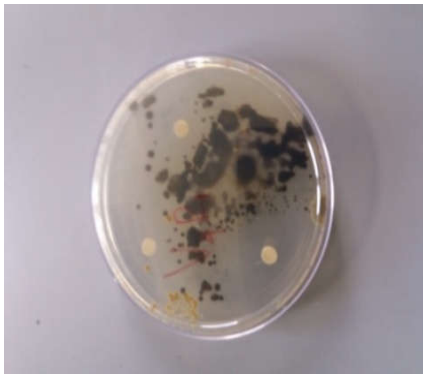


Marin Lixandru, Sergiu Fendrihan

**MĂSURI DE PREVENIRE ȘI
COMBATERE
A CANCERULUI BACTERIAN
(*Agrobacterium tumefaciens*)
DIN PLANTAȚIILE DE VIȚĂ DE VIE**



**Editura Bioflux
Cluj Napoca
2019**

Marin Lixandru, Sergiu Fendrihan

**MĂSURI DE PREVENIRE ȘI
COMBATERE
A CANCERULUI BACTERIAN
(*Agrobacterium tumefaciens*)
DIN PLANTAȚIILE DE VIȚĂ DE VIE**

Editura Bioflux

Cluj Napoca

2019

Marin Lixandru, Sergiu Fendrihan

Măsuri de prevenire și combatere a cancerului bacterian

(*Agrobacterium tumefaciens*) din plantațiile de viță de vie

eISBN 978-606-8887-63-0

CUPRINS

Introducere.....	6
Despre autori.....	7
Capitolul I. Generalități.....	9
Capitolul II. Cancerul bacterian la vița de vie.....	17
Capitolul III.Determinări privind cancerul bacterian în plantația tânără de viță de vie și laborator.....	21
Capitolul IV. Rezultate proprii.....	29
Capitolul V. Măsuri de prevenirea și combaterea cancerului bacterian.....	39
Referințe bibliografice.....	42

INTRODUCERE

Această broșură este destinată fermierilor care cultivă viță de vie, studenților horticultori cât și celor interesați de aspectele de fitopatologie ale culturii viței de vie.

Se bazează pe date din literatura științifică de specialitate precum și pe experiența din teren și laborator a autorilor.

Broșura explică date generale de biologie, patologie, prevenire și combatere a cancerului bacterian la vița de vie, o bacterie fitopatogenă periculoasă.

De asemenea sunt prezentate experimente și rezultate obținute de autori în cadrul unor lucrări de cercetare științifică.

În țara noastră, cancerul bacterian al viței de vie deși este o boală de carantină, ea a reapărut în podgoriile noastre tinere și pe calea unor importuri necontrolate de material săditor viticol din țări ca Italia, Franța, Spania etc.

Importul se datorează faptului că în țară nu mai există pepiniere care să asigure necesarul de material săditor viticol pentru programul de reconversie din viticultură.

Datorită importului de material săditor viticol afectat de cancer bacterian, în plantațiile înființate cu astfel de material săditor au apărut un mare număr de goluri, care în condițiile în care rămân necompletate, au efect negativ puternic asupra producției de struguri respectiv a eficienței economice a culturii.

DESPRE AUTORI

Marin Lixandru este CS III la Institutul de Cercetare Dezvoltare pentru Protecția Plantelor Bucuresti, fost director al Stațiunii de Cercetare viti-vinicolă Greaca din Județul Giurgiu, un specialist recunoscut în horticultură.

Sergiu Fendrihan este CS II cu două doctorate, unul în Protecția plantelor și altul în medicină, și lucrează în cadrul aceluiași Institut de Cercetare Dezvoltare pentru Protecția Plantelor precum și la Universitatea de Vest "Vasile Goldiș" din Arad, în calitate de conferențiar asociat.

CAPITOLUL I

Generalități de biologie, sistematică.

Biologie. Cancerul bacterian (*Agrobacterium tumefaciens*) este un agent patogen cunoscut încă din antichitate, ce este larg răspândit pe întreg mapamondul. Patogenul atacă peste 640 de specii vegetale. La vița-de-vie unde se întâlnește *Agrobacterium vitis*, împreună cu *Agrobacterium tumefaciens*, atacul este foarte periculos în plantațiile tinere în primii ani de la înființare, mai ales în regiunile afectate de înghețuri severe în timpul iernii.

Agentul etiologic (*Agrobacterium tumefaciens*) produce o boală foarte gravă atât în pepinierele viticole cât și în plantațiile viticole. Acest lucru este confirmat și de observațiile unor specialiști americani care afirmă că, bacteria, ce poate trăi ca endofit, se poate răspândi prin materialul biologic de propagare (Brian Hed, Penn State Univ Extension 2017). A fost identificat și izolat din tumori și sevă (Burr et Katz, 1983). Aceste tulpini atacă multe plante inclusiv pomii fructiferi. Pământul pentru înființarea de noi plantații trebuie întotdeauna testat pentru prezenta acestora (Campillo et al., 2012). În Egipt (Tolba et Zaki, 2011), s-a demonstrat că principala tulpină patogenă în plantațiile de viță de vie este *Agrobacterium vitis*, dar experiențele noastre arată că în România tulpina *Agrobacterium tumefaciens* este de asemenea

prezentăcu atacuri masive. Oricum, datele din literatură arată că bacteria a fost izolatădin multe culturi în diferite țări inclusiv din plantațiile de viță. A fost raportat în Bangladesh (Islam et al, 2010) la multe plante dicotiledonate. Perović (2016) o identifică în Muntenegru. Factorii de patogenitate constau în diferite molecule de tip Vir E2 (Volokhina et al., 2005). În fond, nu numai tulpina bacteriană contează, dar și soiul de plantă cultivat (Mahmoudzadeh et Doulati Baneh, 2008) care pot avea grade diferite de rezistență față de acești patogeni (*A. tumefaciens*, *A. vitis*). *Agrobacterium tumefaciens* are și un efect benefic cel puțin teoretic, și are un rol de inhibare a creșterii *Penicillium expanses* și îndepărtarea patulinei produse de acesta *in vivo* și *in vitro* (Wang et al., 2016).

