

PSEUDOMONAS FLUORESCENS
COMBATAREA NEMATODULUI *DITYLENCHUS DESTRUCTOR* LA
CARTOFII SEMINCERI

**Melnic Maria, Erhan Dumitru, Rusu Ștefan, Onofraș Leonid¹,
 Todiraș Vasili¹**

Institutul de Zoologie

¹ *Institutul de Microbiologie și Biotehnologie*

Rezumat

În experiențe vegetative a fost testată eficacitatea tulpinii de bacterii *Pseudomonas fluorescens* CNM-PFB-01 din Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene, utilizată în combaterea nematodului *Ditylenchus destructor* la cartofii seminceri de soi *Irga*, infestați în primele faze (1, 2) de ditilenhoză. A fost utilizat lichidul cultural al bacteriilor cu titru de circa 10⁹ cel./ml, care a fost diluat în proporție de 1:300. Timpul expunerii a constituit 20 de ore. S-a observat că, în fenofaza răsărire-îmbobocire, plantele de pe lotul V1 (cartofi infestați și tratați) s-au dezvoltat normal, la nivelul lotului M2 (cartofi neinfestați și netratați). Recolta obținută în V1 a fost de 1,7 ori mai mare decât în M2, iar invazia cu *D.destructor* a descrescut semnificativ comparativ cu cea semnalată în lotul martor M1 (infestat și netratat).

Cuvinte cheie: *Pseudomonas fluorescens* CNM-PFB-01, *Ditylenchus destructor*, control biologic, cartofi

Depus la redacție 04 decembrie 2019

Adresa pentru corespondență: Rusu Ștefan, Institutul de Zoologie, str.Academiei,1, MD 2028 Chișinău, Republica Moldova; tel.(+373022) 737511, e-mail: rusus1974@yahoo.com

Introducere

Actualmente, în majoritatea țărilor (Marea Britanie, Germania, Franța, SUA, Federația Rusă etc.), sunt elaborate și utilizate biopreparate nematocide pe bază de fungi prădători și bacterii patogene din genurile *Arthrobotrys*, *Paecilomyces*, *Pasteuria*, *Pseudomonas* în combaterea speciilor parazite de nematode. Sunt selectate biopreparatele care stopează dezvoltarea nematodelor parazite și, totodată, stimulează imunitatea plantelor-gază [1; 2].

Utilizarea biopreparatelor cu scopul combaterii nematodelor parazite este una dintre cele mai de perspectivă metode de protecție a culturilor agricole, inclusiv de tratare a materialului semincer, care stimulează mecanismele de protecție/rezistență a plantelor, nefiind toxice pentru dezvoltarea acestora și având un efect pozitiv asupra productivității lor.

Pseudomonadele, printre care *P. fluorescens*, sintetizează pigmenți siderofori (compuși ce conțin fier), printre care pseudobactina –A (pigment fluorescent galben-

verde), care au un rol imens în stoparea dezvoltării agenților patogeni. Aceștea exercită antagonism asupra microflorei dăunătoare pentru sistemul radicular al plantelor agricole- *Fusarium*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Verticillium* [9; 14].

Prin cercetări multianuale efectuate în condiții in vitro și in vivo, a fost testată eficacitatea nematocidă a 8 tulpini de bacterii din genul *Pseudomonas* – *P. sp. 3RPG*, *P. sp. 4RPG*, *P. sp. 1RRă*, *P. sp. 4RBN*, *P.sp. 5RBN*, *P. sp. 2RȘB*, *P.sp. 3RȘB* și *P. fluorescens*, în contact cu 2 specii de nematode parazite din genul *Ditylenchus* – *D. dipsaci* și *D. destructor* [4; 5; 6; 7; 8]. Studiul efectuat a pus în evidență 4 tulpini de bacterii - *4 RBN*, *2RȘB*, *3RȘB* și *P. fluorescens*, care au provocat mortalitatea *D. destructor* în proporție de 72,5-98,0% doar în timp de 4 ore. Un deosebit interes îl prezintă specia *P. fluorescens*, care s-a evidențiat prin eficacitate nematocidă sporită- 95-100 %, după 24-48 de ore de contact. Rezultatele obținute in vitro de către unii autori au demonstrat, de asemenea, că *Pseudomonas fluorescens*, *P. aeruginosa*, *Bacillus thuringiensis*, la o expunere de 72 de ore, provoacă mortalitatea larvelor de *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* în 100 % de cazuri [1; 10].

