

MACHETA 3

Ministerul Agriculturii și Dezvoltării Rurale		
Codul ADER și denumirea proiectului:	ADER 5.2.1. - Cercetări privind perfecționarea sistemului de monitorizare, prevenire și control a principalelor boli bacteriene și dăunători de carantină care afectează producerea cartofului în România, <i>Clavibacter</i>, <i>Ralstonia</i>, <i>Synchytrium endobioticum</i>, <i>Dithylenchus sp</i>	
Denumire conducător de proiect	Stațiunea de Cercetare - Dezvoltare pentru Cartof Târgu Secuiesc	
	Adresa de contact (telefon, e-mail, adresa poștală, CUI, cont):	Str. Orbán Balázs, nr. 15, Loc. Târgu Secuiesc, Jud. Covasna, Cod poștal 525400; CUI RO 14829298, cont nr. RO31TREZ25720G332000XXXX - Trezoreria Târgu Secuiesc
	Director (nume și prenume, telefon fix și mobil, e-mail):	Dr. ing. Mike Luiza 0267363755 / 0744307599; e-mail: scdcts@gmail.com
	Contabil șef (nume și prenume, telefon fix și mobil, e-mail):	Ec. Bardocz Ildikó 0267363755 / 0753100544; e-mail: scdcts@gmail.com
	Director de proiect (nume, prenume, telefon fix și mobil, e-mail):	Dr. ing. Baciuc Anca - Mihaela 0267363755 / 0751045873; e-mail: anca.mihab@gmail.com
Denumire partener 2	Institutul Național de Cercetare - Dezvoltare pentru Cartof și Sfeclă de Zahăr Brașov	
	Adresa de contact (telefon, e-mail, adresa poștală, CUI, cont):	Tel.: 0722320593 / Fax: 0268-476608, icpc@potato.ro , Str. Fundaturii nr. 2 cod -postal 500470, Brașov, CUI RO 18923009, RO34 TREZ1315069XXX006701 deschis Trezoreria Municipiului Brașov
	Director general (nume și prenume, telefon fix și mobil, e-mail):	Dr. ing. CHIRU Sorin Claudiu 0268 474647 / 072335837; e-mail: sorin.chiru@potato.ro
	Director economic (nume și prenume, telefon fix și mobil, e-mail):	Ec. VULCU Nicolae telefon fix: 0268 476795; 0723396289; e-mail: nicolae.vulcu@potato.ro
	Responsabil de proiect (nume, prenume, telefon fix și mobil, e-mail):	Dr. ing. Hermeziu Manuela 0268 474647 / 0746164185; e-mail: hermeziu@gmail.com
Anul începerii proiectului: 2019 Anul finalizării proiectului: 2022 Durata (nr. luni): 38		

(anexă la procesul verbal de avizare internă nr. 747 / 20.10.2020)

Avizat,

Comisia de monitorizare

De acord,

DIRECTOR PLAN SECTORIAL

Daniela Paula URSU

PREȘEDINTE: Alexandru PAICA

MONITOR TEHNIC: Filofteia MANOLE

MONITOR ECONOMIC: Mircea Dan COSTACHE

RAPORT DE ACTIVITATE AL FAZEI II / 29.10.2020

Contractul nr.: 5.2.1. / 19.09.2019

Proiectul 5.2.1: Cercetări privind perfecționarea sistemului de monitorizare, prevenire și control a principalelor boli bacteriene și dăunători de carantină care afectează producerea cartofului în România, *Clavibacter*, *Ralstonia*, *Synchytrium endobioticum*, *Dithylenchus sp*.

Faza: nr. II / 29.10.2020,

Denumirea fazei II - Cercetări aplicative

Termen: început fază 30.10.2019 - sfârșit fază 29.10.2020

1. Obiectivul proiectului:

- Elaborarea unei strategii pentru monitorizarea și controlul suprafețelor de cartof contaminate cu organisme de carantină la nivel de parcelă conform hărților APIA;
- Elaborarea și implementarea de metodologii noi pentru prelevare de probe și testare, în vederea depistării prezenței / absenței organismelor de carantină fitosanitară la cartof într-o perioadă mai scurtă de timp.

