

TESTAREA UNUI PREPARAT PE BAZĂ DE *Bacillus subtilis* PENTRU PROTECȚIA GRÂULUI DE TOAMNĂ DE PATOGENI

Șcerbacova Tatiana*, <https://orcid.org/0000-0002-2632-325>

Lungu Andrei, <https://orcid.org/0000-0002-5024-5765>

Pînzaru Boris <https://orcid.org/0000-0001-7323-4770>

Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor, USM, Chișinău, Republica Moldova

*e-mail: tatiana.scerbacova@sti.usm.md

Summary. The results of the testing of the biological fungicide based on the bacteria *Bacillus subtilis*, strain IAB/BS03 to protect the winter wheat variety Moldova-614 from the complex of pathogens in the conditions of the Republic of Moldova. The research was carried out on the experimental field of the IGFP of MSU. Two preparation rates of consumption were tested: 2 kg/ha and 3 kg/ha. Used once by the spraying method. As a result, the biological efficiency against *Bipolaris sorokiniana* was 75,0% and 90,0%, *Helminthosporium sativum* – 83,3% and 89,7%, respectively, fusarium head blight – 86,0%.

Keywords: testing, pathogen complex, *Bacillus subtilis*, winter wheat, biological efficacy.

Introducere

În multe state cultura cerealică principală este grâul (*Tríticum L.*). Este crescut pe arii întinse pe întreg globul, ocupă locul doi după mărimea suprafețelor însămânțate, cedând întâietatea porumbului. Per total în anul 2021 au fost însămânțate 221,96 milioane hectare cu această cultură, obținându-se o roadă record de 770,8 milioane tone. Lideri mondiali a producției sunt China și India, care în anul 2021 au avut o producție globală de 136,9 și 109,6 milioane tone corespunzător.

Liderii mondiali la recolta per unitate de suprafață sunt: Germania - 7,53 t/ha, Franța - 6,8 t/ha, Egiptul - 6,4 t/ha, China- 5,7 t/ha [1].

În Republica Moldova suprafața însămânțată cu grâu a variat de la 301,8 – 373,1 mii ha, sau 20,9 %- 24,2% din suprafața totală însămânțată cu culturi agricole. Producția globală a fost de 794 mii tone în anul 2011 până la 1 milion 565,2 mii tone în anul 2021. Recolta per unitatea de suprafață la grâu în Moldova în gospodăriile de toate categoriile variază de la 2,6 t/ha în 2015 la 4,6 t/ha în 2021 [2].

Grâul este considerată o cultură agricolă nepretențioasă, dar preferă clima temperat continentală, destul de caldă. În regiunile prea calde recoltele sunt scăzute. Este necesară și respectarea rotației culturilor, succesiunea culturilor permite satisfacerea necesităților plantelor în substanțe nutritive fără a istovi solul. Cel mai favorabil este semănarea grâului după leguminoase, trifoi, lucernă și rapiță.

Recolta globală a grâului boabe depinde de o multitudine de factori, inclusiv competitivitatea soiului, condiții meteorologice în perioada de vegetație, compoziția solului, procedeele agrotehnice, măsurile de protecție fitopatologică, etc. Pierderi substanțiale sunt provocate de infectarea plantelor cu microorganisme fitopatogene. În regiunile de cultivarea a grâului sunt pe larg răspândite putregaiurile radiculare, făinarea, pătririle frunzelor, fuzarioza spicului, etc. Patogenii pot ataca plantele pe parcursul întregii perioade de vegetație [3]. Protecția plantelor de agenții patogeni este rezerva principală de creștere a productivității și calității recoltei.

Bolile culturilor rămân o provocare majoră în agricultură și o amenințare continuă la adresa securității alimentare. Deși fungicidele sunt utilizate pe scară largă în lumea dezvoltată și rezistența genetică este dezvoltată oriunde este posibil, bolile culturilor provoacă anual o pierdere medie globală de 16 % [4].

Unul din aceștia este agentul patogen *Bipolaris sorokiniana* poate infecta toate organele plantei: sistemul radicular – provocând putregaiul obișnuit al rădăcinilor, frunzele și tulpina provocând pătarea brună închisă (helminthosporioza), la fel spicul și boabele provocând ”înnegrirea embrionului”. Infecția primară apare la germenii și lăstari, se manifestă prin brunificarea coleoptilului, îngălbenirea și deformarea frunzelor, inhibarea întregii plante. La plantele mature se

observă următoarele simptome: brunificare, înnegrirea și putrezirea rădăcinilor principale și secundare, nodului de înfrățire și tulpinii în apropierea solului.