Scopul lucrării a fost de a testa eficacitatea lichidului cultural *P.fluorescens* în contact cu soiul de cartof semincer *Irga*, infestat cu *D.destructor* în primele faze (1, 2) de ditilenhoză.

Material și metode

În anul 2017 au fost efectuate experiențe vegetative de combatere a *D.destructor* din cartofii seminceri de soi *Irga* infestați în primele faze de ditilenhoză (1, 2) cu aplicarea bacteriei *P. fluorescens*. La selectarea tuberculilor de cartofi incluși în experimente s-a ținut cont că soiul *Irga* se caracterizează prin susceptibilitate sporită față de nematoda *D.destructor* [3].

Tuberculii selectați au fost sistematizați în felul următor: infestați pentru a fi tratați, infestați fără tratare, liberi de nematode.

Pentru tratare a fost utilizat lichidul cultural *Pseudomonas fluorescens* CNM-PFB-01 cu titru de circa 10^9 cel./ml, care a fost diluat în proporție de 1:300. Experiențele au avut loc după schema:

- matorul M1– cartofi seminceri *Irga* infestați, fără tratare;
- matorul M2 – cartofi liberi de nematode, fără tratare;
- varianta experimentală V1 – cartofi *Irga* infestați cu *D.destructor*, care au fost tratați prin îmbăiere cu lichid cultural diluat al bacteriilor *P. fluorescens* timp de 20 de ore, iar după aceea zvântați prin aerisire.

Cartofii au fost plantați câte unul în fiecare ghiveci (total fiind 40 ghiveciuri - câte 10 în fiecare lot), cu sol liber de nematode. În perioada de vegetație s-au efectuat cercetări fenologice, în scopul evaluării fitotoxicității preparatului.

Extragerea nematodelor a fost efectuată cu aplicarea metodei pâlniilor Baermann, modificată de Nesterov [13]. Pragul de invazie a recoltelor obținute a fost calculat după Ivaniuc, Iliășenco [11].

Rezultate și discuții

Avantajul combaterii biologice se exprimă prin eliminarea riscurilor poluării mediului, cu o multitudine de consecințe negative directe și indirecte (toxicitate pentru om, animale, reziduuri în apă, sol, produse agricole). Mijloacele biologice și agenții entomofagi sunt inofensivi față de fauna utilă, sunt foarte selective, dar au dezavantajul

de a avea o eficiență mai redusă comparativ cu produsele chimice, deoarece sunt mai dificil de aplicat și de produs. Cu toate acestea, produsele microbiologice au progresat substanțial în ultimul timp. Unii autori menționează că agricultura secolului XXI va trebui să reconsidere combaterea biologică, parte componentă a controlului integrat al dăunătorilor, ca alternativă viabilă la chimizarea excesivă [2].

Rezultatele, obținute în cadrul experiențelor, au demonstrat că dezvoltarea plantelor în V1 este normală, la nivelul M2, cartofii sunt sănătoși, iar înălțimea plantelor este puțin mai mare decât cea a plantelor din M2 – cu 4,1 cm, și cu mult mai mare decât a plantelor din M1 – cu 27,7cm (aproximativ de 2 ori) (tab. 1, fig. 1). Numărul de lăstari/plantă în V1 a constituit în medie 4 lăstari, ca și în cazul M2 (material semincer sănătos), fiind de 2 ori mai mare decât în M1 (2-3 lăstari/plantă). Recolta obținută a cartofilor în V1 a constituit 91,7% din cea obținută în M2. În comparație – recolta obținută în M1 a constituit doar 55,1% din M2 (fig. 2). Procentul de invazie (P, %) cu *D.destructor* a constituit 8,2% la recolta cartofilor în V1, fiind apreciat cu balul 2 (cartofi slab infestați), iar la recolta M1 invazia a fost cu mult mai mare – 25,5%, fiind apreciată cu balul 3 (cartofi moderat infestați).