Unele tulpini bacteriene sunt foarte virulente, producând direct necroza țesuturilor plantei, având gene ce produc așa numitul factor de necroză (Deng et al., 1995). Bacteria utilizează semnalele biochimice derivate de la plantă pentru activarea genelor de virulență (Ti plasmid)-stimulând la rândul ei o mare producție de cytokine, IAA și opine care stimulează creșterea plantei și formarea tumorilor (Subramoni et al, 2014).

S-au identificat tulpini ce sunt capabile să inducă patogeneza la om, la persoane imunocompromise ca de exemplu la un pacient cu catetere (Hulse et al., 1993).

Ca urmare a cinci ani de cercetări, pe soiul Muscat de Alexandria, s-a constatat că plantele au suferit o reducere a vigoriei lor în urma atacului acestui patogen (Fereira et al, 1992) iar cantitatea de recoltă a fost semnificativ redusă.

Patologie.

La vița-de-vie atacul este foarte periculos în plantațiile tinere deoarece cauzează pierderi masive de vițe altoite în primii ani de la înființare, mai ales în regiunile afectate de înghețuri severe în timpul iernii.

Atacul bacteriei are efect asupra concentrației de clorofilă și fier al frunzelor-la piersici (Tsipouridis et al., 2006). Efectul principal este formarea tumorilor deoarece conform acelorași autori, celulele plantelor sunt stimulate de către bacterie să se dividă și să crească fărăcontrol. Bacteria posedă o serie de factori de virulență spre exemplu un tip de proteină (Volokhina I. et al., 2005), care a fost mai recent identificată ca LsrB (Tang et al., 2018). În plus, bacteria își transferă în celulele plantei o plasmidă cu rol în patogenează-formarea tumorilor (Ti), ca urmare a semnalelor derivate de la gazdă. Expresia acestor gene la gazdă duce la formarea de IAA, opine și citochine (Subramoni et al., 2014), stimulând creșterea țesutului și formarea de tumori. Bacteria se hrănește cu substanțe poduse de plantă- de pildă acid gamma hydroxybutyric, acid gamma aminobutyric (Gonzales –Mula et al, 2018). Și la tulpinile de *A. vitis* identificate în Bulgaria, plasmidele de tip Ti au un rol important în patologie, iar analiza a 20 de tulpini de diferite proveniențe geografice arată o mare variabilitate genetică, un polimorfism al tulpinilor ce pot grupate în 15 grupuri aparținând a două nuclee, iar tulpinile din Bulgaria aparțin la trei grupe dintr- un nucleu taxonomic (Genov et al., 2006). S-au identificat enzime ce ajută la sinteza cardiolipinelor din membrane- fosfolipaza tip D-cardiolipin sintaza (Czolkoss et al., 2016). Se

observă o gradație a patogenității tulpinilor de la avirulente până la foarte virulente. În cazul acestora din urmă ca A281, se produce o necroză a țesuturilor și mai puțin formarea de tumori (Deng et al., 1995). În plus, bacteria și mai ales biovarul 3, duce la reducerea vigoriei viței de vie și afectează producția (Ferreira et al., 1995). Totodată, se arată importanța materialului de plantat sănătos. Tot în acest sens, s-a demonstrat experimental că tulpinile tumorigene (tulpina CG49 determină creșterea calusului și reducerea dezvoltării mugurilor la nivelul legăturii cu butașii altoiți și creșterea tulpinilor. Tulpinile netumorigene de *A. vitis* dimpotrivă, reduc formarea calusului și nu afectează înmugurirea și creșterea coardelor de viță (Hao et al., 2018). Practic bacteria transferă secvența de ADN oncogenic prin sistemul secretor de tip IV, în plantă, iar gene *acvB* codifică un factor de virulență (Gronewold et al., 2019).

Identificarea se face atât prin metode microbiologice cât și prin mijloace de biologie moleculară cu identificarea exactă a tulpinilor respective, inclusiv prin metoda amplificării secvențelor specifice (Campillo et al., 2012). Pentru lămurirea taxonomiei s-au utilizat 16S rRNA marker pentru genele *recA* și analiza secvențelor multilocus (multilocus sequence analysis-MLSA) (Kumaga et al., 2008) așa cum arată Gan et Savka (2018), fiind identificate 97 de izolate de *Agrobacterium*. Printre aceste tulpini, sunt unele avirulente, care cresc pe tartrat, altele virulente ce nu cresc cu tartrat și au plasmide tip Ti (Szegedi et al., 2005).

Prevenirea apariției infecției se face prin alegerea butașilor liberi de infecții, certificați și de vițe sănătoase din școala de

vite, controlul periodic al solului pentru tulpinile remanente în sol, evitarea importurilor de material săditor infectat, instituirea carantinei fitosanitare, etc. Un exemplu de asemenea încălcare a carantinei este importul în Iran a unor soiuri de trandafiri la care au apărut simptome de cancer bacterian (Davoodi et Hajivand, 2013). Alt exemplu recent, sunt vișele de vie nobile importate de România din Franța, Italia, Spania pentru programul de reconversie.

Combatere

Metode fizice

Utilizarea mijloacelor fizice de combatere a fost una dintre primele metode aplicate prin utilizarea apei fierbinți la desinfectarea butașilor (Bazzi et al, 1991). O altă metodă fizică a constat în expunerea la diferite frecvențe joase a undelor de amplitudine pătratică modulate (QAMW) de două generatoare în scopul determinării frecvenței de rezonanță care ar putea determina inhibiția creșterii bacteriei, aceasta fiind de 1.0Hz QAMW timp de 90 min, iar inhibiția creșterii bacteriene a fost de circa 49.2% (Fadel et al., 2017).

Metode chimice

Unii specialiști caută să utilizeze peptidele antibiotice litice, ce afectează creșterea bacteriană chiar și la concentrații mici, 5 asemenea peptide au fost puse în evidență (cecropin A, B, magainin I și II, și Shiva-1. Cecropinele la concentrații peste 0.5 μ , M, au fost efective contra *Agrobacterium* (Li et Ray, 2003). Utilizarea fumigării solului cu bromura de metil este destul de bună, fiind indicată în livezile de nuci și alți pomi fructiferi. S-au făcut și combinații de substanțe aplicate prin

fumigare la sol în vederea prevenirii apariției bolii ca MeBr, precum 1,3-dicloropropan (1,3-D), cloropicrin, iodometanul, dazomet, și metam-sodiu care să reducă populațiile de *Agrobacterium tumefaciens* și *Phytophthora cactorum* (Yakabe et al., 2010).

