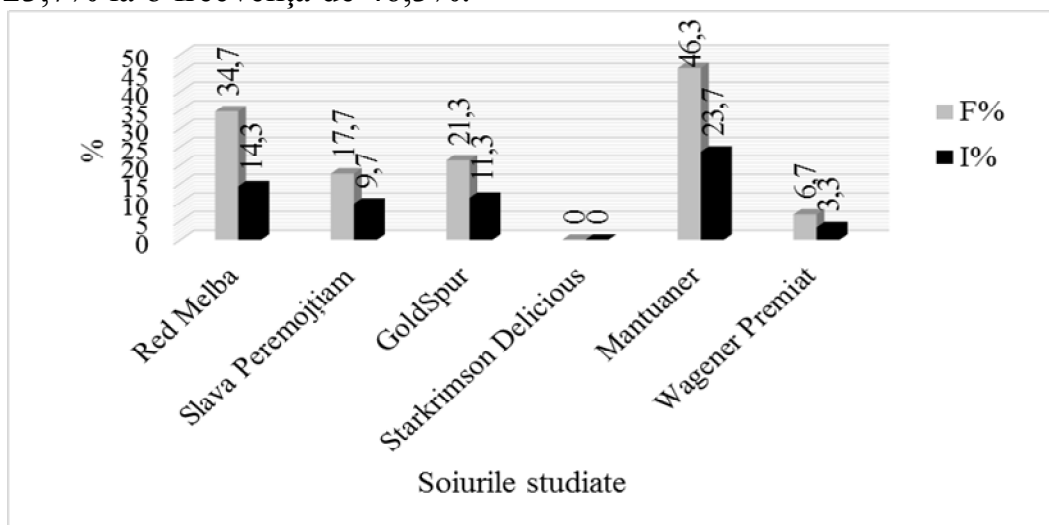


Fig. 3.3. Frecvența și intensitatea atacului de foc bacterian la măr – r. Fălești, satul Japca.

Astfel, din cele zece soiuri de măr examinate, șase au prezentat simptome de foc bacterian. La soiurile Starkrimson Delicious, Banană de Iarnă, Slava Peremojtiã și Red Melba n-au fost depistate simptome de atac, pe când Mantuaner a fost cel mai susceptibil în toate cele trei livezi, boala manifestându-se cu diferită intensitate.

Soiurile de păr și gutui s-au comportat diferit la atacul bacteriozei (Tabelul 3.3).

Tabelul 3.3. Frecvența și intensitatea atacului de foc bacterian în livada de păr și gutui a ICP

Soiuri de păr	F%	I%	Soiuri de gutui	F%	I%
Noiabrskaaia	44,0	13,2	Cometa	38,0	10,4
Generalul Leclerk	48,0	12,0	Codreanca	32,0	8,8
Sokrovișce	62,0	17,6	Turunciukskaia	18,0	4,4
RX 1247	26,0	6,8	Iujanka	52,0	17,6
Vîstavocinaia	14,0	3,2	Auriu	14,0	3,2

Toate variațiile de păr incluse în studiu au fost sensibile la *E. amylovora*, însă cel mai puternic a fost atacat soiul Sokrovișce, unde intensitatea atacului a fost de 17,6% la o frecvență de 62,0%. Mai puțin sensibil a fost soiul Vîstavocinaia, unde intensitatea atacului a constituit 3,2% la o frecvență a bolii de 14,0%. Boala la gutui s-a răspândit în dependență de soi, de la 14,0% până la 52,0%, atingând o intensitate a atacului de la 4,4% până la 17,6%, cel mai sensibil fiind Iujanka.

3.3. Caractere morfologico-culturale și fiziologico-biochimice ale izolatelor obținute din plante de măr, păr și gutui. Dintre cele 179 de izolate bacteriene, care s-au colorat negativ după Gram, 172 au produs necroze pe frunze de *Pelargonium* sp. Dintre acestea, 68% au format necroze și exudat bacterian pe fructele verzi de păr, iar 30% au format pigment fluorescein pe mediul King B și putregai uscat pe fructele verzi de tomate. În dependență de rezultatele obținute, izolatele au fost divizate în două grupe (Tabelul 3.4).

Tabelul 3.4. Particularitățile fiziologo-biochimice ale izolatelor bacteriene obținute din măr, păr și gutui

Caractere biologice	Tulpina de referință E10	Grupa I - izolate fără fluorescență pe mediul King B	Grupa II - izolate fluorescente pe mediul King B
Colorația Gram	-	-	-
Formare de pigment fluorescein	-	-	+
Levan	+	+	+
Testul de oxidare fermentare (O/F)	O+/F+	O+/F+	O+/F-
Testul Kovacs	-	-	+
Testul Voges-Proskauer	+	+	Variabil
Hidroliza amidonului	-	-	Variabil
Hidroliza gelatinei	+	+	+
Producere de catalază	+	+	+
Reducerea nitraților	-	-	Variabil
Creștere la 39°C	-	Variabil	Variabil
NaCl, 5%	-	Variabil	Variabil
Ureaza	-	-	+
Indol	-	-	-
H ₂ S	-	-	-
Surse de carbon utilizate:			
Zaharoză	+	+	+
Glucoză	+	+	+
Lactoză	+	Variabil	-
Maltoză	+	+	-
Manitol	+	Variabil	+
Glicerol	+	+	+

+ = *test pozitiv*; - = *test negativ*

Conform rezultatelor obținute, cele 20 de izolate bacteriene din grupa I s-au colorat roz-roșu după Gram și n-au format pigment fluorescein pe mediul King B; au format levan și au produs acetoină; la testul de oxidare și fermentare au reacționat pozitiv, iar la testul Kovacs și hidroliza amidonului – negativ; au hidrolizat gelatina și au produs catalază; n-au produs urează, indol, acid sulfuric și n-au crescut la 39°C; au reacționat negativ la testul Griess; au utilizat zaharoza, glucoza, maltoza și glicerol fără formare

de gaz, iar patru tulpini n-au utilizat lactoză și manitol, spre deosebire de tulpina de referință [47, 48].

Prin examinare la microscop au fost depistate celule bacteriene în formă de bețișoare, cu capetele rotunjite, dispuse izolat, mai rar câte două sau în grupe, cu dimensiunea de 1,15-1,63 x 0,56-0,62 μ , având flageli dispuși peritrih, ce se mișcau haotic în lichid. Analiza morfologică a coloniilor formate de izolatele obținute din probe, cât și a tulpinilor de referință a evidențiat faptul că: pe mediul MM2 cu cupru, peste 48 ore, s-au format colonii tipice galbene, care după 72 ore au devenit mucoide; în cazul mediului MM1 fără cupru nu am depistat nici o creștere peste 48 ore; pe mediul CCT, majoritatea izolatelor au format colonii violet-pal, rotunde, convexe și netede, care după 72-96 ore deveneau mucoide; pe mediul Levan au fost depistate creșteri după 24 ore, cu formare de coloniile surii, rotunde, puternic bombate, netede, care deveneau mucoide peste 48-72 ore de incubare; pe mediul King B, după 24 - 48 de ore, izolatele formau colonii mici, unele alb-cremoase, altele alb-murdar, rotunjite, plate sau puțin bombate, dintre care fiind expuse la raze UV, după 48-72 ore de incubare, unele apăreau fluorescente, iar altele fără pigmentație [49]. Izolatele din grupa I, fiind însămânțate pe felii de cartofi, nu au manifestat fermenți pectinolitici, iar cele din grupa II au produs înmuierea țesutului de cartof. Pe agarul înclinat, după 48 ore de cultivare, am obținut colonii abundente, netede, plate, alb-murdare, de 2-3 mm. Pe bulionul de carne cu pepton izolatele au format colonii mici, rotunde, cu diametrul de 2-4 mm, alb-murdare, opalescente, strălucitoare, uleioase și cu marginile întregi. Caracterile manifestate de izolatele din grupa I au fost specifice bacteriei *Erwinia amylovora* [50].