Obiectivele specifice ale proiectului:

- Stabilirea suprafeței contaminate / organism de carantină, în exploatațile autorizate pentru producerea cartofului pentru sămânță;
- Testări privind toleranța liniilor noi de cartof la nematozii cu chiști și râia neagră în vederea omologării;
- Îmbunătățirea metodelor de laborator privind identificarea absenței / prezenței organismelor de carantină în probele de sol și tuberculi la cartof.

Obiective măsurabile:

- grafice de prelevare probe și testare pentru fiecare organism de carantină cu perioade bine stabilite și evitarea blocajelor în valorificarea producției;
- ghiduri de specialitate;
- broșuri și pliante pentru implementarea rezultatelor
- manual de prezentare "Organisme de carantină la cartof".

2. Rezultate preconizate pentru atingerea obiectivului:

- ✓ Optimizarea și modernizarea sistemului de producere a cartofului pentru sămânță din categorii biologice superioare.
- ✓ Norme metodologice pentru organizarea producerii / multiplicării, prelucrării și comercializării cartofului pentru sămânță și eliminarea riscului de contaminare cu organisme de carantină;
- ✓ Tehnologia de prelucrare a cartofului pentru sămânță în condiții de siguranță fitosanitară cu consum redus de energie;
- ✓ Creșterea eficienței economice în producerea și prelucrarea cartofului pentru sămânță din categorii biologice superioare.
- ✓ Pliante, elemente de transfer și consultanță.

3. Obiectivul fazei:

- Elaborarea unui model experimental pentru depistarea rapidă a râiei negre și a putregaiului inelar

4. Rezultate preconizate pentru atingerea obiectivului fazei:

- Model experimental pentru depistarea rapidă a râiei negre și a putregaiului inelar;
- Rezultate privind rezistența noilor soiuri de cartof create în țara noastră, a soiurilor din import, precum și a liniilor în curs de ameliorare la *Synchytrium endobioticum*;

Activități prezentate pentru atingerea obiectivului fazei II / 29.10.2020

Anul	Denumire fază	Parteneri implicați	Rezultate	Elem. de monitorizare
2020	Activitatea 2.1. Analiza metodelor de depistare a organismelor de carantină la cartof (râia neagră și putregaiul inelar) în vederea îmbunătățirii acestora pentru scurtarea timpului de diagnosticare	CP, P ₁ P ₃	- Model experimental pentru depistarea rapidă a râiei negre și a putregaiului inelar	Raport de cercetare
2020	Activitatea 2.2. Testarea unor soiuri / linii de cartof pentru stabilirea toleranței la organisme de carantină fitosanitară	CP, P ₁ P ₂ P ₃	Lista soiurilor / liniilor testate	Raport de cercetare
2020	Activitatea 2.3. Monitorizarea și identificarea suprafețelor afectate de atacul nematozilor din genul <i>Dithylenchus</i> , la nivel de plantă și în depozit. Analize de laborator, determinări, înregistrare date pedoclimatice	P ₂	Influența gradului de infecție asupra producției totale	Raport privind gradul de atac la cartoful pentru sămânță și consum din câmp și depozit. Date pedo-climatice

5. Rezumatul fazei: (maxim 5 pagini) și lucrarea în extenso - activități efectuate / rezultate obținute / costuri față de Planul de realizare propus.

Activitatea 2.1: Analiza metodelor de depistare a organismelor de carantină la cartof (râia neagră și putregaiul inelar) în vederea îmbunătățirii acestora pentru scurtarea timpului de diagnosticare

Rezistența sau sensibilitatea soiurilor de cartof la *Synchytrium endobioticum* se determină prin testări în condiții de laborator și de câmp.