Metode biologice

Acestea implică utilizarea unor bacterii antagoniste care să inhibe creșterea bacteriilor fitopatogene. dar producerea acestor preparate necesită laboratoare bine dotate. Aceste bacterii antagoniste sunt destul de sensibile la pesticidele chimice, pe când bacteriile fitopatogene au sensibilitate diferită la chimicale, ceea ce duce la concluzia că preparatele biologice trebuie să conțină mai multe tulpini de antagoniști (Payka et al., 2016). Astfel, s-a reușit utilizarea unor tulpini nepatogene de *Agrobacterium*, ca K84 și K 1026, în stoparea infecției cu forma patogenă. (Ryder et Jones, 1991).

K1026 este mutant în care plasmidul PAg nu mai poate fi transferat, și deci nu mai poate produce tulpini rezistente la tratament. Utilizarea unor tulpini de bacterii endofite și din rizosfera viței de vie, selecționate, pentru inhibarea creșterii *Agrobacterium* sp. a dus la izolarea unor tulpini bacteriene care elaborează compuși metabolici secundari ce pot fi angrenați și în lupta de combatere biologică (Compant et al, 2013), din genurile *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Rahnella* și altele, ca alternativă la pesticide chimice pentru o agricultură sustenabilă. Alții recomandă utilizarea extractului de usturoi (Vizitiu, 2016). Alt grup recomandă utilizarea unei tulpini nepatogene ca

*A.tumefaciens*UHFBA-218 cu activitate antagonistă (Sharma et al, 2017).

În plantațiile înființate cu vițe afectate de cancer bacterian, agentul patogen există în sol și pe butucii de vița de vie. In aceste condiții există riscul unui atac al agentului patogen asupra plantelor rănite de gerurile puternice din timpul iernii, de tăieri, de grindină, de atacul insectelor, precum și ca urmare a lucrărilor mecanice și manual ce se efectuează în cadrul tehnologiilor de cultură.

Pentru a se preîntâmpina pierderea altor butuci de viță de vie din plantația tânără, este necesar să se ia măsuri de combatere a bolii încă din primul an de plantareconform unui program bine stabilit în care să fie incluse măsuri preventive și curative.

CAPITOLUL II. CANCERUL BACTERIAN LA VIȚA DE VIE

SIMPTOMATOLOGIE



Fig 1 Butuc cu cancer bacterian;



Fig 2 Tumorete pe coarda cu frunze

La vița-de-vie atacul este foarte periculos în plantațiile tinere în primii ani de la înființare, mai ales în regiunile afectate de înghețuri severe în timpul iernii.

În țara noastră, cancerul bacterian al viței de vie deși este o boală de carantină, a reapărut în podgoriile noastre tinere pe calea unor importuri necontrolate de butași din țări ca Italia, Franța, Spania și altele pentru programul de reconversie în viticultură. Vițele altoite afectate de cancer bacterian din plantațiile nou înființate se usucă în primii 2-3 ani de la plantare în mare parte (în procent de aprox.95%) iar cele debilitate nu mai pot fi salvate.

Cancerul bacterian determină uscarea vițelor altoite și plantate, debilitarea, moartea brațelor mai bătrâne și chiar uscarea butucilor. Simptomele specifice atacului sunt: tumori mai mari, bine conturate, sferice sau ovoidale ce se formează pe scaunul butucului în zona punctului de altoire și calusare. Inițial tumorile sunt mici, albicioase, apoi cresc până ajung de mărimea unui cartof (6-10 cm) sau chiar mai mari, se întăresc și devin brune sau brun-închis cu o consistență spongioasă, dar dură cu aspect buretos.

„Ariceală“ sunt tumori mai mici sau tumorete ce se formează pe brațele mai vechi de un an; această formă de atac se manifestă, de obicei, pe leziunile produse de ger și se prezintă sub formă de proliferări continue pe lungimea butucului sau a tulpinii, care îmbracă organul atacat de jur-împrejur, ca un manșon,

determinând uscarea sa rapidă. Majoritatea tumorilor putrezesc la sfârșitul fiecărui an și cad, urmând ca în sezonul următor să se formeze noi tumori.

Tumorile pe materialul săditor sunt tumori mai mari, bine conturate, sferice sau ovoidale, ce se formează în zona punctului de altoire și calusare.

CAPITOLUL III. DETERMINĂRI PRIVIND CANCERUL BACTERIAN ÎN PLANTAȚIA TÂNĂRĂ DE VIȚĂ DE VIE ȘI LABORATOR

MATERIAL ȘI METODĂ

Experimente în laborator

Materialul biologic a fost colectat din sudul Romaniei, comuna Hotarele Giurgiu (44° 10.4' North, 26° 22.2' Est) ,- coarde cu cancer au fost colectate, precum și seva din coarde a fost colectată în tuburi Greiner curate. În laborator coardele cu tumori au fost dezinfectate cu hipoclorit soluție 2%, tăiate cu un bisturiu steril în bucăți mici. Bucățile au fost dispuse pe mediu cu telurit de potasiu utilizat pentru izolarea *Agrobacterium* sp. Seva colectată a fost dispusă cu o pipetă și spatulă Drigalski sterile, pe același tip de mediu. Mediu de izolare utilizat a fost cel cu manitol glutamat cu adaos de telurit de potasiu (Mougel și colaboratorii, 2001) și incubate la 28°C. Apoi după apariția coloniilor caracteristice de culoare neagră, au fost cultivate în vase Petri în care s-au depus rondele de hârtie Watmann impregnate cu sulfat de cupru de diferite concentrații, iar rezultatele de inhibiție în milimetri sunt înscrise în tabelul 1.

Un alt test a fost cel de patogenitate pe rondele de morcovi sterilizate și dispuse în capsule Petri la 28°C timp de trei săptămâni.