3.4. Analiza tulpinii *Erwinia amylovora* P5 cu aplicarea metodelor contemporane. Conform Autorității Europene pentru Siguranța Alimentelor [6], *E. amylovora* este reglementată de Directiva 2000/29/EC și poate fi identificată în baza rezultatelor înregistrate la aplicarea metodelor moderne disponibile, atât pe materialul vegetal simptomatic, cât și pe cel asimptomatic. La determinarea caracterelor biochimice ale izolatului P5 prin aplicarea testului API 20E, a fost obținut profilul numeric 0005522, identic tulpinei de referință PD 4072 *Erwinia amylovora*. Prin analiza PCR a fost demonstrată prezența regiunii cromozomiale *ams* de 187 kb specifică bacteriei *E. amylovora*. La analiza acizilor grași prin metoda Gaz-Cromatografie, am obținut indicii 0,908 și 0,927, izolatul P5 fiind identificat ca specia *Erwinia amylovora*. După aplicarea metodei DAS-ELISA, valoarea eșantionului izolatului P5 după prima citire a fost de 2,9 ori mai mare decât valoarea controlului negativ. Pentru martorul de referință, valoare medie a fost de 0,056, fiind de 2,3 ori mai mare decât în varianta martor. După a doua citire valoarea medie de absorbție a eșantionului a fost de 0,11, depășind controlul negativ de 9,2 ori, iar controlul pozitiv – de 8,5 ori. Reieșind din principiul evaluării rezultatelor pozitive, eșantionul P5 este identificat prin tehnica DAS-ELISA ca *Erwinia amylovora*. Prin examinarea probelor fixate la microscopul cu epifluorescență, au fost depistate celule bacteriene cu fluorescență verde în toate cele trei diluții utilizate, confirmând rezultatul pozitiv al analizei [51].

Analiza complexă a rezultatelor obținute după îndeplinirea testelor clasice și moderne (testul API 20E, Gaz-cromatografie, PCR, DAS-ELISA, Imunofluorescență indirectă), precum și a testului de patogenitate, a permis identificarea culturii P5 ca specia *Erwinia amylovora* (Burill) Winslow et al.

3.5. Apariția simptomelor bolii și manifestarea caracterului infecțios al agentului patogen. Confirmarea postulatelor lui Koch. După inocularea încrucișată a lăstarilor de gutui, fructelor verzi de păr și de măr, am obținut simptome de foc bacterian în toate variantele experimentale, manifestate prin necroze și exudat bacterian. Pe fructe au apărut brunificații după trei zile de incubare, iar exudatul bacterian s-a format după patru-cinci zile. Brunificarea frunzelor, urmate de îndoirea vârfului lăstarilor de gutui și apariția picăturilor de exsudat bacterian a fost observată după 8-10 zile după inoculare. Din maceratele obținute din fructele și lăstarii cu simptome de foc bacterian, apărute după inoculare, au fost efectuate însămânțări în cutii Petri pe mediile nutritive specifice agentului fitopatogen. După trei zile de incubare la 27 °C, pe toate mediile de cultură au apărut colonii cu morfologie specifică bacteriei *E. amylovora*.

Agresivitatea tulpinilor locale de *E. amylovora* în condiții de câmp, au fost urmărite în rezultatul inoculărilor efectuate pe fructe verzi de păr direct pe pom (Tabelul 3.5).

Tabelul 3.5. Simptome obținute după inocularea fructelor de păr cu suspensie de *Erwinia amylovora*

Data	Temperatura medie diurnă, °C	Umiditatea aerului, %	Simptome
21.06.04	22,2	57,0	-
22.06.04	22,0	60,0	Fără simptome vizibile.
23.06.04	20,9	46,0	Întunecarea țesutului în zona inoculată.
24.06.04	22,4	40,0	Mărirea suprafeței întunecate în zona infectată și apariția picăturilor mici, cu aspect translucid și lipicios de exsudat bacterian.
25.06.04	24,8	38,0	Mărirea zonei necrozate și cantitatea exsudatului bacterian.
26.06.04	20,4	60,0	Mumificarea fructelor infectate.

Simptome vizibile ale bolii au apărut după două zile de la inocularea fructelor de păr, manifestându-se prin întunecarea țesutului în zona inoculată, urmate de apariția exsudatului bacterian și mumifiere totală după șase zile de la infectare. După inocularea repetată a fructelor, am obținut simptome similare după patru zile, astfel fiind confirmate postulatele lui Koch [52].

Simptomele caracteristice focului bacterian, apărute pe fructele și lăstarii infectați, dovedesc natura virulentă a izolatelor utilizate și capacitatea unui inocul bacterian, prezent la o specie sămânțoasă, de a iniția rapid boala, în condiții de mediu favorabil, la restul culturilor pomicole.

4. INTERACȚIUNEA *ERWINIA AMYLOVORA* x PLANTA GAZDĂ ÎN VEDEREA DETERMINĂRII EFICIENȚEI MIJLOACELOR DE COMBATERE

4.1. Acțiunea antagonistă a tulpinilor de *Pseudomonas* sp. și *Bacillus* sp. în condiții de laborator. Ca urmare a studiului acțiunii compoziției mediului de nutriție asupra creșterii și proprietății antagoniste a microorganismelor nepatogene din colecția Laboratorului Fitopatologie și Biotehnologie [53, 54] față de fitopatogenul *E. amylovora*, a fost selectată tulpina antagonistă *Pseudomonas aureofaciens* CNMN-PsB-05, care a format cele mai mari zone sterile în jurul discurilor din hârtie de filtru (Tabelul 4.1).

Tabelul 4.1. Acțiunea antagonistă a tulpinii *Pseudomonas aureofaciens* CNMN-PsB-05 față de *Erwinia amylovora*

Nr. d/o	Perioada de incubație, zile	Zona de inhibare formată de sbc*, mm	Zona de inhibare formată de sbf**, mm	Zona de inhibare formată de mbf***, mm
1.	4	16,9±3,5	0,0	14,8±2,0
2.	15	18,7±3,1	16,6±1,3	14,7±1,6
3.	30	18,3±2,9	16,4±2,4	14,2±2,1
4.	60	18,1±2,7	16,5±0,45	14,4±2,7
5.	90	17,9±1,6	16,6±1,5	13,9±2,2
6.	120	17,7±2,5	16,3±1,6	13,5±1,4
8.	180	17,3±1,2	16,4±3,1	13,1±2,5

*sbc - suspensie bacteriană păstrată în condiții de cameră; **sbf - suspensie bacteriană păstrată în condiții de frigider; ***mbf - metaboliți bacterieni păstrați în condiții de frigider.

Rezultatele obținute denotă că suspensia de *P. aureofaciens* CNMN-PsB-05, fiind păstrată în condiții de cameră, își păstrează caracterul antagonist în decurs de șase luni de la producere și poate fi aplicată contra *E. amylovora* fără separare de metaboliți.

4.2. Eficacitatea biologică a produselor cercetate față de *Erwinia amylovora*. După 48 ore de incubare, pe mediul agarizat King B, am depistat zone sterile în jurul picăturilor de soluții cuprice în toate variantele experimentale, bacteria fiind mai puțin sensibilă față de Cuproxat SC (345 g/l CuSO₄), unde zonele de inhibare au fost slab pronunțate. În rezultatul studiului au fost selectate produsele Bouillie Bordelaise (770 g/kg sulfat de cupru neutralizat cu hidroxid de Ca) și Kocide 2000 (538 g/kg hidroxid de cupru), pentru aplicare în condiții de câmp la măr, păr și gutui.

Prezența rezervei de infecție cu *E. amylovora* pe plante a fost confirmată după efectuarea testului de aglutinare [55]. Rezultatele experimentale obținute după aplicarea produselor cuprice și biologice la culturile pomicele sămânțoase [55-58] sunt prezentate în tabelele 4.2 – 4.6.