În cadrul testărilor în laborator tuberculii se infectează artificial iar pentru testările de câmp infestarea plantelor se face natural din solul puternic infestat cu agentul patogen de *Synchytrium endobioticum*.

a) Metode de analiză în laborator:

Testarea în condiții de laborator se execută prin două metode :

- metoda lui *Glynn*
- metoda *Lammertahil* (metoda paharului)

b) Analize în condiții de câmp

Pentru a fi în măsură să se facă determinări cu privire la reacția cartofului la atacul de râie neagră este necesar ca terenul destinat testărilor să fie puternic infestat cu akimetosporangii de *Synchytrium endobioticum*.

Plantarea în câmp se face în blocuri cu lungimi variabile funcție de mărimea probelor de analizat. Pentru acuratețea rezultatelor după fiecare 5 rânduri (genotipuri) se plantează un soi sensibil ca martor.

Se va aplica tehnologia normală specifică culturii cartofului având drept scop asigurarea unei creșteri normale a plantelor de cartof.

Evaluarea se efectuează în două etape, prima 1 - 15 august și a doua în 1 - 15 septembrie. Se vor examina cu atenție baza tulpinilor, stolonii și tuberculi pentru depistarea tumorilor.

La aprecierea rezistenței sau sensibilității materialului testat se ia în considerație procentul plantelor atacate și gradul de atac, care se apreciază după mărimea tumorilor formate pe tuberculi, baza tulpinii și stoloni.

În ce privește acuratețea rezultatelor obținute la testările în laborator față de cele în câmp părerile sunt împărțite.

Unii cercetători consideră testările în laborator ca fiind mai precise însă majoritatea consideră testările în condiții de câmp ca fiind hotărâtoare.

Dezavantajul testărilor în laborator constă în faptul că plantele sunt expuse la infecție în timp mult mai scurt.

Avantajul testărilor în laborator constă în posibilitatea asigurării condițiilor optime de umiditate și temperatură.

Considerăm că pentru aprecierea corespunzătoare a rezistenței sau sensibilității la agentul patogen a genotipurilor de cartof este necesară folosirea atât a metodelor de laborator cât și a celor de câmp.

Ca noutate la S.C.D.A. Suceava, unde există un laborator acreditat pentru râia neagră s-au inițiat cercetări pentru determinarea rezistenței la acest patogen prin determinarea compoziției chimice privind:

- conținutul de substanță uscată, umiditate, cenușă, aciditate titrabilă, acid ascorbic și amidon;
- conținutul de azot total și proteină brută, activitatea catalizică și activitatea polifenoloxidaze.

Metoda de determinare a rezistenței cartofului la râia neagră produsă de ciuperca *Synchytrium endobioticum* prin analize biochimice, este mai rapidă și mai precisă, care va ușura foarte mult munca de testare a rezistenței la acest patogen prin eliminarea unui volum foarte mare de testări în condiții de câmp prin infecție naturală și în condiții de laborator prin infecție artificială.

Din primele cercetări efectuate, prezintă interes analizele referitoare la conținutul în azot total și proteină brută, activitatea catalazică și activitatea polifenoloxidazei.

În urma rezultatelor putem afirma că genotipurile de cartof prezintă rezistență la *Synchytrium endobioticum* dacă conțin peste 0,9 g azot total / 100 g țesut tubercul, peste 5,6% proteină brută, mai puțin de 1100 unități catalazice și sub 1,70 micromoli acid ascorbic oxidat.

Fiind primele rezultate, este necesară continuarea cercetărilor privind determinarea mecanismului de rezistență la *Synchytrium endobioticum* prin analize biochimice și luarea în calcul a altor analize față de cele menționate.