Datele obținute denotă, că lichidul cultural al *P. fluorescens* posedă nu numai acțiune nematocidă, dar și de sporire-activare a dezvoltării plantelor de cartofi în perioada de vegetație, ceea ce s-a reflectat pozitiv asupra recoltelor de cartofi de soiul Irga. Este important de menționat, că *P. fluorescens* posedă, paralel, activitate fungicidă, în special, asupra speciilor patogene de *Fusarium* (*F. sambucinum*, *F. oxysporum*) și *Verticillium*, care provoacă boli grave la cultura cartofului.

O activitate sporită a speciei *P. fluorescens* (tulpina AR-33) a fost observată și asupra unor specii de nematode ectoparazite de rădăcină la cultura cartofului din genul *Trichodorus*, [12]. În Federația Rusă au fost izolate 2 tulpini ale bacteriilor antagoniste, care exercită activitate nematocidă – *P. fluorescens* (AR-33 și 163).

Tabelul 1. Rezultatele testării influenței lichidului cultural *P. fluorescens* asupra cartofilor seminceri de soi Irga infestați cu *D. destructor*.

Varianta	Nr de exemplare în lot/nivelul invaziei	Data plantării	Răsărire-îmbobocire			Recoltare				
			Data măsurărilor	h, cm	n – lăstari/plantă	Data recoltării	Recolta, g/plantă	% din M2	Invazie P, %	Balul de apreciere
V1	10/slab infestat	25.02.17	24.04.17	61,4	4	21.05.17	402,6	91,7	8,2	2
M1	10/moderat infestat	25.02.17	24.04.17	33,7	2-3	21.05.17	241,6	55,1	25,5	3
M2	10/neinfestat	25.02.17	24.04.17	57,3	4	21.05.17	438,9	-	-	-

Rezultatele obținute demonstrează posibilitatea utilizării tulpinii biologice de bacterii antagoniste *Pseudomonas fluorescens* CNM-PFB-01 în elaborarea preparatelor cu acțiune nematocidă de înaltă eficiență.



Figura 1. Cultura cartofului de soi *Irga*: plante obținute dintr-un tubercul-mamă infestat cu *D. destructor*, în fenofazele plantare- tuberizare, care a fost tratat înainte de plantare cu *P. fluorescens* (A), în comparație cu M1 - cartof infestat fără tratare (B).



Figura 2. Recolta de cartofi obținută în condiții de laborator: V1 – prin tratare înainte de plantare cu *P. fluorescens* (A, C), M1–varianta infestată și netratată (B, D).

Concluzii

1. Lichidul cultural al tulpinii de bacterii *Pseudomonas fluorescens* CNM-PFB-01 luat în diluție de 1:300 cu timpul expunerii 20 de ore, nu exercită toxicitate asupra plantelor de cartofi. Acestea se dezvoltă normal, la nivelul plantelor de cartofi sănătoși (neinfestați și netratați), au o înălțime cu 4,1 cm mai mare decât cea a plantelor din M2 și cu 27,7 cm mai mare decât cea a plantele M1.

2. În V1 recolta este mai înaltă decât în M1 de 1,7 ori, iar invazia cu *D. destructor* s-a diminuat semnificativ.

3. Tulpina de bacterii *Pseudomonas fluorescens* CNM-PFB-01 este de perspectivă în elaborarea preparatelor biologice cu acțiune nematocidă, de înaltă eficiență.