Infectarea secundară are loc pe organele supratereștre. Pe frunze apar pete de culoare brun deschis, alungite de-a lungul limbului foliar, cu marginea întunecată. Plantele întârzie în creștere, se observă decolorarea spicelor, devin albi și moartea tulpinilor. [3]

Pentru protejarea culturii grâului de complexul de agenți patogeni sunt utilizate o varietate largă de biopreparate inclusiv în baza bacteriei *Bacillus subtilis*. Genul *Bacillus* cuprinde o mare biodiversitate genetică. Bacilii sunt prezenți într-o paletă extrem de mare de medii variind de la apa de mare la sol, și chiar se găsesc în medii extreme precum izvoarele termale. Această bacterie ar putea fi una dintre sursele majore de potențiale biopreparate microbiene, deoarece păstrează mai multe trăsături valoroase. În primul rând, bacilii, cum ar fi *B. subtilis*, sunt organisme bine studiate ceea ce facilitează utilizarea lor rațională. În al doilea rând, Administrația pentru alimente și medicamente din SUA (USFDA) a acordat statutul de „în general considerat sigur” (GRAS). *Bacillus subtilis* care este astfel recunoscut ca nepatogen. Acesta fiind motivul principal pentru a fi utilizat ca biopesticid. În al treilea rând, bacilii au capacitatea pentru a produce spori care sunt forme de repaus extrem de rezistente. Sporii sunt capabili să reziste la temperaturi ridicate, pH nefavorabil, lipsă de nutrienți sau apă etc. Sunt produși de bacterii atunci când condițiile de mediu sunt nefavorabile care probabil ajută aceste microorganisme să supraviețuiască în fitosferă. Fenomenul poate fi exploatat și în producția industrială deoarece sporularea poate fi indusă la sfârșitul cultivării. Acest lucru facilitează foarte mult condiționarea post-cultură unde suspensiile bacteriene pot fi transformate în formulări de pulbere ușor de manevrat, fără pierderea viabilității culturii, ceea ce mai rar la speciile ce nu formează spori. Perioada de valabilitate a biopreparatelor pe bază de bacterii sporulante este în general mai lungă și necesită mai puțin precauție de depozitare în comparație cu alte produse care conțin organisme vii. Bacilii sunt de asemenea relativ ușor de produs industrial întrucât nu sunt deosebit de exigenți în ceea ce privește sursele nutritive. Pe lângă capacitatea de a forma spori, *B. subtilis* posedă mai multe caracteristici care îi sporesc supraviețuirea în rizosferă astfel crește și eficiența ca biopreparat. Această bacterie este cunoscută că este aerobă, dar se pot comporta, de asemenea, ca anaerob facultativ supraviețuind și evoluând în condiții cu concentrația de oxigen scăzută [5]. Cercetările intensive au indicat că efectele *B. subtilis* asupra inhibării agenților patogeni a plantelor sunt atribuibile antibiozei, competiției pentru habitat și nutrienți, liză a hifelor microorganismelor patogene și a rezistenței sistemice induse [6]. Bacteriile produc, de asemenea, enzimele ce degradează peretele celular și diverși metaboliți care pot limita creșterea sau activitatea altor microorganisme [7].

În plus, *B. subtilis* crește absorbția azotului, solubilizarea fosfaților și producerea de siderofori și fitohormoni, promovează creșterea plantelor [6].

Scopul cercetării – determinarea eficacității biologice a biofungicidului pe bază de *Bacillus subtilis*, sușa IAB/BS03 în protejarea grâului de toamnă de un complex de agenți patogeni în condițiile Republicii Moldova.

Materiale și metode

Cercetările au fost efectuate în anul 2022 pe câmpurile experimentale a Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor al USM. Obiectul cercetării a fungicidul biologic pe bază de bacteriei *Bacillus subtilis*, sușa IAB/BS03. Fungicidul a fost utilizat pentru protecția grâului de toamnă, soiul Moldova-614 de complexul de agenți patogeni: 1- putregaiul obișnuit al rădăcinilor- ag. pat. *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker – anamorf, *Cochliobolus sativus* (S.Ito et Kurib.) Drechsler ex Dastur (1942) - teleomorf; 2 – helmintosporioza - *Helminthosporium sativum* Pammel, C.M. King et Bakke 1910 (syn. *Bipolaris sorokiniana*); 3 – făinarea – *Blumeria graminis* (syn. *Erysiphe graminis*) (DC.) Speer; 4 – fuzarioza spicului – ciuperci din genul *Fusarium* Link.: *Fusarium graminearum* Schwabe; *Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc.; *Fusarium culmorum* (W.G.Sm.) Sacc.; *Fusarium poae* (Peck) Wollenw.; *Fusarium sporotrichioides* Sherb.