Tabelul 4.2. Eficacitatea biologică a biopreparatelor aplicate contra focului bacterian la gutui - (după trei tratamente la soiul Iujanca)

Nr. d/o	Variantele experimentale	Norma de consum a preparatului, ml/10 L apă	F, %	I, %	EB, %
1.	Martor netratat	0,0	34,0	10,8	0,0
2.	Paurin	25,0	14,0	4,4	59,22
3.	Trihodermin	25,0	30,0	9,4	12,96
4.	Rizoplan	25,0	27,0	8,8	18,5
DEM ₀₅ = 1,15					

Datele din tabelul 4.2 ne indică că, în urma dezvoltării spontane a bolii la gutui după înflorire, intensitatea atacului în varianta martor a constituit 10,8%, la răspândirea bolii de 34,0%. Din cele trei biopreparate aplicate la gutui, cu aceleași norme de utilizare (25 ml/10 L apă), după trei tratamente pe floare, cea mai înaltă eficacitate – 59,22%, la intensitatea atacului de 4,4%, a fost obținută în varianta tratată cu Paurin. Cea mai joasă eficacitate biologică – 12,96%, la intensitatea atacului de 9,4%, s-a obținut în varianta tratată cu Trihodermină.

După efectuarea tratamentelor la păr cu produse cuprice (Tabelul 4.3), cele mai bune rezultate obținem în varianta cinci și șase, unde a fost aplicată soluție de 2% și 3% zeamă bordeleză, iar eficacitatea biologică a constituit 94,3% și 96,9%, la intensitatea atacului de 1,3% și respectiv 0,7%, față de 22,7% în varianta martor.

Tabelul 4.3. Eficacitatea biologică a produselor cuprice aplicate contra focului bacterian la păr – (tratamente pe lăstari - soiul Sokrovișce)

Nr. d/o	Variantele experimentale	Norma de consum a preparatului, kg/ha	F, %	I, %	EB, %
1.	Martor netratat	0,0	76,7	22,7	0,0
2.	Bouillie Bordelaise	10,0	13,3	3,0	86,8
3.	Kocide 2000	3,0	16,7	4,7	79,3
4.	Soluție de 1% zeamă bordeleză	10,0	26,7	5,3	76,7
5.	Soluție de 2% zeamă bordeleză	20,0	7,0	1,3	94,3
6.	Soluție de 3% zeamă bordeleză	30,0	3,3	0,7	96,9
DEM ₀₅ = 1,15					

Rezultatele obținute, după efectuarea tratamentelor la gutui cu trei produse cuprice înainte și după înflorire (Tabelul 4.4), denotă că cea mai înaltă eficacitate biologică am obținut în variantele tratate cu soluție de 2% și 3% zeamă bordeleză unde intensitatea atacului a fost de 2,0% și respectiv 1,0%, față de 22,0% în varianta martor. Produsele Bouillie Bordelaise și Kocide 2000 au manifestat o eficiență aproape egală, dar mai mică față de varianta tratată cu soluție de zeamă bordeleză.

Tabelul 4.4. Eficacitatea biologică a produselor cuprice aplicate contra focului bacterian la gutui – soiul Iujanca

Nr. d/o	Variantele experimentale	Norma de consum a preparatului, kg/ha	F, %	I, %	EB, %
1.	Martor netratat	0,0	73,3	22,0	0,0
2.	Bouillie Bordelaise	10,0	13,3	3,3	84,9
3.	Kocide 2000	3,0	16,7	4,0	81,8
4.	Soluție de 2% zeamă bordeleză	20,0	6,7	2,0	92,7
5.	Soluție de 3% zeamă bordeleză	30,0	3,3	1,0	95,5
DEM ₀₅ = 1,16					

După efectuarea a trei tratamente după înflorire la soiul Mantuaner (Tabelul 4.5), am obținut cea mai înaltă eficacitate biologică de 88,4% în varianta tratată cu Bouillie Bordelaise la aplicarea dozei de 10 kg/ha, când intensitatea atacului a fost de 2,0% față de 17,3% în varianta martor.

Tabelul 4.5. Eficacitatea biologică a produselor cuprice față de focul bacterian la măr (după trei tratamente la soiul Mantuaner)

Nr. d/o	Variantele experimentale	Norma de consum a preparatului, kg/ha	F, %	I, %	EB, %
1.	Martor netratat	0,0	56,7	17,3	0,0
2.	Bouillie Bordelaise	10,0	10,0	2,0	88,4
3.	Kocide 2000	3,0	16,7	3,3	80,9
4.	Soluție de 1% zeamă bordeleză	10,0	10,0	2,7	84,4
DEM ₀₅ = 1,15					

Valorile rezultatelor experimentale, obținute după efectuare tratamentelor la măr în perioada anului 2014 la soiul Renet Simirencu, sunt prezentate în tabelul 4.6.

Tabelul 4.6. Eficacitatea biologică a tulpinii *Pseudomonas aureofaciens* CNMN-PsB-05 aplicată contra focului bacterian la măr – anul 2014 (soiul Renet Simirencu)

Nr. d/o	Variantele experimentale	Norma de consum a preparatului, kg, l/ha	F, %	I, %	EB, %
1.	Martor netratat	0,0	10,7	1,33	0,0
2.	Bouillie Bordelaise	10,0	2,0	0,27	79,7
3.	Suspensie de <i>P. aureofaciens</i> CNMN-PsB-05 (10 ⁷ ufc/ml)	5,0	3,7	0,41	69,2
DL ₀₅ = 8,71					

Conform datele obținute, focul bacterian s-a manifestat cu o frecvență de 10,7% la intensitatea atacului de 1,33% în varianta martor fără tratamente. Eficacitatea

produsului cupric Bouillie Bordelaise, aplicat înainte și după înflorire, a constituit 79,7% la intensitatea de atac a bacteriozei de 0,27%. Eficacitatea biologică a suspensiei de *Pseudomonas aureofaciens* CNMN-PsB-05, aplicată de două ori în perioada înfloririi, a constituit 69,2% la frecvența atacului de 3,7% și intensitatea de 0,41%.

4.3. Eficiența economică a bactericidelor aplicate la măr contra *Erwinia amylovora*. Începând cu ultima decadă a lunii aprilie și până la sfârșitul lunii august a anului 2012, în livada de măr a gospodăriei Exardiv-Com SRL, au fost depistate simptome de foc bacterian al rozaceelor. Primele simptome, manifestate prin brunificații ale florilor și frunzelor, au fost observate în timpul înfloririi. Ulterior boala a fost depistată pe fructele tinere și lăstarii în creștere. După înlăturarea organelor afectate, au fost efectuate tratamente cu produsul CuproStar 46 SC (460 g/l sulfat de cupru tribazic), cu norma de consum 4,5 l/ha, pentru diminuarea infecției. Procedura de înlăturare a părților vegetale atacate, urmate de un tratament chimic, a fost repetată de 3 ori pe parcursul vegetației. În rezultat, pe lângă pierderile de recoltă, gospodăria a suportat și cheltuieli suplimentare neplanificate în sumă de 20127, 58 lei. Pentru determinarea gradului de infectare a pomilor din livadă cu foc bacterian, au fost examinați câte 50 pomi, în patru repetiții, iar rezultatele obținute sunt prezentate în figura 4.1.

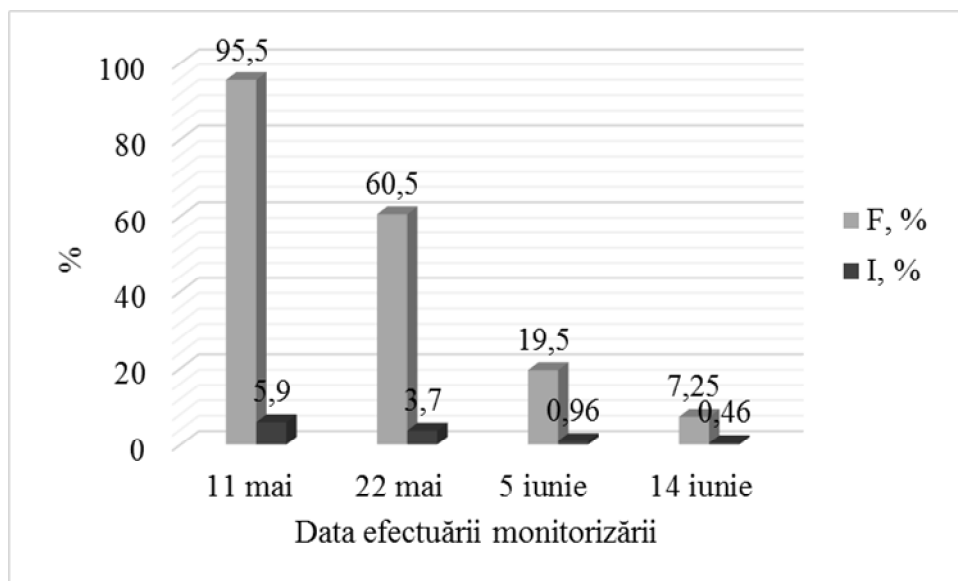


Fig.4.1. Răspândirea și intensitatea atacului focului bacterian la soiul Renet Simirenco (Exardiv-Com SRL în anul 2012).