METODE de detectare și identificare a bacteriei *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* pe probe de tuberculi de cartof fără simptome

Procedura de testare vizează detectarea infecțiilor latente ale tuberculilor de cartof. Orice rezultat pozitiv la cel puțin două teste de depistare, bazate pe principii biologice diferite, trebuie completat cu izolarea organismului patogen, urmată, în caz de izolare a coloniilor caracteristice, de confirmarea unei culturi pure ca fiind *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Rezultatul pozitiv al unui singur test de depistare nu este suficient pentru ca proba să fie considerată suspectă.

Dimensiunea probei standard este de 200 de tuberculi, deși procedura poate fi aplicată și unor probe mai mici, în cazul în care nu se dispune de 200 de tuberculi.

În cazul în care cel puțin două teste bazate pe principii biologice diferite sunt pozitive, trebuie să se efectueze izolarea și confirmarea. Se va realiza cel puțin un test de depistare. În cazul în care testul respectiv este negativ, proba se consideră negativă. În cazul în care testul este pozitiv, trebuie să se efectueze cel puțin un al doilea test de depistare, bazat pe principii biologice diferite, pentru a verifica primul rezultat pozitiv. În cazul în care al doilea test sau următoarele sunt negative, proba este considerată negativă. În acest caz nu este necesară efectuarea altor teste.

Testul de imunofluorescență utilizează întotdeauna un anticorp policlonal, se

poate obține o specificitate mai mare, asociind anticorpului menționat anticorpi monoclonali suplimentari.

Testul reacției de polimerizare în lanț (PCR) utilizează reactivi și protocoale PCR validate în mod corespunzător.

Testul de hibridizare fluorescentă in situ (FISH) utilizează reactivi și protocoale validate.

Izolarea selectivă asociată cu utilizarea unui mediu MTNA sau NCP-88 și a unei diluări la 1/ 100 din sediment resuspendat, izolarea selectivă constituie, în numeroase cazuri, o metodă bună de izolare directă a bacteriei *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus*. Coloniile caracteristice se pot obține într-o perioadă de 3 până la 10 zile de la însămânțare. Atunci este posibil să se efectueze purificarea și identificarea agentului patogen. Pentru a profita din plin de posibilitățile oferite de testul în cauză, trebuie să se pregătească cu grijă conurile de cartof prelevate de la nivelul hilului pentru a evita contaminarea cu bacterii secundare legate de tubercul, care constituie organisme concurente ale bacteriei *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus* pe mediul de cultură și sunt susceptibile de a înlocui agentul patogen menționat. În cazul obținerii unui rezultat eronat la testul de însămânțare, izolarea trebuie efectuată din plantele utilizate pentru testul biologic.

Testul biologic este utilizat pentru izolarea bacteriei *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus* din extractele de cartof, prin îmbogățire selectivă în plante de vinete (*Solanum melongena*). Sunt necesare condiții optime de incubare, în conformitate cu specificațiile procedurii în cauză. Bacteriile care au efect inhibitor asupra bacteriei *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus* în prezenta unui mediu MTNA sau NCP-88 nu riscă să afecteze desfășurarea testului menționat.

Activitatea 2.2: Testarea unor soiuri / linii de cartof pentru stabilirea toleranței la organismele de carantină fitosanitară

În anul 2020 au fost supuse procesului de analiză a rezistenței la infecția cu râia neagră (*Synchytrium endobioticum*) un număr de 79 genotipuri nou create (linii de ameliorare) în cadrul programelor de ameliorare la cultura cartofului din S.C.D.A. Suceava, S.C.D.C. Târgu Secuiesc și I.N.C.D.C.S.Z. Brașov (tabelul 1).

În sola infestată cu agentul patogen *Synchytrium endobioticum* au fost plantate cele 79 de linii de cartof în blocuri, câte un rând cu 20 plante din fiecare genotip. La fiecare 5 rânduri s-a plantat câte un genotip sensibil la râia neagră, folosit ca martor.

În timpul vegetației s-a aplicat tehnologia specifică culturii cartofului.