Alt test a fost efectul diferitelor concentrații de sulfat de cupru în vitro. Practic s-au utilizat maimulte concentrații (6,25; 6,50; 6,75 s 7g/100ml apa). Bacteria a fost răspândită pe suprafața mediului, apoi s-au dispus rodele de hârtia de fitru impregnate

cu câte 5µl din fiecare concentrație deci patru variante fiecare cu câte trei repetiții. După incubarea 5 zile la 28°C, s-a constatat gradul de inhibiție a creșterii prin numărarea coloniilor apărute și comparativ cu un lot martor netratat.

Experimente în teren

Pentru a determina impactul cancerului bacterian asupra plantațiilor de viță de vie nou înființate prin programul de reconversie din viticultura țării noastre, în anul 2017 s-a procedat la determinarea existenței patogenului într-o plantație de vita de vie- soiul Muscat Ottonel- înființată în anul 2014 în comuna Hotarele județul Giurgiu cu material săditor viticol adus din Italia.

Distanțele de plantare sunt de 2/1,2 m. S-au determinat numărul de goluri (nr. de vițe dispărute din 100 de vițe plantate). În câmp, s-a amplasat experiența în cadrul plantației de viță de vie după metoda blocurilor etajate în 4 variante a 4 repetiții și martor.

Fiecare variantă a fost formată din 4 rânduri a 300 butuci respectiv 1200 de butuci.

În prima fază, s-a procedat la numărarea butucilor de viță de vie pe variante și repetiții respectiv la determinarea numărului de goluri și de vițe afectate de cancer bacterian.



Fig 3. Aspect din via experimentală

S-a procedat la determinarea existenței cancerului bacterian în plantație și a efectului acestuia asupra plantației. Se observă formațiunile tumorale aparute (fig 4, 5), inclusive la vișele altoite (fig nr. 6).

În urma determinărilor s-a constatat existența cancerului bacterian în plantație și a faptului că din cauza lui au apărut un număr mare de goluri, datorită uscării vișelor afectate (fig. 7).



Fig nr. 4. Formațiuni tumorale apărute pe tulpini



Fig nr. 5. Formațiune tumorală pe colet



Fig.6. Formațiune canceroasă la punctual de altoire.



Fig 7. Goluri în plantație datorate cancerului bacterian

Pentru determinarea efectului sulfatului de cupru asupra cancerului bacterian respectiv pentru reducerea atacului și prevenirea răspândirii agentului patogen s-au efectuat tratamente în câmp cu sulfat de cupru în concentrații mărite pe variante (vezi mai jos)

V1-6,25%

V2-6,5%

V3-6,75%

V4- 7%

Martor netratat

Anterior efectuării tratamentului cu sulfat de cupru fermierul a efectuat tratament la întreaga plantație cu Cuproxat flowable în concentrație de 0,3%

La sfârșitul perioadei de vegetatie după caderea frunzelor, după efectuarea tratamentelor de prevenire și combatere a cancerului bacterian, s-au numărat butucii de viță de vie, s-a studiat starea vițelor afectate de *Agrobacterium tumefaciens* respectiv golurile pe variante și repetiții- pentru a se putea constata efectul tratamentului cu soluții concentrate de sulfat de cupru.

În laborator s-a procedat la determinarea și izolarea tulpinii de *Agrobacterium tumefaciens*, la determinarea patogenității, la determinarea efectului sulfatului de cupru asupra bacteriei.

S-au efectuat observații pe variante și repetiții referitoare la pornirea în vegetație a vițelor de vie tratate cu soluție de sulfat de cupru concentrată-6,25-7% (fig. nr. 8,9).

S-a constatat că pornirea în vegetație a butucilor de viță de vie din cadrul variantelor experienței este foarte bună – mult mai buna față de martor și de restul plantației.



Fig. 8. Aspect al plantației de viță de vie după tratamentul cu sulfat de cupru, soluție concentrată. Se observă vițele regenerare

Butucii afectați de cancer bacterian din cadrul experienței au rămas puțini și au avut o pornire în vegetație foarte slabă -

prezintă câteva creșteri, sau cele câteva creșteri existente au fost ofilite la data observațiilor (04.05.2017).

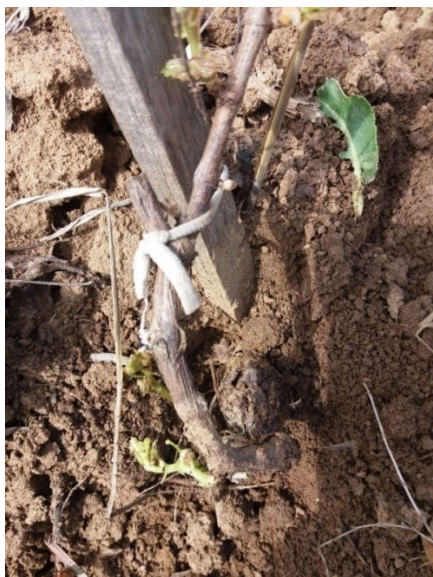


Fig 9., Butuc de viță de vie afectat de cancer bacterian după tratamentul cu sulfat de cupru

Pe parcursul perioadei de vegetație ale anilor 2017, 2018 s-au efectuat observații asupra butucilor de viță de vie pentru a se vedea dacă apar alte efecte ale agentului patogen.

În urma observațiilor efectuate în luna august în anii 2017, 2018, s-a constatat că în variantele cu tratament cu sulfat de cupru concentrat nu au apărut tumori sau tumorete pe butucii de viță de vie luați în studiu.

CAPITOLUL IV. REZULTATE PROPRII

Rezultatele din câmp și laborator au fost înscrise în tabelele și graficele de mai jos.