După înlăturarea organelor afectate, urmate de tratamente cu produsul CuproStar 46 SC, frecvența bolii a scăzut de la 95,5% până la 7,25%, iar intensitate atacului – de la 5,9% la 0,46%.

Luând în considerație că simptomele bacteriozei au fost depistate după trei tăieri ale organelor afectate, urmate de tratamente cu produsul cupric CuproStar 46 SC, a fost luată decizia de a include în sistemul de protecție a livezii preparatul Bouillie Bordelaise, cu norma de consum 10 kg/ha, fiind aplicat prin stropire înainte și după înflorirea culturii, iar pe floare două tratamente cu biopreparatul Paurin (Figura 4.2).

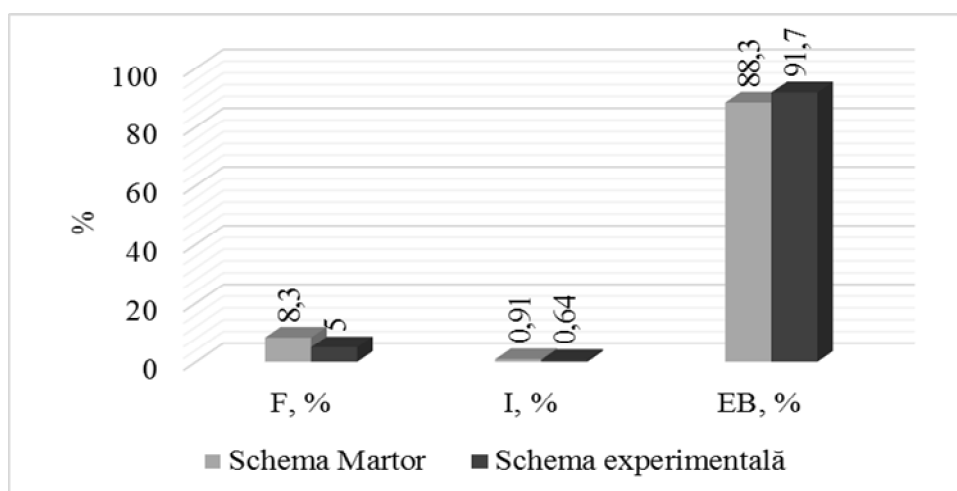


Fig. 4.2. Eficacitatea tratamentelor aplicate la măr contra bacteriozelor (SRL „Excardiv-Com”, anul 2013).

Conform datelor prezentate în figura 4.2, în varianta martor, unde a fost utilizat CuproStar 46 SC, eficacitatea biologică a constituit 88,3%, la intensitatea atacului de 0,91% și o frecvență de 8,3%. În varianta a doua, unde au fost aplicate produsele Bouillie Bordelaise și Paurin, eficacitatea biologică a fost mai înaltă cu 3,4% față de cea obținută în schema martor. Diferența eficacității în cele două scheme de protecție a mărului poate fi explicată atât prin conținutul de cupru aplicat pe cultură, cât și prin inhibarea dezvoltării fitopatogenului în rezultatul tratamentelor din perioada înfloririi.

Profitul obținut în rezultatul comercializării fructelor de pe sectorul experimental a fost calculat în baza datelor acumulate în perioada anilor 2011-2013, inclusiv 2012, când pomii au fost puternic afectați de focul bacterian al rozaceelor. Calculele au fost efectuate în baza recoltei obținute la soiul Renet Simirencu, care a fost mai susceptibil la bacterioză. Reieșind din analiza rezultatelor productivității soiului Renet Simirencu, am stabilit că, în anul 2012, când pomii au fost afectați puternic de către focul bacterian al rozaceelor, recolta obținută la hectar a constituit 16,98 tone, fiind mai mică cu 1,85 tone în cazul anului 2011 și cu 1,24 tone față de anul 2013. Reieșind din calitatea fructelor, prețul de livrare a producției a fost diferit, ceea ce a influențat asupra profitului, care conform calculelor a fost mai înalt în anul 2013, constituind 3651,1 lei pentru o tonă de fructe. Eficiența economică a tratamentelor la măr (soiul Renet Simirencu) cu produsele cercetate sunt prezentate în tabelul 4.7.

Tabelul 4.7. Eficiența economică a tratamentelor aplicate la măr

Indicatorii	Varianta martor	Varianta experimentală
Productivitatea medie, t/ha	16,45	18,22
Prețul de realizare, lei/t	4107,8	4107,8
Venituri din vânzări, lei/ha	67573,31	74844,12
Costul de producție la ha, lei	8416,0	8416,0
Cheltuieli suplimentare pentru protecția culturii, lei/ha	14980,35	15050,0
Cheltuieli totale, lei/ha	23396,0	23466,0
Profitul pe unitatea de suprafață, lei/ha	44177,31	51378,12
Rata rentabilității, %	188,82	219,95

Datele din tabelul 4.7 denotă că tratamentele au fost eficiente din punct de vedere economic, fapt manifestat prin obținerea unui spor de recoltă de 1,77 t/ha și un nivel al rentabilității cu 31,13% mai înalt față de martor. Rezultatele obținute ne demonstrează necesitatea includerii produsului Bouillie Bordelaise, cu norma de consum 10 kg/ha și a produsului Paurin (*Pseudomonas fluorescens* PsB-04) în sistemul de protecție a culturii mărului, pentru combaterea fitopatogenului *E. amylovora*.

CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI PRACTICE

CONCLUZII GENERALE

1. În Republica Moldova predomină condiții meteorologice favorabile pentru multiplicarea rapidă a fitopatogenului *Erwinia amylovora*, iar, în livezile unde se aplică irigarea și este prezent inoculul primar, boala se manifestă anual cu diferită intensitate de atac [38, 39, 44].
2. *Erwinia amylovora* se dezvoltă pe speciile de măr, păr și gutui, manifestându-se prin simptome caracteristice, în toată perioada de vegetație, începând cu fenofaza înfloririi culturii gazdă [41, 42].
3. La măr cel mai sensibil soi a fost Mantuaner, la care intensitatea atacului a atins 17,3%, la o frecvență a bolii de 56,7%; la păr cel mai sensibil, în anii cercetați, a fost soiul Sokrovișce, la care intensitatea bacteriozei a fost 22,7%, la frecvența de 76,7% după înflorire; la gutui mai sensibil a fost soiul Iujanca, la care intensitatea bolii a fost de 22,0%, la frecvența atacului de 73,3% [40].
4. Utilizarea mediilor cunoscute de cultură (CGA și CPA) și celor diagnostice (CCT, Levan, King B și MM1Cu) a permis izolarea coloniilor bacteriene cu caractere morfologice caracteristice fitopatogenului *E. amylovora*, iar cercetarea particularităților morfologice ale celulelor a permis identificarea particularităților bacteriene asporifere, cu flageli peritrichi și dimensiuni de 1,14-1,62 x 0,56-0,62 μ. Particularitățile fiziologico-biochimice ale izolatelor studiate au fost asemănătoare cu cele manifestate de către tulpina de referință și cu rezultatele din literatura de specialitate [47, 48, 49].
5. Utilizarea metodelor contemporane de identificare a izolatului P5 (testul API 20E, CG, PCR, DAS-ELISA și IF) a confirmat rezultatele obținute în urma efectuării analizelor clasice, conform Standardelor OEPP [45, 51].
6. Inocularea încrucișată a plantelor gazdă cu suspensii bacteriene de *E. amylovora* a permis obținerea simptomelor specifice focului bacterian al rozaceelor, iar izolarea tulpinilor bacteriene din organele infectate ale plantei gazdă și studierea particularităților lor morfologice au permis confirmarea postulatelor lui Koch – condiții absolut necesare pentru determinarea caracterului infecțios și posibilitatea identificării agentului patogen [45, 52].
7. Rezultatele pozitive obținute după îndeplinirea testelor de identificare a izolatelor din probe de măr, păr și gutui ne indică despre prezența agentului fitopatogen al focului bacterian al rozaceelor în toate zonele Republicii Moldova [45].
8. Obținerea simptomelor de foc bacterian pe fructele inoculate direct pe pom ne demonstrează virulența înaltă a tulpinilor locale de *Erwinia amylovora* [52].