Încorporarea semințelor a fost efectuată la 27 septembrie 2021. Pichetarea variantelor a fost efectuată în luna aprilie 2022, fiecare variantă a fost montată în 3 repetiții. Suprafața unei repetiții a

fost de 25 m² (1m×25m). Variantele au fost amplasate randomizat pe întreaga suprafață a lotului experimental.

În schema experimentală au fost 4 variante: 1) martor- fără prelucrare, 2) etalonul- Fitocid, fungicid biologic, substanța activă *Bacillus subtilis*, titrul 1 x 10⁹ celule/ml, norma de consum 1l/ha, 3) preparatul testat, norma de consum 2 kg/ha, 4) preparatul testat, norma de consum 3 kg/ha

Prelucrarea a fost efectuată cu stropitoarea de tip rucsac, la o rată de 600 l/ha a soluției de lucru. Determinarea eficacității preparatelor a fost efectuată conform metodelor general acceptate (Îndrumări metodice pentru testarea produselor chimice și biologice de protecție a plantelor de dăunători, boli și buruieni în Republica Moldova) [8].

Pentru determinarea eficacității biologice a preparatului testat față de putregaiul obișnuit al rădăcinilor, helmintosporiozei, făinării au fost selectate probe a câte 10 plante în 3 repetiții din fiecare variantă experimentală. Intensitatea atacului sistemului radicular a fost efectuată după scara de 4 puncte, pățările frunzelor după scara procentuală. Pentru determinarea atacului fuzariozei spicului au fost examinate câte 100 de spice în 3 repetiții, evaluarea a fost efectuată conform scării procentuale.

Prelucrarea matematică a rezultatelor obținute a fost efectuată analizei dispersională monofactorială cu utilizarea platformei ABC Pascal.

Rezultate și discuții

Din perioada de însămânțare a grâului de toamnă din septembrie 2021 și până la recoltarea în prima decadă a lunii iulie 2022, condițiile meteorologice au fost critic nefavorabile pentru cultivarea acestei culturi din cauza unei secete foarte severe și prelungite. Pe toată perioada de la însămânțare până la recoltare, un total de 208 mm de precipitații au căzut față de norma de 439 mm, ceea ce a constituit doar 47,4%. Deficitul de umiditate a fost de 52,6%, ceea ce reprezintă o problemă reală de pierdere a recoltei culturilor de cereale [9].

Seceta foarte severă se manifestă în anii în care precipitațiile din perioada de vegetație sunt mai mici de 50% din normă, iar temperatura medie a aerului depășește norma multianuală cu 3-4°C. Lipsa precipitațiilor poate apărea în orice lună a anului, astfel încât seceta poate apărea în orice moment al anului cu consecințe corespunzătoare pentru sectorul agricol. Adică se poate vorbi despre secetă de iarnă, primăvară, vară și toamnă cu consecințe diferite, în funcție de stadiul de dezvoltare a culturii. În Republica Moldova, secetele reprezintă 12,5% din numărul total al tuturor fenomenelor periculoase [10].

Până la efectuarea tratamentului cu preparatul testat în perioada 25-37 BBCH (înfrățirea-apariția frunzei standard) s-au prelevat probe în diferite puncte ale câmpului experimental pentru a determina în general infestarea plantelor cu agenții patogeni specificați - 10 probe a câte 10 plante fiecare. Pentru evidența putregaiului obișnuit al rădăcinilor au fost examinate 100 de tulpini, pentru evidența helmintosporiozei și făinării au fost examinate 300 de frunze. În baza rezultatelor evidențelor, s-a constatat că din cauza secetei care s-a instalat în perioada toamnă-iarnă, dezvoltarea putregaiului obișnuit al rădăcinilor a fost scăzută: intensitatea răspândirii bolii a fost de 20%, gradul de dezvoltare a fost 7,5% (tabelul 1).