Referințe

1. *Ashoub A.H., Amara M.T.* (2010). Biocontrol activity of some bacterial genera against root-knot nematode *Meloidogyne incognita* //Journal of American Science 6 (10): 321-328.
2. *Donescu D.* Cartoful în România. 2011.V.20, nr.1-2, p.43-48.
3. *Melnic M., Erhan D., Rusu Ș.* Testarea susceptibilității unor soiuri de cartofi către speciile de nematode *D.destructor* și *D.dipsaci*//Studia Universitatis Moldaviae, 2018, nr.1 (111),seria „Științe reale ale naturii”. ISSN 1814-3237 ISSN online 1857-498X p.76-81.
4. *Melnic M., Erhan D., Rusu S., Onofraș L., Todiraș V., Lungu A.* Pseudomonas with nematocidal effect //XII Международный симпозиум Российского общества нематологов «Нематоды и другие линяющие организмы (*Ecdysozoa*) в процессах возрастающего антропогенного воздействия на экосистемы». Нижний Новгород, 31 июля-6 августа, 2017 г. Издательство Нижегородского госуниверситета,-с.56. ISBN 978-5-91326-407-7.
5. *Melnic M., Erhan D., Rusu Ș., Onofraș L., Todiraș V.* PGPR Bacteria in the perspective of the biological control use//„Actual problems of protection and sustainable use of the animal world diversiy”, intern. conf. of zoologists(8; 2013; Chisinau): 8-th Intern. Conf. of Zoologists, 10-12 oct.2013: Book of Abstract /red.board Toderaș Ion (chief. red.), [et al.]. - Chisunau: S.n., 2013 (Tipogr. „Elan Poligraf”), -p.147-148. ISBN 978-9975-66-361-8.
6. *Melnic M., Rusu Ș., Erhan D., Onofraș L., Todiraș V., Slanina V.* Procedeu de tratare a cartofului contra nematodei *Ditylenchus destructor*. – Brevet de invenție. Patent nr.719. Hotărâre nr.7683 din 25.11.2013.
7. *Melnic M., Toderaș I., Erhan D., Rusu Ș., Onofraș L., Todiraș V.* Metode de combatere și profilaxie a nematodelor parazite la cultura cartofului: Recomandări practice. – Chișinău : I.E.P Știința, 2014 (Tipografia „BALACRON” SRL), -40 p.ISBN 978-9975-67-919-0. 101.
8. *Melnic M., Rusu Ș., Onofraș L., Todiraș V.* Studiul impactului dintre unele tulpini de microorganismе și fitonematode// Diversitatea, valorificarea rațională și protecția lumii animale. Simpozion internațional consacrat aniversării de 70 de ani a profesorului universitar Andrei Munteanu. Chișinău:I.E.P.”Știința”,2009,-p.206-208. ISBN 978-9975-67-611-3.
9. *Onofraș L., Todiraș V., Prisacari S., Melnic M., Rusu Ș.* Microorganismе de rizosferă cu rol stimulator și protector față de plante//Mater.simpoz. internațional „Protecția plantelor – probleme și perspective”, Chișinău:Prim-Caro, 2012, -p.308-311. ISBN 978-9975-56-069-6.
10. *Siddiqui I.A. and Shaukat S.S.* (2002). Rhizobacteria – mediated induction of systemic rezistance (ISR) in tomato against *Meloidogyne javanica*//Phytopathology 150,469-473.
11. *Иванюк В.Г., Ильяшенко Д.А.* Устойчивость картофеля к стеблевой нематодe (*Ditylenchus destructor* Thorne) //Весці нацыянальнай Акадeмii навук Беларусі. 2010, № 3, с.43-48.
12. *Козырева Н.И.* Нематоды семейства Trichodoridae и их роль в распространении вирусных болезней на картофеле в Московской области . - Автореферат диссертации канд. биол. наук. Москва, 2008. -40 С.
13. *Нестеров П.И.* Фитопаразитические нематоды запада СССР. Кишинев: Штиинца. 1979-313 С.
14. *Романенко Н.Д., Попов И.О., Таболин С.Б., Бугаева Е.Н., Заец В.Г.* Перспективы использования бактерий-антагонистов против наиболее фитопатогенных видов нематод, вирусов и грибов. Агро ХХ1, №1-3, Москва:Агрорус, 2008, с.23-27.