9. Eficacitatea biologică, obținută după efectuarea tratamentelor cu produse cuprice contra *E. amylovora*, a fost diferită, în dependență de produs și cultură, variind de la 76,7% până la 96,9%. Cea mai înaltă eficacitate biologică a fost obținută în urma aplicării soluției de 3% zeamă bordeleză la gutui și păr. La măr cea mai înaltă eficiență, de 88,4%, a fost obținută în varianta tratată cu fungicidul Bouillie Bordelaise, în doză de 10,0 kg/ha [55, 56, 57, 58].

10. Eficiența economică obținută la măr, caracterizată printr-o rentabilitate de 219,95%, fiind cu 31,13% mai mare față de martor, ne indică despre necesitatea aplicării tratamentelor profilactice la culturile pomicele contra bacteriei *E. amylovora*.

RECOMANDĂRI PRACTICE

1. Ameliorarea soiurilor cu rezistență și toleranță sporită, respectarea strictă a măsurilor agrotehnice, îndeosebi tăierile fitosanitare cu înlăturarea și lichidarea formațiunilor atacate, excluderea gazdelor intermediare din flora spontană, combaterea dăunătorilor, efectuarea strictă și la timp a măsurilor biologice și chimice de combatere:

a) **la măr**: tratamente profilactice preflorale cu produsul Bouillie Bordelaise (770 g/kg sulfat de cupru neutralizat cu hidroxid de Ca, „Cerexagri B.V.”, Franța), cu norma de consum 10 kg/ha; aplicarea produselor biologice pe baza tulpinilor de *Pseudomonas fluorescens* CNMN-PsB-04 și *Pseudomonas aureofaciens* CNMN-PsB-05 la deschiderea a 15% din flori și la scuturarea a 75% din petale; tratamente profilactice după înflorire și în timpul creșterii intensive a lăstarilor cu produsul Bouillie Bordelaise, cu norma de consum 10 kg/ha;

b) **la păr**: tratamente profilactice preflorale cu zeamă bordeleză de 2%; aplicarea produselor biologice pe baza tulpinii de *Pseudomonas aureofaciens* CNMN-PsB-05 la deschiderea a 15% din flori; tratamente profilactice imediat după înflorire, în perioada postflorală și creșterii intensive a lăstarilor cu zeamă bordeleză de 1% sau cu produsul Bouillie Bordelaise, cu norma de consum 10 kg/ha;

c) **la gutui**: tratamente profilactice preflorale cu zeamă bordeleză de 2%; aplicarea produselor biologice pe baza tulpinii de *Pseudomonas fluorescens* CNMN-PsB-04 la deschiderea a 15% din flori; tratamente profilactice în perioada postflorală și creșterii intensive a lăstarilor cu zeamă bordeleză de 1% sau produsul Bouillie Bordelaise, cu norma de consum 10 kg/ha;

2. Pentru obținerea unei eficacități biologice scontate a tratamentelor, este necesar de stabilit sensibilitatea izolatelor bacteriene, obținute din livezile cercetate, față de bactericidele care sunt recomandate pentru combaterea focului bacterian.

3. Instrumentele utilizate la tăierea organelor afectate trebuie dezinfectate în soluție de clor 10%, cu menținere timp de 3 min. După dezinfectare, spălare cu apă și uscare prin ștergere, instrumentele vor fi unse cu ulei anticoroziv.

BIBLIOGRAFIE

1. Babuc V. s. a. Producerea merelor. Chisinau: Bons Offices, 2013. 240 p.
2. Gusberty M. et al. Fire Blight Control: The Struggle Goes On. A Comparison of Different Fire Blight Control Methods in Switzerland with Respect to Biosafety, Efficacy and Durability. In: Environmental Research and Public Health, 2015, vol. 12 (9), p. 11422-11447.

3. Van der Zwet T., Orolaza-Halbrendt N., Zeller W. Losses due to fire blight and economic importance of the disease. In: Fire blight. History, biology and management, 2012, p. 37-41.
4. Ordax M. et al. Improved recovery of *Erwinia amylovora*-stressed cells from pome fruit on RESC, a simple, rapid and differential medium. In: Trees, 2012, vol. 26, p. 83-93.
5. Кудина И. В. и др. Характеристика фитопатогенных бактерий *Erwinia amylovora*, выделенных на территории Беларуси. В: Труды Белорусского государственного университета, 2008, том 3, часть 1, с. 3-8.
6. Scientific Opinion on the pest categorisation of *Erwinia amylovora* (Burr.) Winsl. et al. In: EFSA, 2014, vol.12 (12), p. 3922.
7. Yaich M. et al. Fire blight (*Erwinia amylovora* [Burrill] Winslow) in Morocco: importance, geographical distribution and characterization. In: Phytopathologia Mediterranea, 2011, vol. 50, p. 212-227.
8. Дренова Н.В. К 10-летию бактериологической коллекции ФГБУ «ВНИИКР. В: Карантин растений. Наука и практика, Март 2014, № 17, с. 20-31.
9. Bădăraș S. Fitopatologie: (generală și agricolă). Chișinău: Print-Caro, 2012. 592 p.
10. Ngugi H. K., Lehman B. L., Madden L. V. Multiple treatment meta-analysis of products evaluated for control of fire blight in the eastern United States. In: Phytopathology, 2011, vol. 101, p. 512-522.
11. Николаев А. Н., Волощук Л. Ф. Американский бактериальный ожог плодовых культур (общая характеристика и меры борьбы). În: Culegere de articole. Protecția integrată a plantelor, Chișinău, 1997, 184-193 с.
12. Бобэтрын И. Н. и др. Интегрированная система защиты яблони от вредителей и болезней, Кишинэу, 1997. с. 16.
13. Магер М. К., Бобэтрын И. Н., Пынзару Б. В. Бактериальный ожог плодовых в Молдове. În: Protecția plantelor de dăunători, boli și buruieni în Republica Moldova. Tezele rapoartelor Conferinței științifico-practice, Chișinău, 12-13 noiembrie 1998, p. 59.
14. Temple T. N., Johnson K. B. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of *Erwinia amylovora* on pear and apple fruit flowers. In: Plant Disease, 2011, nr. 95, p. 423-430.
15. Основные методы фитопатологических исследований. Москва: Колос, 1974. с. 115-116.
16. Rao U. Pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* on Tomato Seedlings: Phenotypic and Gene Expression Analyses of the Virulence Function of Coronatine. In: Molecular Plant-Microbe Interactions Journal, 2008, vol. 21, no. 4, p. 383-395.
17. Kazempour N., Kamran M. E., Ali B. *Erwinia amylovora* causing fire blight of pear in the Guilan province of Iran. In: Journal of Plant Pathology, 2006, vol. 88, no. 1, 113-116.
18. Яковлева Л. М. и др. *Erwinia amylovora* – возбудитель бактериального ожога древесных в Украин. В: Microbiologichny Zhurnal, липень-серпень 2014, Том 76, № 4, p. 26-33.
19. Краткий определитель бактерий Берги. Москва: Издательство „Мир”, 1980, с. 195.
20. Gagnard J. L., Luisetti J. *Pseudomonas syringae*, bacterie epiphyte, glaucogene et pathogene. In: Agronomie, EDP Sciences, 1993, vol. 13, no. 5, p.333-370.
21. Îndrumări metodice pentru testarea produselor chimice și biologice de protecție a