TABEL nr 2. Variantele experimentale

Varianta/ repetitia	V1(6,25 kg/100 l)	V2(6,50 kg/100 l)	V3(6,75 kg/100 l)	V4 (7kg/100 l)	Obs.
R1	0,6	0,6	0,9	1,0	Rezultate medii
R2	0,4	0,8	1,0	1,4	
R3	0,4	0,5	0,8	1,2	

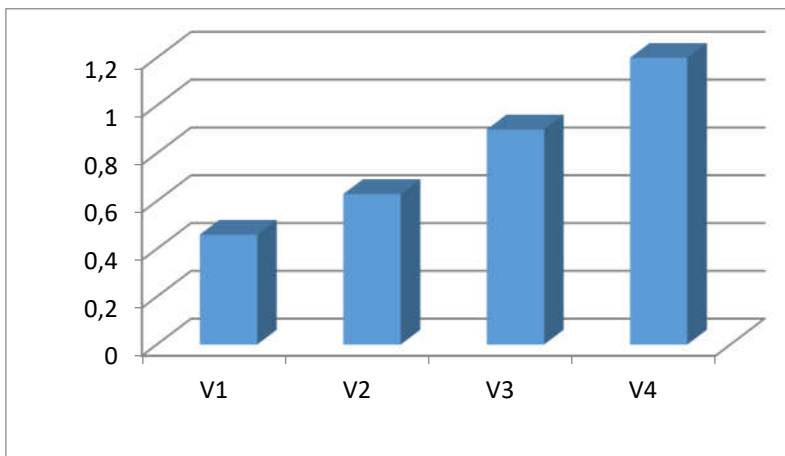


Fig nr 10. Tratamentul în cele 4 variante experimentale (zona de inhibiție în cm)

În tabelul 2, se observă organizarea variantelor experimentale și cantitățile de sulfat de cupru care sunt folosite și volumul de spreiat, cantitățile crescute progresiv de la V1 la V2, și a repetițiilor cu diferit volum de soluție de tratament. În laborator s-au făcut aceleași variante experimentale *in vitro*, obținându-se o inhibiție a creșterii bacteriei, plaja de inhibiție ca și în cazul antibioticelor fiind diferite la fiecare varianta experimentală. Se poate observa inhibiția în V4 (fig.12).

De asemenea alt experiment în laborator, a fost aplicarea unei soluții de sulfat de cupru concentrație 7% la capsule Petri cu culturi de *Agrobacterium tumefaciens* (fig. 13) ulterior prelevându-se probe de cultura din acestea și reînsămânțarea pe mediu în alte capsule Petri, rezultatul fiind negativ. Se demonstrează astfel că la această concentrație bacteria este complet inhibată *in vitro*.

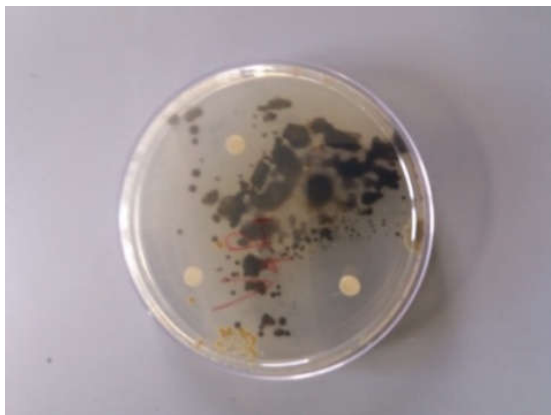


Fig. 11. Aspectul coloniilor de *Agrobacterium tumefaciens* (negre) pe mediul cu telurit și inhibiția creșterii în varianta 4



Fig. 12. Tratament cu sulfat de cupru concentrat 7%



Fig 13. Demonstrarea eficacității tratamentului (prin reînsămânțările din zona de inhibiție nu apar nici un fel de colonii)

În ceea ce privește situația parcelor de experiență în câmp, s-a făcut așa cum am mai arătat determinarea numărului de gouri produs de cancerul bacterian în plantațiile de viță de vie.

TABEL NR. 2 - DETERMINAREA NUMĂRULUI DE GOLURI ÎNAINTE DE TRATAMENT

Varian ta	PARCELA 1	PARCELA 2	PARCELA 3	TOTAL BUTUCI	NR. GOLURI	%
V1R1	106	100	64	270	10	10
V1R2	106	107	71	284	16	5,33
V1R3	107	106	69	282	18	6
V1R4	111	102	70	283	17	5,66
TOTAL V1				1119	81	6,75
V2R1	112	103	61	276	24	8
V2R2	105	98	49	252	48	16
V2R3	106	100	66	272	28	9,33
V2R4	112	106	70	288	12	4
TOTAL V2				1088	112	9,34
V3R1	112	106	74	292	8	2,66
V3R2	111	108	74	293	7	2,33
V3R3	112	106	70	295	12	4
V3R4	112	108	70	294	10	3,33
TOTAL V3				1163	37	3,10
V4 R1	112	102	75	289	11	3,66
V4 R2	117	102	74	293	7	2,33
V4 R3	112	105	78	295	5	1,66
V4 R4	112	105	77	294	6	2,00
TOTAL V4				1171	29	2,41
MT 1	112	103	70	285	15	5
MT 2	102	103	69	274	16	8,67
MT 3	114	104	71	289	11	3,67
MT 4	94	104	69	267	33	11
TOTAL MT				1111	89	7,42