După efectuarea bonității materialului genetic (luna septembrie) s-a constatat că din cele 79 genotipuri analizate, 33 (41%) au manifestat reacție de sensibilitate la patogen. Pentru a da un calificativ final cu privire la rezistența la patogen se impune ca genotipurile care s-au manifestat ca rezistente să fie testate încă două cicluri de vegetație sub presiunea agentului patogen.

Se impune aprofundarea cercetărilor având în vedere faptul că în experiențe soiul *Santé* declarat ca rezistent la râia neagră s-a manifestat foarte sensibil.

Testarea soiurilor de cartof cu privire la reacția față de infecția cu *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus* (putregaiul inelar)

În anul 2020 au fost prelevate pentru testare la Laboratorul Național Fitosanitar București un număr de 42 probe din 7 soiuri de cartof cultivate pe o suprafață de 21 ha pentru producere de sămânță. Toate probele prelevate au fost negative.

Activitatea 2.3: Monitorizarea și identificarea suprafețelor afectate de atacul nematozilor din genul *Ditylenchus*, la nivel de plantă și în depozit. Analize de laborator, determinări, înregistrare date pedoclimatice

Pentru stabilirea rezistenței la *Ditylenchus destructor* a fost monitorizată simptomatologia externă și internă a tuberculilor de cartof prelevați din diferite locații.

Au fost efectuate observații și analize în câmp și în laborator.

S-a evidențiat importanța calității fitosanitare a materialului de plantat (o parte din el din import). Majoritatea producătorilor de cartof pentru sămânță fiind informați și conștienți de riscul infestărilor nedetectate în perioada de vegetație și de depozitare a cartofului și sunt dispuși la colaborare pentru a împiedica apariția acestor dăunători de carantină

Niciunul dintre soiurile supuse analizei în perioada de vegetație nu a prezentat simptome externe specifice atacului cu nematozi.

Alte fenomene (puire, încolțire, inverzire) au fost observate în proporții variabile în funcție de soiurile studiate.

De asemenea a fost observat atacul unor boli și dăunători care nu sunt de carantină.

6. Rezultate, stadiul realizării obiectivului, concluzii și propuneri pentru continuarea proiectului:

- ✓ În cadrul Fazei II / 29.10.2020 au fost executate integral activitățile prevăzute în planul de realizare și avizate prin procesele verbale de avizare internă.
- ✓ În laboratorul de la Pojorâta, acreditat pentru testarea toleranței tuberculilor la râia neagră (*Synchytrium endobioticum*) au fost testate un număr de 79 linii și soiuri de cartof.
- ✓ Scurtarea perioadei de determinare a rezistenței la râia neagră reprezintă o noutate la nivel național și se realizează prin determinări biochimice din pulpa de cartof.
- ✓ Au fost prelevate pentru testare la Laboratorul Național Fitosanitar București un număr de 42 probe din 7 soiuri de cartof cultivate pe o suprafață de 21 ha pentru producere de sămânță, toate probele fiind negative.

Nr. crt.	Denumire soi	Suprafața cultivată (ha)	Nr. probe prelevate	Rezultat test
1	Redsec	2	4	Negativ
2	Nemere	1	2	Negativ
3	Gared	2	4	Negativ
4	Red Lady	6	12	Negativ
5	Riviera E	2	4	Negativ
6	Riviera Cl. B	6	12	Negativ
7	Ultra	2	4	Negativ
	TOTAL	21	42	

- ✓ Pentru stabilirea rezistenței la *Ditylenchus destructor* a fost monitorizată simptomatologia externă și internă a tuberculilor de cartof prelevați din diferite locații.
- ✓ Au fost efectuate observații și analize în câmp și în laborator.
- ✓ S-a evidențiat importanța calității fitosanitare a materialului de plantat (o parte din el din import). Majoritatea producătorilor de cartof pentru sămânță fiind informați și conștienți de riscul infestărilor nedetectate în perioada de vegetație și de depozitare a cartofului și sunt dispuși la colaborare pentru a împiedica apariția acestor dăunători de carantină