- plantelor de dăunători, boli și buruieni în Republica Moldova. Chișinău: Tipografia Centrală, 2002. 286 p.
22. Serviciul Hidrometeorologic de Stat <http://www.meteo.md/> (vizitat 15.02.16)
 23. Combaterea bacteriozelor la culturile semînțoase (recomandări). Chișinău: Tipografia Centrală, 2000. 28 p.
 24. Registrul de Stat al produselor de uz fitosanitar și al fertilizanților. Chișinău: Tipografia Centrală, 2003. 380 p.
 25. Registrul de Stat al produselor de uz fitosanitar și al fertilizanților/Supliment general (2003-2005), Chișinău, 2005.
 26. Severin V., Corneia C. P. Ghid pentru diagnoza bolilor plantelor. București: Ceres, 2009. 278 p.
 27. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта. Москва: Агропромиздат, 1985. 351 с.
 28. Баздырев Г. И., Третьяков Н. Н., Белошапкина О. О. Интегрированная защита растений от вредных организмов. Москва: ИНФРА-М, 2014. 302 с.
 29. PM 7/20 (2) *Erwinia amylovora*. In: Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 2013, vol. 43, no. 1, p. 21-45.
 30. Кирай З. и др. Методы фитопатологии. Москва: Колос, 1974. (с. 97).
 31. King E. O. Ward M. K., Raney D. E. Two simple media for the demonstration of pruscyanin and fluorescein. In: Clinics in Laboratory Medicine, 1954, vol. 44, p. 301-304.
 32. Cross J. E., Goodman R. N. A selective medium for acid a definitive colonies characteristic of *Erwinia amylovora*. In: Phytopathology, 1973, no. 63, p.1425-1426.
 33. Ishimaru S., Klos E. J. New medium for detection of *Erwinia amylovora* and its use in epidemiological studies. In: Phytopathologym, 1984, 74, p. 1342-1345.
 34. Bereswill S. et al. Molecular characterization of natural *Erwinia amylovora* strains difficult in levan syntesis. In: Physiology Molecular Plant Pathology, 1997, vol. 51, p. 215-225.
 35. Bereswill S. et al. Identification of *Erwinia amylovora* by growth morphology on agar containing copper sulfate and by capsule staining with lectin. In: Plant Disease, 1998. vol. 82. p. 158-164.
 36. Желдакова Р. А., Мямин В. Е. Фитопатогенные микроорганизмы: Учеб.- метод. комплекс для студентов биол. фак. спец. G-310101 «Биология». Минск: БГУ, 2006. 116 с.
 37. Vanneste J. L. et al. Plugs of immature pear fruit to assess the virulence of *Erwinia amylovora* and to study in the laboratory the interaction between biological control agents and the fire blight pathogen. In: Acta Horticulturae, 1996, nr. 411, p. 303-305.
 38. Magher M., **Kostru M.** Fire blight of fruit cultures in the Republic of Moldova. В: Фитопатогенные бактерии, фитонцидология, аллелопатия. Сборник статей участников Международной научной конференции, г. Киев, 4-6 октября 2005 г., с. 68-70.
 39. **Magher M.G.** Некоторые исторические и экономические аспекты бактериального ожога в Республике Молдова. В: Защита растений - проблемы и перспективы. Информационный бюллетень ВПРС МОББ (41): материалы докладов Международного симпозиума, Кишинев, 30-31 октября 2012 года, с. 223-227.
 40. **Magher M. G.** Influența focului bacterian asupra stării fitosanitare a culturilor romicole. В: Информационный бюллетень ВПРС МОББ (40). Материалы докладов Международного симпозиума «Защита растений – достижения и перспективы», Кишинев, 19-22 октября 2009, с. 311-312.

41. **Magher M. G.** Simptome caracteristice pentru *Erwinia amylovora* și unele aspecte morfologice ale izolatelor bacteriei. În: Știința agricolă, 2010, nr. 2, p. 21-24. ISSN 1857-0003.
42. **Magher M. G.** Maladiile gutuiului (*Cydonia oblonga* MILL) în condițiile Republicii Moldova. В: Защита растений - результаты и перспективы. Информационный бюллетень ВПРС МОББ (47): материалы докладов Международного симпозиума. Кишинев, 27-28 октября 2015 года, с. 72-75.
43. Магер М. и др. Эффективность фунгицида Aliette 80 WG в борьбе с бактериозами яблони и идентификация изолятов, выделенных из пораженных тканей растений. В: Современное состояние и перспективы инновационного развития сельского хозяйства. Мат. Межд. научно-практической конференции, г.Тирасполь, 16-17 нояб. 2015, с. 322-327.
44. **Magher Maria, Magher, M.** Arsura si focul bacterian la culturile pomicole sămânțoase – simptome, diagnoză și combatere. În: Lucrări științifice, UASM, Vol. 42 (1): Horticultură, viticultură și vinificație, Silvicultură și grădini publice, Protecția plantelor, Chișinău, 2015, p. 319-325.
45. **Magher Maria.** Depistarea și identificarea focului bacterian al rozaceelor la culturile pomicole. În: Studia Universitatis Moldaviae, Seria “Științe reale și ale naturii”, 2016, nr.6 (96), p. 44-51.
46. Волощук, Л. Ф., Костру М. Г. Бактериальный ожог - угроза плодоводству В: Защита растений: сборник научных трудов «Стратегия и тактика защиты растений», Республиканское научное унитарное предприятие "Институт защиты растений" Национальной академии наук Беларуси, Вып. 30, ч. 1, Минск, 2006, с. 191-194.
47. **Magher Maria, Voloșciuc L., Terteac D.** Etape noi în studiul culturilor bacteriene obținute din plante de măr, păr și gutui. În: Lucrări științifice, UASM, Vol. 36 (Partea a 2-a): Horticultură, viticultură și vinificație, silvicultură și grădini publice, protecția plantelor, Chișinău, 2013, p. 250-252.
48. **Magher Maria.** Unele caractere fenotipice ale izolatelor bacteriene obținute din plante de măr, păr și gutui. În: Lucrări științifice, UASM, Vol. 36 (partea a 2-a): Horticultură, viticultură și vinificație, silvicultură și grădini publice, protecția plantelor, Chișinău, 2013, p. 239 – 242.
49. **Магер М. Г.** Применение диагностических питательных сред для идентификации фитопатогена *E. amylovora*. В: Плодоводство и Ягодководство России, Москва. Сборник научных работ, Москва: ГНУ ВСТИСП Россельхозакадемии, 2013, Том XXXVI, Часть 2, с. 9-15.
50. Краткий определитель бактерий Берги. Москва: Издательство „Мир”, 1980, с. 195.
51. **Magher Maria.** Identificarea izolatului bacterian P5 obținut din plante de măr. În: Știința agricolă, 2016, Nr.1, p. 51-59.
52. **Magher M. G.** Rolul bacteriilor fitopatogene în biocenozele culturilor pomicole semănțoase. În: Lucrări științifice, UASM. Vol. 24 (1): Horticultură, viticultură și vinificație, silvicultură și grădini publice, protecția plantelor, Chișinău, 2010, p. 320-324.
53. **Magher M.** Agenți biologici cu caracter antagonist față de fitopatogenul *Erwinia amylovora* Burrill. В: Информационный бюллетень ВПРС МОББ (41), Мат. докл. Международного симпозиума «Защита растений – проблемы и перспективы», Кишинев, 30-31 октября 2012 года, с. 220-222.