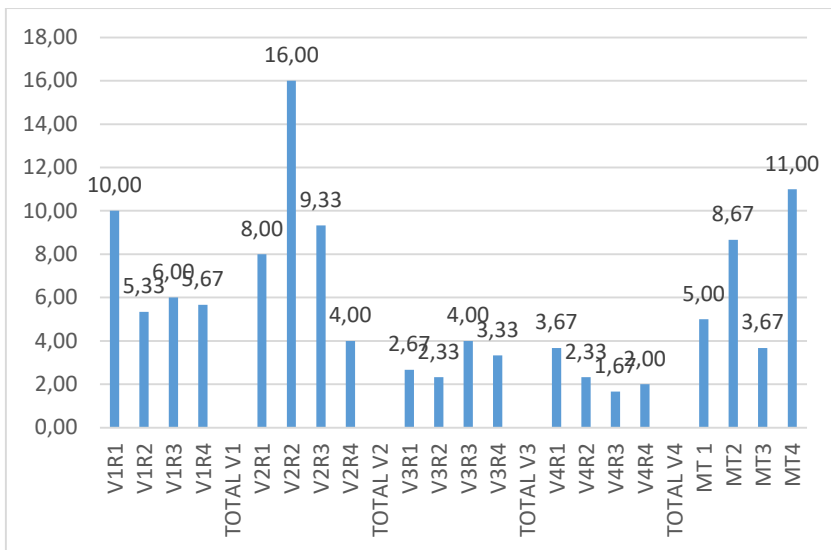


Fig nr. 14. Grafic cu situația culturii atacate de cancerul bacterian

TABEL NR.3-DETERMINAREA NUMĂRULUI DE GOLURI DUPĂ TRATAMENT

Varian ta	PARCELA 1	PARCELA 2	PARCELA 3	TOTAL BUTUCI	NR. GOLU RI	%
V1R1	106	100	64	270	30	10
V1R2	106	107	70	283	17	5.57
V1R3	107	106	69	282	18	6
V1R4	111	102	70	283	17	5.57
TOTAL L V1				1118	82	6,83
V2R1	112	103	61	276	24	8
V2R2	105	98	49	252	48	16
V2R3	106	100	65	271	29	9.67
V2R4	112	105	70	287	13	5.67
TOTAL L V2				1096	114	9,50
V3R1	112	106	73	291	9	3
V3R2	111	107	74	292	8	2.67
V3R3	112	105	70	288	12	4.
V3R4	112	108	70	290	10	3.33
TOTAL L V3				1161	39	3,25
V4 R1	112	102	74	288	12	4
V4 R2	117	102	74	293	7	2.33
V4 R3	112	105	77	294	6	2
V4 R4	112	105	77	294	6	2
TOTAL L V4				1169	31	2,58
MT 1	109	103	69	281	19	6.67
MT 2	102	102	69	273	27	9
MT 3	113	103	71	287	13	4.33
MT 4	94	104	69	267	33	11
TOTAL L				1108	92	7,66

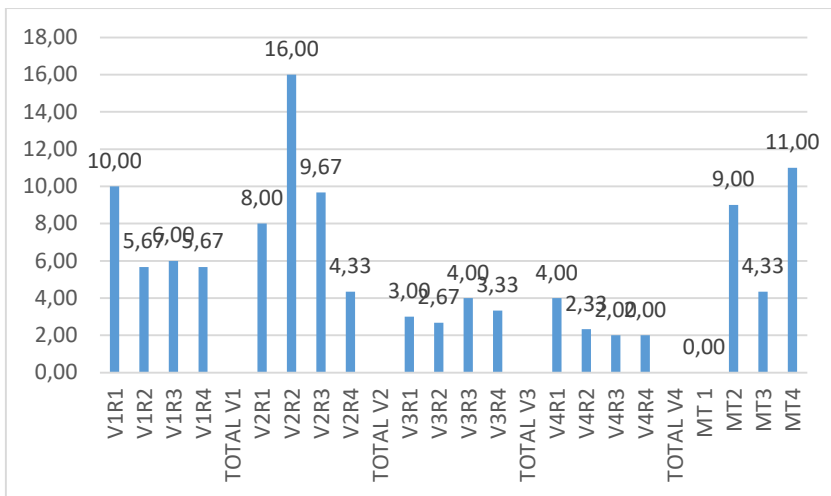


Fig.nr. 15. Grafic cu variantele experimentale

TABEL nr.4. Analiza procentului de pierderi butuci pe perioada experimentelor

Varianta	Vițe distruse %					
			Media anuala			
	Inainte de tratament	Dupa tratament	2014-2016	Dupa tratament		
	2014-2016	2017		2017	2018	
Martor	7,08	7,66	2,36	0,58	0,58	
V1	6,75	6,83	2,25	0,08	0,08	
V2	9,34	9,50	3,11	0,16	0,16	
V3	3,08	3,25	1,03	0,17	0,17	
V4	2,41	2,58	0,80	0,17	0,17	

Din analiza datelor din tabele se poate constata faptul că în plantația de viță de vie, în urma tratamentelor efectuate cu sulfat de cupru concentrat, s-a stopat cancerul bacterian din plantație, respectiv nu s-au mai găsit tumori, tumorete la butucii de viță de vie iar pierderile de butuci s-au redus semnificativ, după cum se observă în tabelele 3 și 4. Datele sunt pe perioade și pe ani, pentru că observațiile, rezultatele se obțin de abia în anul următor față de momentul tratamentelor, deci în 2017 datele sunt în urma tratamentelor din 2016. După cum se observă (Tabel 4), datele din 2018 sunt practic aceleași din 2017, situația pierderii de butuci menținându-se aceeași (nu s-au mai pierdut butuci).



Fig 13. Starea de sănătate a butucilor de viță de vie intrați în repaos vegetativ după tratamentele cu soluție de sulfat de cupru.

Pentru a nu se depăși doza admisă conform reglementarilor legale s-a procedat la determinarea cuprului metalic din sol, s-au efectuat calculații.

În urma tratamentului cu sulfat de cupru concentrat 7%, cu o cantitate de 300 de l soluție pe hectar, respectiv 21 Kg sulfat de cupru/ha, s-a determinat conținutul solului în cupru metalic pe adâncimea de 0,5 m respectiv faptul că acesta este de 1,207488 mg/Kg - foarte mic în comparație cu doza admisă de legislația românească de 20- 250mg/Kg.

CAPITOLUL V. MĂSURI DE PREVENIREA ȘI COMBATEREA CANCERULUI BACTERIAN

Cancerul bacterian infectează planta sistemic și, odată instalat, este foarte greu de controlat. Boala poate fi prevenită în mare parte prin aplicarea unor măsuri profilactice specifice:

În pepiniere se recomandă să se ia o serie de măsuri:

- Pentru prevenirea infecției cu *Agrobacterium vitis*, o primă măsură preventivă o reprezintă evitarea folosirii de material viticol de înmulțire (corzi altoi și portaltoi) infectat. Pentru acest fapt este necesar să se procedeze în plantațiile mamă producătoare de corzi altoi și portaltoi la selecția în masă pozitivă sau negativă respective la eliminarea și arderea butucilor bolnavi și la dezinfectarea locului acestora.

- Respectarea strictă a măsurilor de carantină fitosanitară, știut fiind că boala se răspândește masiv prin circulația materialului săditor afectat.