Tabelul 1

Atacul plantelor de grâu de către agenții patogeni pe lotul experimental până la efectuarea tratamentului

Agentul patogen	Frecvența atacului, %	Intensitatea dezvoltării bolii, %
<i>Bipolaris sorokiniana</i> pe rădăcini	20,0	7,5
<i>Helminthosporium sativum</i> pe frunze	5,0	1,7
<i>Blumeria graminis</i>	0	0

Frecvența atacului de helmintosporioză a fost 5 %, dezvoltarea bolii - 1,7%. În fazele de dezvoltare 25-37 BBCH nu s-a depistat prezența atacului făinării. Tratamentul cu preparatul testat a fost efectuată la data de 10 mai. Preparatul a fost utilizat cu două norme de consum: 2 kg/ha și 3

kg/ha. După o lună s-au efectuat evidențele, la etapele de dezvoltare 75-80 BBCH- maturitatea în lapte.

Conform datelor obținute în urma evidenței reiese că pe parcursul unei luni de vegetație de la prima evidență frecvența atacului putregaiului obișnuit al rădăcinilor de la 20 % a crescut la 30%, iar intensitatea dezvoltării bolii de la 7,5 % a ajuns la 10 %. Biopreparatul utilizat a redus acești parametri. La utilizarea normei de consum 2 l/ha frecvența atacului a fost 10,0 %, la o intensitate a dezvoltării bolii de 1,0 %. Eficacitatea biologică constituind 75,0 %. La utilizarea biofungicidului cu norma de consum 3 kg/ha frecvența atacului a atins nivelul de 10,0 %, iar intensitatea dezvoltării bolii- 1,0 %. Eficacitatea biologică a fost de 90,0 %. La utilizarea etalonului Fitocid frecvența atacului a fost de 16,7 %, cu o intensitate a dezvoltării bolii de 2,7 % cu o eficacitate biologică de 73,0 % (tab. 2, fig.1).

Tabelul 2

Eficacitatea biologică a fungicidului în baza bacteriilor *Bacillus subtilis* în protecția grâului de toamnă de putregaiul obișnuit al rădăcinilor (*Bipolaris sorokiniana*)

Nr.	Variante experimentale	Norma de consum l, kg/ha	Frecvența atacului, %	Intensitatea dezvoltării bolii, %	Eficacitatea biologică, %
1	Martor	-	30,0	10,0	-
2	Etalon Fitocid	1,0	16,7	2,7	73,0
3	Preparatul testat	2,0	10,0	2,5	75,0
4	Preparatul testat	3,0	10,0	1,0	90,0
DEM _{0,05}			19,7	6,1	

Pentru determinarea acțiunii preparatului în diminuarea dezvoltării helmitosporiozei, în fiecare probă de 10 plante a fost luat în calcul atacul fiecărei frunze (tab. 3).

Tabelul 3

Evidența helmitosporiozei la grâul de toamnă după tratament cu fungicide

Varianta, nr. probei	Numărul frunzelor în probă, buc	Scala atacului, %;							
		Numărul frunzelor atacate							
		0	1	5	10	25	50	75	100
Martor									
1	22	11	5	2	-	1	-	3	-
2	20	13	-	4	2	-	1	-	-
3	29	13	-	2	5	6	3	-	-
Etalon Fitocid									
1	21	12	-	6	2	1	-	-	-
2	20	11	7	2	-	-	-	-	-
3	21	14	5	2	-	-	-	-	-
Preparatul testat, 2 kg/ha									
1	20	13	4	1	2	-	-	-	-
2	23	16	2	2	3	-	-	-	-
3	26	23	-	1	1	1	-	-	-
Preparatul testat, 3 kg/ha									
1	22	19	-	2	1	-	-	-	-
2	20	14	3	2	1	-	-	-	-
3	24	19	2	2	1	-	-	-	-

Din evidențele efectuate s-a constatat că în decurs de o lună frecvența helmitosporiozei a crescut semnificativ, iar la martor această cifră a fost de 46,7%. Intensitatea dezvoltării bolii a crescut la 9,6%.