54. **Magher Maria**, Volosciuc L., Lemanova Natalia. Influenta compozitiei mediului de cultura asupra caracterului antagonist al unor tulpini de *Pseudomonas* sp. *in vitro*. În: „Biotehnologii avansate – realizari si perspective”, Mat. la al III-lea Simpozion national cu participare internatională, Chisinau, Republica Moldova, 24-25 octombrie 2013, p. 53.
55. **Магер М. Г.**, Волощук Л.Ф., Леманова Н.Б., Магер М.К. Применение химических и биологических препаратов в борьбе с бактериальным ожогом семечковых плодовых культур. В: Микробиологическая биотехнология - наукоёмкое направление современных знаний. Материалы Международной научной конференция, Кишинев, 6-8 июля 2011 года, с. 180.
56. **Magher M.G.**, Luchița V.I., Magher M. K. Eficiența suspensiei de *Pseudomonas aureofaciens* asupra focului bacterian la cultura pâr. В: Информационный бюллетень ВПРС МОББ (47). Мат. докладов Международного симпозиума «Защита растений – результаты и перспективы, Кишинев, 27-28 октября 2015 года, p. 284-252.
57. **Магер Мария**, Волощук Леонид, Магер Михаил. Использование бактерий-антагонистов против бактериозов семечковых плодовых культур. В: Біотехнологічні системи виробництва і застосування засобів біологізації землеробства. Інформаційний Бюлетень СПРС МОББ (49): матеріали доповідей Міжнародно науково–практичної конференції, Одесса, 3-7 октября 2016 г., с. 160-162.
58. **Magher M.**, Lemanova, N., Voloșciuc, L. *Pseudomonos* sp. CNMN-PS-05: un nou antagonist al fitopatogenului *Erwinia amylovora*. În: Agricultura durabilă în Republica Moldova - Provocări actuale și perspective, Balți: Indigo Color, 2017, p.117-121.

ADNOTARE

Magher Maria, „Elaborarea sistemului de combatere integrată a focului bacterian al rozaceelor (*Erwinia amylovora*)”. Teza de doctor în științe agricole, specialitatea 411.09 - *Protecția plantelor*. Chișinău, 2018. Teza constă din introducere, patru capitole, concluzii generale și recomandări practice, bibliografie din 213 titluri, volumul total de 146 pagini, 34 tabele, 62 figuri și 12 anexe. Rezultatele obținute sunt publicate în 18 lucrări științifice.

Cuvinte-cheie: *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al., măr, păr, gutui, intensitatea atacului, susceptibilitatea soiurilor, identificare, combatere, eficacitate biologică, eficiență economică.

Domeniul de studiu: Științe agricole

Scopul lucrării constă în studierea răspândirii agentului etiologic al focului bacterian al rozaceelor, rezistenței principalelor soiuri de măr, păr și gutui la atac, precum și selectarea produselor optime și ecologice de control, în vederea maximizării eficacității biologice și a eficienței economice a tratamentelor aplicate împotriva acestei boli.

Obiectivele lucrării constau în determinarea arealului de răspândire și a intensității atacului focului bacterian al rozaceelor la culturile pomicele sămânțoase în condițiile Republicii Moldova; stabilirea susceptibilității principalelor soiuri cultivate de măr, păr și gutui la atacul focului bacterian al rozaceelor; izolarea, identificarea și determinarea particularităților biologice ale agentului patogen al focului bacterian al rozaceelor *Erwinia amylovora*; determinarea acțiunii unor agenți biologici asupra bacteriei *Erwinia amylovora*; evaluarea eficacității biologice a unor produse chimice asupra bacteriei *Erwinia amylovora*; determinarea eficienței economice a tratamentelor aplicate contra focului bacterian al rozaceelor.

Noutatea și originalitatea științifică. Pentru prima dată în Republica Moldova a fost determinat gradul de atac, arealul de răspândire și intensitatea atacului focului bacterian al rozaceelor la culturile pomicele sămânțoase; stabilite cele mai susceptibile, cât și cele mai rezistente soiuri de măr, păr și gutui la infecțiile naturale cu foc bacterian; identificat fitopatogenul *Erwinia amylovora* prin aplicarea metodelor clasice și contemporane conform Standardului EPPO PM 7/20 (2) (descrierea simptomelor, particularitățile manifestării caracterelor pe diferite medii de cultură, proprietățile structurale, teste de patogenitate pe diferite organe ale plantelor, testul API 20E, Gaz-Cromatografie, DAS-ELISA, IF și PCR); determinate particularitățile fiziologo-biochimice ale izolatelor bacteriene obținute din probele de plante cu simptome și virulența acestora, în baza inoculărilor artificiale; determinată eficacitatea biologică a diferitor formulări cuprice și agenți biologici față de focul bacterian al rozaceelor; evaluată eficiența economică a produselor biologice și chimice aplicate contra focului bacterian al rozaceelor. Pentru prima dată au fost selectate două tulpini bacteriene noi *Pseudomonas fluorescens* CNMN-PsB-04 și *Pseudomonas aureofaciens* CNMN-PsB-05 cu caracter antagonist față de *Erwinia amylovora*.

Problema științifică importantă soluționată constă în *fundamentarea științifică* a capacității biopreparatului Paurin (*Pseudomonas fluorescens* CNMN-PsB-04 cu titrul de 10^9 ufc/ml) și a produsului Bouillie Bordelaise (770 g/kg sulfat de cupru neutralizat cu hidroxid de calciu) de a inhiba dezvoltarea fitopatogenului *Erwinia amylovora*, ceea ce permite includerea lor în sistemul de protecție integrată a culturilor de măr, păr și gutui, fiind confirmată eficiența economică a tratamentelor.

Semnificația teoretică a lucrării rezidă în determinarea particularităților biologice ale fitopatogenului *Erwinia amylovora* în condițiile Republicii Moldova și stabilirea normelor eficiente de consum și perioadei optime de aplicare a produselor bacteriene și chimice la cultura de măr, păr și gutui pentru combaterea fitopatogenului.

Valoarea aplicativă a lucrării. Cel puțin trei metode din cele cercetate (creșterea pe medii de cultură, teste de patogenitate, testul API 20E, Gaz-Cromatografie, DAS-ELISA, IF și PCR), bazate pe principii biologice diferite, trebuie utilizate pentru identificarea fitopatogenului *Erwinia amylovora*. Tulpinile antagoniste de *Pseudomonas* sp. (*P. fluorescens* CNMN-PsB-04 cu titrul 10^9 ufc/ml și *P. aureofaciens* CNMN-PsB-05 cu titrul 10^7 ufc/ml) în doză de 5,0 l/ha și produsele chimice Bouillie Bordelaise (770 g/kg sulfat de cupru neutralizat cu hidroxid de Ca) cu norma de consum 10 kg/ha și zeamă bordeleză în concentrație de 1% - 2% pot fi incluse în sistemul de protecție integrată a culturilor pomicele, pentru combaterea focului bacterian al rozaceelor. Tulpina bacteriană P5, identificată ca *Erwinia amylovora*, este inclusă în colecția de microorganisme patogene a laboratorului de Fitopatologie și Biotehnologie al Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor, fiind utilizată în diverse cercetări.

Implementarea rezultatelor științifice a fost efectuată în gospodăria „Exardiv Com” SRL.

АННОТАЦИЯ

Магер Мария, „Разработка системы интегрированной борьбы с бактериальным ожогом (*Erwinia amylovora*)”. Диссертация на соискание ученой степени доктора сельскохозяйственных наук, специальность 411.09 Защита растений, Кишинев, 2018 год. Диссертация состоит из введения, 4 глав, выводов и практических рекомендаций, библиографии, включающей 213 источников, 146 страниц текста, 34 таблиц, 62 рисунков и 12 приложений. Полученные результаты опубликованы в 18 научных работах.

Ключевые слова: *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al., яблоня, груша, айва, интенсивность болезни, восприимчивость сортов, идентификация, контроль, биологическая эффективность, экономическая эффективность.

Область исследования: Сельскохозяйственные науки

Цель работы: выявление распространенности этиологического агента бактериального ожога, устойчивости основных сортов яблони, груши и айвы, а также выбора оптимальных доз и экологических средств для повышения биологической и экономической эффективности обработок против этого заболевания.

Задачи: определить распространение и интенсивность развития бактериального ожога на семечковых плодовых культурах в условиях Республики Молдова; определить восприимчивость основных сортов яблони, груши и айвы к бактериозу; выделить, идентифицировать и определить биологические особенности бактерии *Erwinia amylovora*; оценить влияние некоторых биологических агентов на бактерию *Erwinia amylovora*; определить биологическую эффективность некоторых химических препаратов на фитопатоген *Erwinia amylovora*; определить экономическую эффективность обработок против бактериального ожога.