- Folosirea de portaltoi rezistenți la cancerul bacterian, cum ar fi 3309C, 101-14 MGT și Riparia Gloire.

- Dezinfectia materialului folosit la altoire cu sulfat de cupru 1,5%. Chinosol W 0,2% prin îmbăiere;

- Eliminarea din pepiniera și după scotere din pepiniera a vitelor altoite afectate de cancer bacterian și arderea lor.

- Mocirlirea materialului viticol pentru plantat în școala de vite cu un amestec de mocirlă + Kasumin sau Sare potasică 0,5%.

În plantațiile tinere și pe rod se recomandă:

- Cea mai importantă măsură pentru prevenirea infecției cu *Agrobacterium* este respectarea strictă a măsurilor de

carantină fitosanitară pentru evitarea folosirii de vițe altoite infectate cu agentul patogen.

- Să se evite amplasarea plantațiilor viticole pe soluri umede în zone predispuse la îngheț;

- Să se limiteze sursa de infecție prin identificarea, scoaterea, arderea butucilor distruși și dezinfectarea locului cu formalină 3-5%, respectiv 6 l soluție la groapă, știut fiind că bacteria poate supraviețui în sol pe rădăcini în descompunere, resturi de coarde, lemn, până la 2 ani;

- Să se evite rănirea și agresiunile mecanice;

- Să se limiteze numărul și suprafața plăgilor tăiate;

- Să se dezinfecteze uneltele folosite la tăiere, prin îmbăiere într-o soluție de formalină 3-5% sau hipoclorit de sodiu 1%;

- Să se aplice tratamente imediat după efectuarea tăierilor de formare, rodire cu sulfat de cupru în concentrație mare 6-7% precum și în timpul perioadei de vegetație cu produse pe bază de cupru-Alcupral, Champion, Kocide etc.- deoarece reduc intensitatea atacului, îl stopează;

- Aplicarea de K_2O și P_2O_5 care îmbunătățesc rezistența la frig și boli a viței-de-vie;

Pentru protecția viței de vie împotriva cancerului bacterian apărut în plantația de viță de vie, pentru combaterea și stoparea răspândirii lui în plantațiile nou înființate și pe rod, este necesar să se ia o serie de măsuri care să prevină răspândirea lui – să se efectueze tratamente –îmbăierea butucilor- cu soluții concentrate de sulfat de cupru 6-7%-după efectuarea tăierilor de formare, până la eradicarea din plantație.

Îmbăierea tuturor butucilor din plantație trebuie efectuată foarte bine cel puțin doi ani consecutivi, iar această lucrare se poate realiza cel mai bine cu vermorele profesionale sau atomizoare, chiar dacă este o lucrare greoaie.

Pentru tratamentele ce se efectuează cu tractoare și pompe de stropit este necesar să se dirijeze soluția de sulfat de cupru concentrată pe butucii de vița de vie.

Datorită presiunii pompei de stropit tratamentul se efectuează din două în două rânduri folosindu-se două duze pentru rândul de vițe din partea stângă a pompei și două duze pentru rândul din partea dreaptă a pompei de stropit.

Este indicat ca tratamentul să se efectueze într-o zi cu soare și fără vânt, fără pericol de precipitații cel puțin 24 de ore.

Dacă în interval de 24 de ore au loc precipitații, este indicat să se repete tratamentul.

Referințe bibliografice

1. Bazzi C., Stefani E., Gozzi R., Burr T. J., Moore C. L., Anaclerio F. (1991) Hot-water treatment of dormant grape cuttings: Its effects on *Agrobacterium tumefaciens* and on grafting and growth of vine *Vitis* Vol 30, No 3 (1991) 177-187.
2. Burr, T. J., and Katz, B. H. 1983. Isolation of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 from grapevine galls and sap, and from vineyard soil. *Phytopathology* 73:163-165.
3. Campillo T., Lavire C., Shams M., Pothier J.F., Pulawska J. (2012) Detection and identification methods and new tests as developed and used in the framework of COST 873 for bacteria pathogenic to stone fruits and nuts. *Journal of Plant Pathology* (2012), 94 (1, Supplement), S1.97-S1.104 Edizioni ETS Pisa, 2012 S1.97.
4. Compant S., Brader G., Muzammil S., Sessitsch A., Lebrühi A., Mathieu F. (2013) Use of beneficial bacteria and their secondary metabolites to control grapevine pathogen diseases *BioControl* (2013) 58:435–455
5. Czolkoss S, Fritz C, Hölzl G, Aktas M (2016) Two Distinct Cardiolipin Synthases Operate in *Agrobacterium tumefaciens*. *PLoS ONE* 11 (7): e0160373. doi:10.1371/journal.pone.0160373.
6. Davoodi A., Hajivand S. (2013) Crown Gall Disease on Imported Roses Plants in Qazvin Province *Journal of Ornamental and Horticultural Plants*, 3 (2): 117-124,
7. Deng W, Pu XA, Goodman RN, Gordon MP, Nester EW. (1995) T-DNA genes responsible for inducing a necrotic response on grape vines. *Mol Plant Microbe Interact.* 1995 Jul-Aug;8(4):538-48.
8. Ferreira H.S., van Zy F.G.H., Staphorst L. (1992) *Agrobacterium tumefaciens* biovar Responsible for Reduction in Yield and Vigour of Muscat d' Alexandrie. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*;13 (2):78-80.
9. Gan HM, Savka MA (2018) One More Decade of *Agrobacterium* Taxonomy. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2018;418:1-14. doi: 10.1007/82_2018_81.
10. Genov I., Atanassov I.A., Yordanov Y., Tsvetkov I.Y. (2006) Genetic diversity of *Agrobacterium vitis* strains, isolated from grapevines and wild grapes in Bulgaria, assessed by Cleaved Amplified Polymorphic Sequences analysis of 16S-23S rDNA *Vitis* 45 (3), 125–130 (2006)