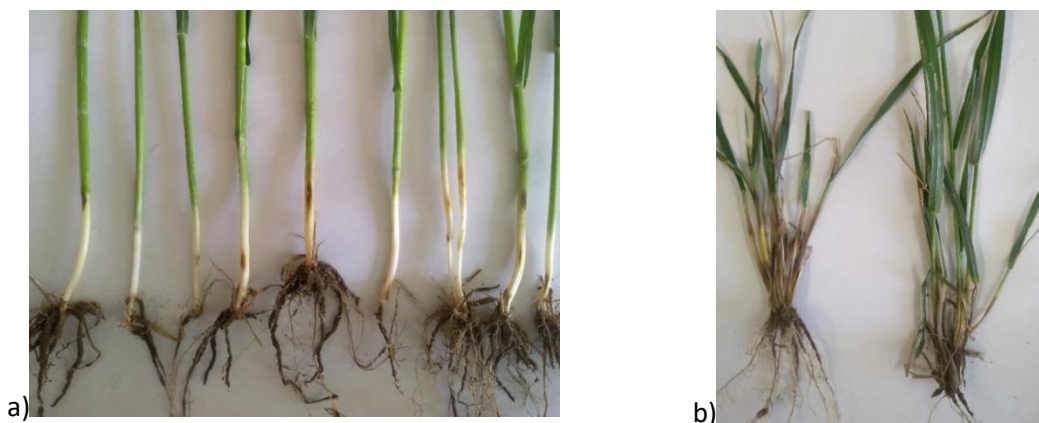


Figura 1. Plante de grâu afectate de putregaiul obișnuit al rădăcinilor
a) până la tratament faza 25-37 BBCH, rădăcini slab afectate de putregai
b) varianta martor după tratament- atacul rădăcinilor cu uscarea tulpinilor

La prelucrarea grâului cu fungicidul testat la norma de consum 2 kg/ha a fost înregistrată o frecvență a atacului de 25,6 % la o intensitate a dezvoltării bolii de 1,6 %. Eficacitatea biologică fiind de 83,3 %. La utilizarea normei de consum 3 kg/ha frecvența atacului helmintosporiozei a fost 21,5 %, intensitatea dezvoltării bolii 0,99 %. Eficacitate biologică fiind de 89,7 % (tab.4).

Tabelul 4

Eficacitatea biologică a biofungicidului testat în protecția grâului de toamnă de helmintosporioză (*Helminthosporium sativum*)

Nr.	Variante experimentale	Norma de consum l, kg/ha	Frecvența atacului, %	Intensitatea dezvoltării bolii, %	Eficacitatea biologică, %
1	Martor	-	46,7	9,6	-
2	Etalon Fitocid	1,0	40,4	1,72	82,1
3	Preparatul testat	2,0	25,6	1,6	83,3
4	Preparatul testat	3,0	21,5	0,99	89,7
DEM _{0,05}			18,9	4,6	

Pentru a determina dacă plantele au fost atacate de fuzarioza spicului au fost examinate în fiecare variantă câte 100 de spice în trei repetiții. Evidența frecvenței atacului a fost efectuată după o scală procentuală. Frecvența atacului în varianta martor a fost 3,3 % cu intensitate a dezvoltării bolii de 0,5 %. În variantele unde au fost efectuate tratamente cu biofungicidul testat în două concentrații diferite a fost atestat aceeași frecvență a atacului de 0,7 % și intensitate a dezvoltării bolii 0,07 %. Eficacitatea biologică a fost de 86,0 % (tab.5).

Tabelul 5

Eficacitatea biologică a biofungicidului testat în protecția grâului de toamnă de fuzarioza spicului (ciuperci gen. *Fusarium*)

Nr.	Variante experimentale	Norma de consum l, kg/ha	Frecvența atacului, %	Intensitatea dezvoltării bolii, %	Eficacitatea biologică, %
1	Martor	-	3,3	0,5	-
2	Etalon Fitocid	1,0	2,0	0,1	80,0
3	Preparatul testat	2,0	0,7	0,07	86,0
4	Preparatul testat	3,0	0,7	0,07	86,0
DEM _{0,05}			1,5	0,14	

În toate evidențele în varianta Etalon unde a fost utilizat biofungicidul Fitocid pe bază de bacteriei *Bacillus subtilis*, titrul 1×10^9 celule/ml, cu norma de consum 1 l/ha a fost atestată o eficacitate mai slabă ca în variantele experimentale.

Pe parcursul întregii perioade de vegetație nu au fost depistate plante cu simptome a făinării (ag. pat. *Blumeria graminis*). Aspectul general a parcelei experimentale unde au fost efectuată testarea la grâul de toamnă, soi Moldova-614 este prezentată în Fig. 2.