Научная новизна: впервые в Республике Молдова была определена вредоносность, распространенность и интенсивность развития бактериального ожога на плодовых семечковых культурах; определены наиболее восприимчивые и резистентные сорта яблони, груши и айвы на естественном инфекционном фоне; идентифицирована бактерия *Erwinia amylovora* в результате применения классических и современных методов, в соответствии со стандартом EPPO PM 7/20 (2) (описание симптомов, особенностей проявления характера роста изолятов на различных культуральных средах, морфологических свойств бактерий, тестов на патогенность, тест API 20E, газовой хроматографии, DAS-ELISA, IF и ПЦР); определены физиологические и биохимические особенности местных изолятов бактерий, выделенных из образцов зараженных растений и выявлена их вирулентность на основе искусственного заражения; определена биологическая эффективность различных композиций меди и биологических агентов по отношению к бактериальному ожогу; определена экономическая эффективность биологических и химических средств защиты растений в борьбе с бактериальным ожогом. Впервые отобраны новые бактериальные штаммы-антагонисты *Pseudomonas fluorescens* CNMN-PsB-04 и *Pseudomonas aureofaciens* CNMN-PsB-05 к *Erwinia amylovora*.

Решенная научная проблема состоит в научном обосновании способности биопрепарата Паурин (*Pseudomonas fluorescens* CNMN-PsB-04) и препарата Bouillie Bordelaise (770 г/кг сульфат меди, нейтрализованный гидроксидом кальция) ингибировать фитопатоген *Erwinia amylovora*, что позволяет их включить в интегрированную систему защиты яблони, груши и айвы, подтверждая экономическую эффективность обработок.

Теоретическая значимость работы заключается в определении биологических особенностей фитопатогена *Erwinia amylovora* в условиях Республики Молдова и эффективных биологических и химических средств, подавляющих развитие и распространение бактериальной инфекции, а также оптимальных норм расхода препаратов и сроков их применения в борьбе с бактериозом на яблоне, груше и айве.

Практическая ценность работы. Установлено, что в процессе идентификации фитопатогена *Erwinia amylovora* (по рекомендации EPPO/EOPP) должны быть применены не менее трех методов исследования на основе различных биологических принципов (рост на культуральных средах, тест на патогенность, тест API 20E, газовая хроматография, DAS-ELISA, IF и ПЦР). Штаммы-антагонисты *Pseudomonas* sp. (*P. fluorescens* CNMN-PsB-04 титр 10^9 КОЕ/мл и *P. aureofaciens* CNMN-PsB-05 титр 10^7 КОЕ/мл) в дозе 5,0 л/га, а также химические препараты – Bouillie Bordelaise (770 г/кг сульфата меди) с нормой расхода 10 кг/га, бордоская жидкость в концентрации 1-2%, могут быть включены в интегрированную систему защиты плодовых культур в борьбе с бактериальным ожогом. Идентифицированный нами бактериальный штамм *Erwinia amylovora* P5 включен в коллекцию фитопатогенных микроорганизмов лаборатории Фитопатологии и биотехнологии Института генетики, физиологии и защиты растений и используется в различных исследованиях.

Внедрение результатов. Результаты научных исследований внедрены в производство экономического агента «Exardiv Com» SRL.

ANNOTATION

Magher Maria, „Elaboration of the integrated system for the fire blight (*Erwinia amylovora*) combatting on rosaceae plants”. The thesis for doctor degree in agricultural sciences, specialty 411.09 - Plant protection, Chisinau, 2018. The thesis consist of an introduction, 4 chapters, general conclusions and practical recomandations, 213 references, 146 pages of text, 34 tables, 62 figures and 12 annexes. The investigation results are published in 18 scientific papers.

Key words: *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al., apple tree, pear tree, quince tree, intensity attack, variety susceptibility, identification, combatting, biological efficacy, economical efficiency.

Investigation domain: Agricultural sciences

The aim of the work takes into account some contributions concerning etiological agent spreading of the fire blight, main varieties of the apple, pear and quince trees resistance to the attack, and optimal ecological combatting products selection for outmost biological and economical efficiency of the applied treatments against this disease.

The work objectives reside in: determination of the spreading area and intensity of the fire blight attack on rosaceae plants of the seed fruit growing cultures in the Republic of Moldova; main varieties of the apple, pear and quince trees susceptibility determination to the fire blight attack on the rosaceae; isolation, identification and biological specific features study of the phatogen agent of the rosacea fire blight *Erwinia amylovora*; biological effciciency determination of some biological agents on bacterium *Erwinia amylovora*; biological efficiency evaluation of some chemical products on bacterium *Erwinia amylovora*; economical efficacy determination of the applied treatments against rosacea fire blight.

Scientific novelty and originality. For the first time in the Republic of Moldova was determined the spreading areal and intensity attack of the fire blight of the rosacea seed fruit growing cultures; were selected the most susceptible varieties of the apple, pear and quince trees to natural infections with fire blight; the fire blight phytopathogen was identified by classic and modern methods application in conformity with EPPO PM 7/20 (2) Standard (symptom description, specific features of character manifestation on different culture media, structural properties, pathogenity tests on different plant organs, API 20E test, Gas Chromatography, DAS-ELISA, IF and PCR); were determined physiological and biochemical peculiarities of the bacterial isolates obtained from the samples of plants with symptoms; were determined biological effeciency of different copper formulations against *Erwinia amylovora*; was evaluated economical efficacy of the treatments applied against rosacea fire blight. Two strains of new bacteria (*Pseudomonas fluorescens* CNMN-PsB-04 and *Pseudomonas aureofaciens* CNMN-PsB-05) with antagonistic character to *Erwinia amylovora* for the first time were selected.

The scientific problem solved. Scientific substantiation of the antagonist strains capacities *Pseudomonas fluorescens* CNMN-PsB-04 and Bouillie Bordelaise (770 g/kg copper sulphate neutralized with calcium hydroxide) to inhibit phytopathogen *E. amylovora*, which allows their inclusion in the system for integrated protection of apple, pear and quince cultures, confirming the economic efficiency of the treatments.

Theoretical significance. Determination of the biological peculiarities of the phytopathogen *E. amylovora* in the Republic of Moldova, the efficient consumption norms and the optimal period for application of bacterial and chemical products on apple, pear and quince cultures for phytopathogen combating, as well.

Applicative value of the work. At least three methods among those investigated (growing on culture media, pathogenity tests, API 20E test, Gas-Chromatography, DAS-ELISA, IF and PCR) based on different biological principles, should be used to identify of the phytopathogen *Erwinia amylovora*. The antagonist strains of *Pseudomonas* sp. (*P. fluorescens* CNMN-PsB-04 of a bacterial suspension 10^9 cfu/ml and *P. aureofaciens* CNMN-PsB-05 of a bacterial suspension 10^7 cfu/ml) with a consumption norm of 5,0 l/ha and the chemical products Bouillie Bordelaise chemicals (770 g/kg of copper sulfate neutralized with Ca hydroxide) with a consumption norm of 10 kg/ha, bouillie bordelaise with a concentration of 1-2% can be included in the system for integrated protection of fruit growing cultures for rosaceae fire blight control. The bacterial strain P5, identified as *Erwinia amylovora*, is included in the collection of the pathogen microorganism of Phytopathology and Biotechnology Laboratory of the Institute of Genetics, Physiology and Plant Protection, being applied in diverse future investigations.

Implementation of the scientific results was effectuated in the farm „Exardiv Com” SRL.

MAGHER MARIA

**ELABORAREA SISTEMULUI DE COMBATERE INTEGRATĂ A
FOCULUI BACTERIAN AL ROZACEELOR
(*ERWINIA AMYLOVORA*)**

411.09 – PROTECȚIA PLANTELOR

Autoreferatul tezei de doctor în științe agricole

Aprobat spre tipar: 09.10.2018
Hârtie ofset. Tipar digital.
Coli de tipar.: 2,0

Formatul hârtiei 60×84 1/16
Tiraj 50 ex.
Comanda nr. 198

SRL "PRINT-CARO"
mun. Chișinău, sec. Rîșcani, str. Astronom Nicolae Donici, 14