11. Gonzalez-Mula A, Lachat J, Mathias L, Naquin D, Lamouche F, Mergaert P, Faure D.(2018) The biotroph *Agrobacterium tumefaciens* thrives in tumors by exploiting a wide spectrum of plant host metabolites. *New Phytol.* 2018 Nov 17. doi: 10.1111/nph.15598.
12. Groenewold MK, Hebecker S, Fritz C, Czolkoss S, Wiesselmann M, Heinz DW, Jahn D, Narberhaus F, Aktas M, Moser J.(2019) Virulence of *Agrobacterium tumefaciens* requires lipid homeostasis mediated by the lysyl-phosphatidylglycerol hydrolase AcvB. *Mol Microbiol.*;111(1):269-286.
13. Hao L, Kemmenoe DJ, Orel DC, Burr T. (2018) The Impacts of Tumorigenic and Nontumorigenic *Agrobacterium vitis* Strains on Graft Strength and Growth of Grapevines. *Plant Dis.* 2018 Feb;102(2):375-381.
14. Islam S.M, Akter M, Rahman A., Rahman M. ,Aktar M., Alam F. (2010) Isolation of *Agrobacterium tumefaciens* strains from crown gall samples of Dicot Plants from Bangladesh. *Curr.Res. Bacteriol.*; 3(1):27-30.
15. Karimi, M.; Van Montagu, M.; Gheysen, G. (2000-11-01)."Nematodes as vectors to introduce *Agrobacterium* into plant roots". *Molecular Plant Pathology.* 1 (6): 383–387. doi:10.1046/j.1364-3703.2000.00043.x. ISSN 1364-3703.
16. Kado CI (2002) The Tumor-Inducing Substance of *Agrobacterium Tumefaciens* Article in Annual Review of Phytopathology 14(1):265-308 ·
17. Kumaga L, Fabritius A.L.(2008) Detection and Differentiation of Pathogenic *Agrobacterium vitis* and *A. tumefaciens* in Grapevine using Multiplex Bio-PCR *Proceedings of the 2nd Annual National Viticulture Research Conference* • July 9–11, 2008 • University of California, Davis 42-43. *Medicago truncatula* handbook version March 2007
18. Li Z.T., Gray D.J. (2003) Effect of five antimicrobial peptides on the growth of *Agrobacterium tumefaciens*, *Escherichia coli* and *Xylella fastidiosa*. *Vitis* 42 (2), 95–97.
19. Patyka V., Buletsa N., Pasichnyk L., Zhitkevich N., Kalinichenko A., Gnatiuk T., Butsenko L.(2016) Specifics of pesticides effects on the phytopathogenic bacteria. *Ecol. Chem. Eng. S.* 2016;23(2):311-331.
20. Lu XP, Xu YX, Mineo K. (2003) [Virulence genes of *Agrobacterium tumefaciens* and analysis function of its biology]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao.* 2003 Nov;19(6):651-4.

21. T. Perović, M. Renzi, A. Mazzaglia, and G. M. Balestra (2016) First Report of *Agrobacterium tumefaciens* as a Causal Agent of Crown Gall on Grapevine in Montenegro Plant Disease; 100 (2): 515 <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-15-0730-PDN>
22. Ryder, MH; Jones, DA (1991-10-01)."Biological Control of Crown Gall Using Using *Agrobacterium* Strains K84 and K1026".Functional Plant Biology. 18 (5): 571–579. doi:10.1071/pp9910571.
23. Sharma A, Gupta A. K., Khosla K., Mahajan R., Bharti E., Mahajan P. K. (2017)Antagonistic potential of native agrocin-producing non-pathogenic *Agrobacterium tumefaciens* strain UHFBA-218 to control crown gall in peach. Phytoprotection; 97 (1):1-11.
24. Sudarshana P., Ali McClean, and Daniel A. Kluepfel Development of a culture independent assay for the detection of a culture independent real time PCR assay for detection of *Agrobacterium tumefaciens* in soil .BOOK 2006.
25. Szegedi E., Bottka S., Mikulas J., Otten L., Sule S. (2005)Characterization of*Agrobacterium tumefaciens*strains isolated from grapevine. Vitis 44 (1), 49–54.
26. Subramoni S, Nathoo N., Klimov E., Yuan ZC.(2004) *Agrobacterium tumefaciens* response to plant signaling molecules 2004. Frontiers in Plant Sciences
27. Yakabe L.E., Parker S.R., Kluepfel D.A. (2010) Effect of pre-plant soil fumigants on *Agrobacterium tumefaciens*, pythiaceous species, and subsequent soil recolonization by *A. tumefaciens*.Crop Protection 29 (2010) 58:583–590.
28. Tang G, Li Q, Xing S, Li N, Tang Z, Yu L, Yan J, Li X, Luo L (2018) The LsrB Protein Is Required for *Agrobacterium tumefaciens* Interaction with Host Plants. Mol Plant Microbe Interact.;31(9):951-961.
29. Vizitiu DE, Dejeu LC., Radulescu I., Popescu C.F (2012) In vineyards. Scientific Papers, Series B, Horticulture, Vol. LVI, 2012 ISSN Online 2286-1580, ISSN-L 2285-5653
30. Vizitiu D.E. (2016) The Effect of Treatments with Garlic Tincture on Crown Galls of Grape Romanian Biotechnological Letters; 21(1):11.254-11.261.
31. Volokhina I., Sazonova I., Velikov V., Chumakov M. (2005) Isolation, purification, and identification of the virulence protein

- VirE2 from *Agrobacterium tumefaciens* Microbiological Research 160 (2005) 67—73.
32. Wang Y, Yuan Y, Liu B, Zhang Z, Yue T.(2016)Biocontrol activity and patulin-removal effects of *Bacillus subtilis*, *Rhodobacter sphaeroides* and *Agrobacterium tumefaciens* against *Penicillium expansum*.J Appl Microbiol. 2016 Nov;121(5):1384-1393.
 33. Yakabe L.E., S.R. Parker, D.A. Kluepfel Effect of pre-plant soil fumigants on *Agrobacterium tumefaciens*, pythiaceous species, and subsequent soil re-colonization by *A. tumefaciens* Crop Protection 29 (2010) 583–590.
 34. "Bacterial Crown Gall of Fruit Crops | Ohioline".ohioline.osu.edu. Retrieved 2017-10-20.
 35. "Crown Gall – A Growing Concern in Vineyards".extension.psu.edu. Retrieved 2017-10-2