Fig. 2. Aspectul general a parcelei experimentale unde au fost efectuată testarea la grâul de toamnă, anul 2022, soi Moldova-614: a) perioada de vegetație primăvară-vară, b) sfârșitul perioadei de vegetație, coacere

Astfel, testarea preparatului biologic în bază de bacterie *Bacillus subtilis* împotriva unui complex de boli ale grâului de toamnă în condițiile climatice a Republicii Moldova din anul 2021-2022 a demonstrat că produsul biologic contribuie la reducerea semnificativă a putregaiului obișnuit al rădăcinilor, helmintosporiozei și fuzariozei spicului, comparativ cu parcelele netratate. Este posibilă inhibarea dezvoltării altor boli.

Concluzii

Eficacitatea biologică a biofungicidului în bază de *Bacillus subtilis* la reducerea putregaiului obișnuit al rădăcinilor (*Bipolaris sorokiniana*) la grâul de toamnă prin aplicarea unui tratament prin stropire în fenoza 25-37 BBCH (înfrățirea- apariția frunzei standard) la utilizarea normei de consum 2 kg/ha a fost 75,0 %, la utilizarea normei de consum 3 kg/ha – 90,0 %.

Eficacitatea biologică a biofungicidului în bază de *Bacillus subtilis* la reducerea helmintosporiozei (*Helminthosporium sativum*) la grâul de toamnă cu utilizarea normei de consum 2 kg/ha a fost 83,3 %, la utilizarea normei de consum 3 kg/ha – 89,7 %.

Eficacitatea biologică a biofungicidului la reducerea fuzariozei spicului (ciuperci gen. *Fusarium*) la utilizarea normei de consum 2 kg/ha și 3 kg/ha a fost identică, atingând 86,0 %.

Notă. Cercetarea a fost efectuată în cadrul subprogramului 011103, „Elaborarea mijloacelor ecologic inofensive de reducere a impactului organismelor dăunătoare ale culturilor agricole pe fondalul schimbărilor climatice” finanțat de Ministerul Educației și Cercetării al RM

Referințe bibliografice

1. ТОП-10 стран-производителей пшеницы в 2020/21 МГ. [Accesat 5.08.2024]. Link: <https://latifundist.com/rating/top-10-stran-proizvoditelej-pshenitsy-v-202021-mg>
2. Anuarul statistic al Republicii Moldova, 2023. [Accesat 5.08.2024]. Link: https://statistica.gov.md/files/files/publicatii_electronice/Anuar_Statistic/2023/16_AS.pdf.
3. Зосич А.А. и др. Рекомендации по защите зерновых культур. ТОО «Первая Агрохимическая Компания». 2021, pp. 3-25.
4. Wulff Brande Bh., HORVATH Diana., M. and WARD Eric R. Improving immunity in crops: new tactics in an old game. Current Opinion in Plant Biology. Vol. 14, no. 4, 2011, pp. 468–476. DOI 10.1016/j.pbi.2011.04.002.
5. Cawoy Helene et al. *Bacillus*-Based Biological Control of Plant Diseases. In: STOYTCHEVA, Margarita (ed.), Pesticides in the Modern World - Pesticides Use and Management. In Tech., 2011, pp. 273-302, ISBN 978-953-307-459-7. DOI 10.5772/17184.
6. Wang X. Q. et al. Application and Mechanisms of *Bacillus subtilis* in Biological Control of Plant Disease. In: MEENA, Vijay Singh (ed.), Role of Rhizospheric Microbes in Soil, 2018, pp. 225–

250. Singapore: Springer Singapore. ISBN 978-981-10-8401-0. DOI 10.1007/978-981-10-8402-7_9
7. Shoda Makoto. Bacterial control of plant diseases. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Vol. 89, no. 6, 2000, pp. 515–521. DOI 10.1016/S1389-1723(00)80049-3.
8. Lazari I. Îndrumări metodice pentru testarea produselor chimice și biologice de protecție a plantelor de dăunători, boli și buruieni în RM. Chișinău: Tipografia Centrală, 2002, 286 p. ISBN 9975-9597-3-3.
9. Arhiva meteo. [Accesat 5.08.2024]. Link: <https://rp5.md>
10. Риски возникновения засух в республике Молдова. [Accesat 5.08.2024]. Link: http://www.meteo.md/index.php/ru/description_codes/hazards/3.